

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

RAFAEL YUTAKA KURADOMI

Morfometria do crescimento, estrutura muscular e expressão de fatores miogênicos em um modelo de peixe transgênico (*Danio rerio*) para o hormônio do crescimento (GH)

RIO GRANDE, RS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Morfometria do crescimento, estrutura muscular e expressão de fatores miogênicos em um modelo de peixe transgênico (*Danio rerio*) para o hormônio do crescimento (GH)

RAFAEL YUTAKA KURADOMI

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marins

Rio Grande – RS

Março de 2009

Sumário

AGRADECIMENTOS	iii
Resumo geral	v
Abstract	vi
Introdução Geral	1
Bibliografia	3

Capítulo I

Crescimento heterogêneo em machos de <i>zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>) transgênicos para o hormônio do crescimento (GH): um efeito do excesso ou da alteração do perfil de secreção do hormônio?	8
Resumo	10
Abstract	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	15
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	19
Agradecimentos.....	25
Referências	26

Capítulo II

Crescimento muscular hipertrófico independente da indução de IGF-I local em um modelo de peixe transgênico (<i>Danio rerio</i>) para o hormônio do crescimento (GH)	43
Resumo	45
Summary	46
Material e Métodos.....	49
Resultados	51
Discussão.....	53
Lista de símbolos e abreviaturas	56
Agradecimentos.....	57
Referências	57
Conclusões gerais	73

Dedico este trabalho ao Brasil e a todos que amo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Yoshinobu e Rieko I. Kuradomi, pelo amor e carinho recebidos em TODOS os momentos de minha vida. Por acreditarem em meus ideais e me incentivando a conquistá-los, mesmo que isso aumente a distância entre nós. O meu amor, respeito e gratidão.

Aos meus irmãos, Clayton Y. e Igor Y. Kuradomi, por além de irmãos, são grandes e valiosos amigos, que também sempre me apoiaram. Meu sincero agradecimento e amor.

A minha namorada, Milene E. Hata, pessoa que em inúmeras vezes me colocou antes de si própria, sendo seu amor e apoio, fundamentais pra que eu alcançasse essa e muitas outras conquistas. E com quem desejo compartilhar muitas outras alegrias. TE AMO MUITO!

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Marins, que aceitou o desafio de me acolher como seu orientado e efetivamente fez-se presente em todas as etapas deste trabalho. Meu sincero muito obrigado, pela amizade, oportunidade e pelo exemplo profissional.

Ao professor Tabajara Lucas de Almeida, pela sua paciência e disponibilidade em perder algumas tarde me ajudando e ensinando análises multivariadas. Minha sincera gratidão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da FURG, por possibilitar o crescimento acadêmico e intelectual. E a todos os professores que ministraram disciplinas junto ao curso de Pós-Graduação em Aquicultura - FURG, por compartilharem conhecimentos e experiências.

A professora. Dra. Maeli Dal Pai Silva, pela ajuda, permitir utilizar o Laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP e os equipamentos para as análises histológicas. Aos técnicos: Sueli e Ricardo, que auxiliaram no processamento dos materiais.

Aos Professores Dr. Paulo César Abreu e Dra. Maeli Dal Pai Silva, constituintes da banca examinadora por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

Ao meu estimado amigo e “chefe” Márcio de Azevedo Figueiredo, pela inestimável e indispensável contribuição nas diferentes etapas deste estudo e pela sua paciência e amizade que fizeram “possíveis” as muitas horas que passamos trabalhando juntos.

Colegas (amigos) de laboratório: Bruno, Rafael (systinho), Carlos Frederico (fred), Carlos Eduardo (nino), Juliana (ju), Camila, Ana Lupe, Cassia, Regina, Bruna, Maira, Daniela e Liane. A amizade, ajudas, a divisão de tarefas, os churras e até mesmo as discussões, foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos e zootecnistas Leandro e Adriana, as pessoas que muito me ajudaram no início e ao longo do mestrado. Aos amigos que fiz aqui em Rio Grande: Kassio, Marianas, Lygia, Guerreiro, Felipe, Fábio, Marcelinho, Máira (do B), Flavinha, Patrícia, Márcio (colono), Josencler, Gabrielas, Rafaela, Emeline, Sabrina, Daiane (dada), meu companheiro de república, Cristiano e sua namorada Natália e os que aqui não estão citados,

mas não menos importantes, pois suas amizades foram de grande ajuda em momentos de dificuldades e alegria.

Aos colegas que fiz durante o período que estive na UNESP de Botucatu, em especial ao “Pei-dei”, “bife”, “rosquinha”, “casula” e “onze”, integrantes da republica Bakanal, onde fiquei hospedado durante este período.

Aos meus amigos de longa data, Carlos Alberto (Beto), Tamara (maninha), Fernando, Daizona, Dayzinha, Fagnão que mesmo longe sempre se fizeram presentes.

Muito OBRIGADO!

Resumo geral

O hormônio do crescimento (GH) é produzido e secretado pela adeno-hipófise tendo como efeito principal promover o crescimento somático em vertebrados. No presente estudo foi analisada a morfometria do crescimento, estrutura do tecido muscular e expressão de fatores miogênicos em indivíduos machos e fêmeas da linhagem F0104 de *zebrafish* transgênico para o GH. Os índices morfométricos sugerem que o excesso de GH circulante está promovendo uma antecipação na idade de maturação sexual. Também, foi observado um menor fator de condição nos transgênicos de ambos os sexos ($P < 0,05$) e uma alteração nos padrões morfométricos ao longo do tempo evidente nos machos transgênicos. As análises multivariadas demonstraram dois fenótipos distintos de machos transgênicos. O primeiro assemelha-se às fêmeas transgênicas (tamanho grande e baixo fator de condição), e o segundo aos machos não transgênicos (menor tamanho e baixo fator de condição). Este padrão de crescimento heterogêneo nos machos transgênicos pode ser explicado pela alteração do perfil de secreção do GH associado à variabilidade genética individual na resposta ao excesso de GH circulante. As análises histológicas demonstraram que os transgênicos apresentam uma hipertrofia muscular acentuada quando comparados com os não transgênicos, sendo as fêmeas transgênicas mais hipertróficas do que os machos transgênicos. A expressão dos genes relacionados com o crescimento muscular mostrou que a hipertrofia muscular observada nos transgênicos é independente do fator de crescimento tipo insulina I (IGF-I). Adicionalmente, nos machos transgênicos foi observada uma indução significativa na expressão da *miogenina*, indicando que esta proteína pode estar mediando, pelo menos em parte, o crescimento hipertrófico neste grupo. A expressão gênica também mostrou uma indução da α -actina somente em machos, independentemente da transgenia. Entretanto, não foi observada alteração no teor de proteínas totais de músculo. Dentro do contexto dos resultados obtidos no presente estudo, ficou evidente que o excesso de GH nos peixes transgênicos da linhagem F0104 provavelmente esteja promovendo uma maturação sexual precoce, uma hipertrofia muscular independente de IGF-I, e um crescimento heterogêneo em machos transgênicos devido à alteração do padrão de secreção do hormônio como efeito da expressão constitutiva do transgene. Este modelo é uma ferramenta interessante para o estudo de peixes com crescimento limitado.

Palavras-chave: transgênese, hormônio do crescimento, morfometria, histologia, expressão gênica, eixo somatotrófico, fatores miogênicos, dimorfismo sexual.

Abstract

Growth hormone (GH) is produced and released by the adenohypophysis being its main role to promote vertebrate somatic growth. The present study analyzed growth morphometrics, muscular tissue structure and myogenic factors expression in males and females from F0104 transgenic zebrafish lineage for GH. Morphometric indexes suggest that systemic GH excess is promoting an early sexual maturation. It was also observed a minor conditional factor in both sexes of transgenic group ($P < 0.05$), and an evident time-course male altering in morphometric patterns. The first is similar to transgenic females (big size and low condition factor) and the second to non-transgenic males (smaller size and low condition factor). This heterogeneous male growth pattern may be explained by the altering of the GH secretion profile associated to individual genetic variability in answer to systemic GH excess. Histological analysis demonstrated that transgenic presented an enhanced muscle hypertrophy when compared to non-transgenic, being transgenic females more hypertrophic than transgenic males. Gene expression related to muscle growth revealed that transgenic hypertrophy observed is independent from insulin-like growth factor I (IGF-I). In addition, transgenic males had a significantly *myogenin* gene expression induction indicating that, at least partially, this protein may be mediating hypertrophic growth in this group. It was also shown an induction in males of the *α-actin* gene independently from transgenesis. However, there were no differences in total protein content from the muscle. According the data presented in this study, it was evident that GH excess in F0104 transgenic fish lineage is probably promoting an early sexual maturation, a muscle hypertrophy independent from IGF-I, and a heterogeneous transgenic males growth due to hormone secretion pattern altering as an effect of the transgene constitutive expression. This model is an interesting tool for the study of fishes with limited growth.

Key words: transgene, growth hormone, morphometrics, histology, gene expression, somatotrophic axis, myogenic factor, sexual dimorphism.

Introdução Geral

Produzido e secretado pela adeno-hipófise, o hormônio do crescimento (GH) é liberado na corrente sanguínea, onde vai atuar através da sua associação com receptores específicos (receptor do hormônio de crescimento - GHR) presentes na superfície das células alvo. A partir desta ativação, mais de 400 ações são iniciadas, sendo que maioria destas está relacionada ao processo de crescimento (Waters *et al.* 2006). As vias de sinalização mediadas pelo GHR são iniciadas pela ligação do GH com sua porção extracelular. Análises do domínio extracelular do GHR associado ao GH indicam que uma molécula de GH liga-se sequencialmente com duas moléculas de GHR (Wells 1996). Esta ligação acarreta na ativação de uma cascata de sinalização intracelular, que culmina com a transcrição de genes específicos envolvidos no desenvolvimento das respostas biológicas ao GH (Schindler & Darnell Jr 1995, Ihle 1996, Waters *et al.* 2006). Desta forma, as respostas biológicas do GH são desenvolvidas e controladas, principalmente, pelo denominado eixo somatotrófico, onde o fator de crescimento tipo insulina I (IGF-I) é o principal mediador da ação fisiológica do GH (Moriyama *et al.* 2000, Butler & Le Roith 2001). O IGF-I é produzido em muitos tecidos, podendo atuar de forma endócrina, parácrina e autócrina (Butler & Le Roith 2001, Wood *et al.* 2005).

No músculo esquelético, o IGF-I atua na formação, manutenção e regeneração deste tecido (Stewart & Rotwein 1996, Benito *et al.* 1996, Le Roith *et al.* 2001, Rabinovsky *et al.*, 2003). Além disso, atua na proliferação de mioblastos, diferenciação miogênica e na hipertrofia muscular (Czerwinski *et al.* 1994, Florini *et al.* 1996, Le Roith *et al.* 2001). O crescimento da musculatura esquelética em peixes se faz pela proliferação e diferenciação das células progenitoras miogênicas também conhecidas como mioblastos adultos ou células mio-satélites, responsáveis pelo crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Koumans & Akster 1995, Johnston 1999, Johansen & Overturf 2005). Os mioblastos expressam proteínas da família hélice-alça-hélice, chamadas proteínas miogênicas, MyoD e Myf5. Quando ativadas, MyoD e Myf5 induzem os mioblastos a expressar outras proteínas miogênicas como a Miogenina e MFR4 (Watabe 1999, 2001). Este processo de crescimento muscular parece ser limitado por uma proteína chamada miostatina (MSTN), a qual atua induzindo uma parada do ciclo das células miogênicas na fase G1, impedindo a sua proliferação. A observação de que o tratamento com IGF-I aumenta a expressão de miostatina, sugere um possível mecanismo de antagonismo entre IGF-I e miostatina (Yang *et al.* 2007).

Modelos de animais geneticamente modificados têm sido utilizados para o estudo do eixo somatotrófico compreendido pela interação GH/GHR/IGF-I. Palmiter *et al.* (1982) produziram o primeiro camundongo transgênico superexpressando o gene do GH humano. O fenótipo gigante obtido e a sua transmissão mendeliana para a descendência abriu uma perspectiva interessante da utilização desta tecnologia para a produção de animais com características economicamente desejáveis. Entretanto, o aspecto mais importante deste estudo foi a produção de informações novas a respeito do efeito do GH em níveis supra-fisiológicos e na elucidação do mecanismo envolvido. Em peixes, até pouco tempo não existiam modelos geneticamente modificados, embora várias espécies comerciais tenham sido manipuladas com o objetivo do melhoramento para a aquicultura (Zbikowska 2003). Neste sentido, Figueiredo *et al.* (2007a) desenvolveram um modelo de *Danio rerio* transgênico para o GH (linhagem F0104). Esta espécie de ciprinídeo é conhecida no Brasil pelo nome popular de “paulistinha”, e internacionalmente como *zebrafish*. No presente trabalho, será utilizado o seu nome comum internacional. A linhagem F0104 representa o primeiro peixe transgênico produzido no país, tendo sido estudada para o crescimento e expressão de genes relacionados ao eixo somatotrófico (Figueiredo *et al.* 2007b), metabolismo e produção de espécies reativas de oxigênio (Rosa *et al.* 2008) e mecanismos de controle da sinalização intracelular do eixo somatotrófico (Studzinski *et al.* 2009).

O aumento nas taxas de crescimento tem sido a característica mais pesquisada como alvo para a manipulação genética em peixes, sendo provável que esta tecnologia seja aplicada com sucesso na aquicultura comercial (Wu *et al.* 2003). Entretanto, distorções no crescimento têm sido observadas especialmente na cabeça (Devlin *et al.* 1995, Ostefeld *et al.* 1998, Nam *et al.* 2002, Li *et al.* 2009), gordura e conteúdo protéico muscular (Chatakondi *et al.* 1995, Dunham *et al.* 2002). Desta forma, peixes transgênicos para o GH têm apresentado relações morfométricas diferentes daquelas apresentadas pelos não transgênicos. Alteração na arquitetura do tecido muscular também tem sido reportada, onde a administração de GH aumenta a proporção de fibras de menor diâmetro em truta arco-íris (Weatherly & Gill 1982, Fauconneau *et al.* 1997). Espécies de salmonídeos transgênicos para o GH revelaram uma maior proporção de pequenas fibras musculares em relação aos não-transgênicos (Hill *et al.* 2000, Pitkänen *et al.* 2001).

Diferenças morfométricas e crescimento muscular também são encontrados devido ao dimorfismo sexual, onde em peixes podem ser observadas variações no tamanho do corpo e peso entre machos e fêmeas (Imslund *et al.* 1997, Fletcher 1999, McMillan 1999, Spence *et al.* 2007). Variações na morfologia da cabeça, mandíbula e focinho também podem estar

relacionadas ao sexo (Goto 1984, Ellis & Shackley 1995, Gramitto & Coen 1997, Casselman & Schulte-Hostedde 2004). Sabe-se que o GH pode ter uma ação direta sobre as gônadas estimulando a esteroidogênese, gametogênese e vitelogênese e que existe uma influência dos hormônios esteróides sobre a secreção de GH hipofisário (Canosa *et al.*, 2007). Entretanto, poucos estudos foram realizados analisando a morfometria ao longo do desenvolvimento e, também, o efeito da superexpressão do GH no perfil morfométrico do peixe, estrutura do tecido muscular e expressão sexo-específica de genes que codificam para proteínas do eixo somatotrófico e miogênese.

Levando em consideração que o GH pode alterar o padrão de crescimento e sua relação com os hormônios esteróides, o objetivo do presente estudo foi analisar a morfometria do crescimento, a estrutura muscular e a expressão dos genes relacionados ao eixo somatotrófico e a miogênese em peixes da linhagem transgênica F0104, avaliando o efeito do sexo nos adultos.

Bibliografia

- BENITO, M, AM VALVERDE & M LORENZO. 1996. IGF-I: A mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28:499-510.
- BUTLER, AA & D LE ROITH. 2001. CONTROL OF GROWTH BY THE SOMATROPIC AXIS: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu. Rev. Physiol.* 63:141-164.
- CASSELMAN, SJ & AI SCHULTE-HOSTEDDE. 2004. Reproductive roles predict sexual dimorphism in internal and external morphology of lake whitefish, *Coregonus clupeaformis*. *Ecol. Freshw. Fish* 13:217-222.
- CHATAKONDI, N, RT LOVELL, PL DUNCAN, M HAYAT, TT CHEN, DA POWERS, JD WEETE, K CUMMINS & RA DUNHAM. 1995. Body composition of transgenic common carp, *Cyprinus carpio*, containing rainbow trout growth hormone gene. *Aquaculture* 138:99-109.
- CZERWINSKI, SM, JM MARTIN & PJ BECHTEL. 1994. Modulation of IGF mRNA abundance during stretch-induced skeletal muscle hypertrophy and regression. *J. Appl. Physiol.* 76:2026-2030.
- DEVLIN, RH, TY YESAKI, EM DONALDSON & HEW CL. 1995. Transmission and phenotypic effects of an antifreeze/GH gene construct in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 137:161-169.

- DUNHAM, RA, N CHATAKONDI, AJ NICHOLS, H KUCUKTAS, TT CHEN, DA POWERS, JD WEETE, K CUMMINS & RT LOVELL. 2002. Effect of rainbow trout growth hormone complementary DNA on body shape, carcass yield, and carcass composition of F1 and F2 transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). *Mar. Biotechnol.* 4:604-611.
- ELLIS, JR & SE SHACKLEY. 1995. Ontogenic changes and sexual dimorphism in the head, mouth and teeth of the lesser spotted dogfish. *J. Fish Biol.* 47:155 – 164.
- FAUCONNEAU, B, S ANDRE, J CHMAITILLY, P LE BAIL, F KRIEG & SJ KAUSHIK. 1997. Control of skeletal muscle fibres and adipose cells size in the flesh of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 50:296–314.
- FIGUEIREDO, MA, CFC LANES, DV ALMEIDA & LF MARINS. 2007a. Improving the production of transgenic fish germlines: *in vivo* evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. *Genet. Mol. Biol.* 30:31-36.
- FIGUEIREDO, MA, CFC LANES, DV ALMEIDA, MC PROIETTI & LF MARINS. 2007b. The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics.* 2:228-233.
- FLETCHER, DE. 1999. Male ontogeny and size-related variation in mass allocation of bluenose tright shiners (*Pteronotropis welaka*). *Copeia* 2:479-486.
- FLORINI, JR, DZ EWTON, & SA COOLICAN. 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr. Rev.* 17:481-517.
- GOTO, A. 1984. Sexual dimorphism in a river sculpin *Cottus hangiongensis*. *Gyoriigaku Zasshi* 31:161-166.
- GRAMITTO, ME & B COEN. 1997. New records of *Bellottia apoda* (Bythitidae) in the Adriatic Sea with notes on morphology and biology. *Cybium* 21:163-172.
- HILL, JA, A KIESSLING & RH DEVLIN. 2000. Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transgenic for a growth hormone gene construct exhibit increased rates of muscle hyperplasia and detectable levels of differential gene expression. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57:939–950.
- IHLE, JN. 1996. STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription. *Cell* 84:331-334.

- IMSLAND, AK, A FOLKVORD, GL GRUNG, SO STEFANSSON & GL TARANGER. 1997. Sexual dimorphism in growth and maturation of turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque, 1810). *Aquac. Res.* 28:101-114.
- JOHANSEN, KA & K OVERTURF. 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol.* 7:576–587.
- JOHNSTON, IA. 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177:99–115.
- KOUMANS, JTM & HA AKSTER. 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 110:3–20.
- LE ROITH, D, L SCAVO & A BUTTLE. (2001). What is the role of circulating IGF-I? *Trends Endocrinol. Metab.* 12:48-52.
- LI, D, W HU, Y WANG, Z ZHU & C FU. 2009. Reduced swimming abilities in fast-growing transgenic common carp *Cyprinus carpio* associated with their morphological variations. *J. Fish Biol.* 74:186 – 197.
- MCMILLAN, PJ. 1999. New grenadier fishes of the genus *Coryphaenoides* (Pisces; Macrouridae), one from off New Zealand and one widespread in the southern Indo West pacific and Atlantic Oceans. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 33:481-489.
- MORIYAMA, S, FG AYSON & H KAWAUCHI. 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:1553-1562.
- NAM, YK, YS CHO, HJ CHO & DS KIM. 2002. Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *Aquaculture* 209:257-270.
- OSTENFELD, TH, E MCLEAN & RH DEVLIN. 1998. Transgenesis changes body and head shape in Pacific salmon. *J. Fish Biol.* 52:850-854.
- PALMITER, RD, RL BRINSTER, RE HAMMER, ME TRUMBAUER, MG ROSENFELD, NC BIRNBERG & RM EVANS. 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein–growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611 – 615.
- PITKÄNEN, TI, SQ XIE, A KRASNOV, PS MASON, H MÖLSÄ & NC STICKLAND. 2001. Changes in tissue cellularity are associated with growth enhancement in genetically modified arctic char (*Salvelinus alpinus L.*) carrying recombinant growth hormone gene. *Mar. Biotechnol. (NY)* 3:188-197.

- RABINOVSKY, ED, E GELIR, S GELIR, H LUI, M KATTASH, FJ DEMAYO, SM SHENAQ & RJ SCHWARTZ. (2003). Targeted expression of IGF-1 transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. *FASEB J.* 17:53-55.
- ROSA, CE, MA FIGUEIREDO, CFC LANES, DV ALMEIDA, JM MONSERRAT & LF MARINS. 2008. Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 149:209-214.
- SCHINDLER, C. & JE JR DARNELL. 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 64:621-651.
- SPENCE, R, MK FATEMA, S ELLIS, ZF AHMED & C SMITH. 2007. The diet, growth and recruitment of wild zebrafish (*Danio rerio*) in Bangladesh. *J. Fish Biol.* 71:304–309.
- STEWART, CE & P ROTWEIN. 1996. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev.* 76:1005-1026.
- STUDZINSKI, AL, DV ALMEIDA, CF LANES, MA FIGUEIREDO & LF MARINS. 2009. SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the somatotrophic axis in liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 161:67-72.
- WATABE, S. 2001. Myogenic regulatory factors. In: JOHNSTON, IA (ed.) *Muscle Development and Growth*. London: Academic Press. pp. 19–41.
- WATABE, S. 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.* 55:1–18.
- WATERS, MJ, HN HOANG, DP FAIRLIE, RA PELEKANOS & RJ BROWN. 2006. New insights into growth hormone action. *J. Mol. Endocrinol.* 36: 1-7.
- WEATHERLEY, AH & H GILL. 1982. Influence of bovine growth hormone on the growth dynamics of mosaic muscle in relation to somatic growth of rainbow trout *O. mykiss*. *J. Fish Biol.* 20:165–172.
- WELLS, JA. 1996. Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:1-6.
- WOOD, AW, C DUAN & HA BERN. 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int. Rev. Cytol.* 243:215-285.
- WU, G, Y Sun & Z Zhu. 2003. Growth hormone gene transfer in common carp. *Aquat. Living Resour.* 16:416–20.
- YANG, W, Y ZHANG, Y LI, Z WU & D ZHU. 2007. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/GSK-

3 β pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. *J. Biol. Chem.* 282:3799–3808.

ZBIKOWSKA, HM. 2003. Fish can be first – advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Res.* 12:379-389.

Capítulo I

Crescimento heterogêneo em machos de *zebrafish* (*Danio rerio*) transgênicos para o hormônio do crescimento (GH): um efeito do excesso ou da alteração do perfil de secreção do hormônio?

Co-autores: Márcio Azevedo Figueiredo, Carlos Frederico Ceccon Lanes, Daniela Volcan Almeida, Rodrigo Maggioni e Luis Fernando Marins

Segundo normas da revista "Journal of Fish Biology"

Crescimento heterogêneo em machos de *zebrafish* (*Danio rerio*) transgênicos para o hormônio do crescimento (GH): um efeito do excesso ou da alteração do perfil de secreção do hormônio?

R. Y. Kuradomi†, M. A. Figueiredo†, C. F. C. Lanes‡, D. V. Almeida§, R. Maggioni# e L. F. Marins§†‡*

† Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS - Brasil.

‡ Faculty of Biosciences and Aquaculture, Bodø University College, NO-8049 Bodø, Norway.

§ Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS - Brasil.

‡ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS - Brasil.

Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza, CE - Brasil

*Autor para correspondência: L. F. Marins. Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Itália, Km 8, CEP 96201-900, Rio Grande, RS - Brasil.

Tel.: +55 53 3233 6851; Fax: +55 53 3233 6848. E-mail: dqmluf@furg.br

Resumo

O objetivo do presente estudo foi analisar a morfometria do crescimento da linhagem F0104 de *zebrafish* transgênico para o hormônio do crescimento (GH), avaliando o efeito do sexo nos adultos. Os dados obtidos no presente estudo mostram que a superexpressão do GH promove um aumento significativo no crescimento, o qual é sexo-independente. Os índices que medem as proporções do corpo e o estado fisiológico sugerem que o excesso de GH está induzindo a um menor fator de condição nos transgênicos ($P < 0,05$), concomitantemente com uma redução no índice da altura em relação ao comprimento padrão, sendo mais evidenciado nos machos. Contudo, os índices morfométricos apresentaram resultados coerentes com a hipótese de uma maturação sexual precoce nos transgênicos que, provavelmente, também é sexo-independente. As análises de componentes principais mostraram que os machos transgênicos não formaram um grupo distinto, distribuindo-se entre o grupo formado principalmente pelas fêmeas transgênicas e outro formado pelos machos não transgênicos, sugerindo uma alta variabilidade no tamanho. Este padrão de crescimento heterogêneo nos machos transgênicos pode ser explicado pela alteração do perfil de secreção do GH associado à variabilidade genética individual na resposta ao excesso de GH circulante.

Palavras-chave: Morfometria, transgênicos, hormônio do crescimento, *zebrafish*, sexo, crescimento heterogêneo

Abstract

The aim of the present study was to analyze growth morphometry of zebrafish F0104 transgenic lineage for growth hormone (GH), evaluating sex effects in adults. Our data demonstrate that a GH overexpression promotes a significant growth rising rate independently of sex. The indexes related to body proportion measurements and physiological conditions suggests that GH excess is responsible for inducing a minor condition factor in transgenic zebrafish ($P < 0.05$), simultaneously with a decrease in height related to length (more evident in males). However, morphometric indexes presented plausible results to the hypothesis of an early transgenic sexual maturation which, probably, is also independent of sex. The principal component analyses have shown two distinct groups for NT males and T females, while T males were spread out over them, suggesting high variability in size. This heterogeneous growth pattern for transgenic males might be explained by the altered GH secretion profile associated to individual genetic variability in response to systemic GH excess.

Key words: Morphometry, transgenic, growth hormone, zebrafish, sex, heterogeneous growth.

INTRODUÇÃO

O hormônio do crescimento (GH), também denominado de somatotropina, é produzido e secretado pela adeno-hipófise tendo como efeito principal promover o crescimento somático em vertebrados. No desenvolvimento do processo de crescimento o GH liberado na corrente sanguínea irá atuar em determinados órgãos através da sua associação com receptores específicos presentes na superfície das células-alvo chamados de receptores do GH (GHR). Esta ligação acarreta na ativação uma cascata de sinalização intracelular que culmina com a transcrição de genes específicos envolvidos no desenvolvimento das respostas biológicas ao GH (Schindler & Darnell Jr., 1995; Ihle, 1996; Waters *et al.*, 2006). Desta forma, as respostas biológicas do GH são desenvolvidas e controladas principalmente pelo denominado de “eixo somatotrófico”, onde o Fator de Crescimento tipo Insulina I (IGF-I) é o principal mediador da ação fisiológica do GH (Moriyama *et al.*, 2000; Butler & Le Roith, 2001).

O IGF-I exerce sua função na integração entre a regulação tecido-específica e outros eventos biológicos através da ligação com seus receptores específicos (IGF-IR) presentes nas células alvo (Moriyama *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2005). Em peixes e em outros vertebrados o fígado é o principal sítio produtor do IGF-I (Yakar *et al.*, 1999; Reinecke *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2005), sendo demonstrado a existência de uma correlação positiva com a expressão e concentração de IGF-I plasmático e a taxa de crescimento (Kajimura *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 2003, Figueiredo *et al.*, 2007a) . Entretanto, a expressão do gene *IGF-I* pode ocorrer em outros tecidos, exercendo um papel autócrino e parácrino (para uma revisão ler: Wood *et al.*, 2005) o qual também parece ter importante efeito sobre o crescimento (Yakar *et al.*, 1999; Butler & Le Roith, 2001; Nordgarden *et al.*, 2006; Eppler *et al.*, 2007).

O IGF-I parece estar relacionado a sulfatação em cartilagem, onde foi observado um aumento na captura de ³⁵S-sulfato após o tratamento com IGF-I (Duan & Hirano, 1990; Cheng & Chen, 1995; Takagi & Björnsson 1996, 1997). No músculo esquelético, o GH pode

atuar de forma independente do IGF-I (Nordgarden *et al.*, 2006; Sotiropoulos *et al.*, 2006), sendo que o IGF-I atua na formação, manutenção e regeneração deste tecido (Stewart & Rotwein, 1996; Benito *et al.*, 1996; Le Roith *et al.*, 2001; Rabinovsky *et al.*, 2003). Além disso, atua na proliferação de mioblastos, diferenciação miogênica e na hipertrofia muscular (Czerwinski *et al.*, 1994; Florini *et al.*, 1996; Le Roith *et al.*, 2001), sugerindo que o GH e IGF-I devem atuar em sinergismo no processo do crescimento muscular esquelético. No caso do crescimento ósseo, estudos com camundongos nocauteados demonstraram que o crescimento ósseo lento de duplo mutantes para os genes do *GHR* e do *IGF-I* não diferiu significativamente de mutantes com os genes nocauteados individualmente (Lupu *et al.*, 2001), indicando sobreposição funcional do GH e do IGF-I. Esta sobreposição também pode ser encontrada em peixes, onde é sugerido que o GH tem um papel inicial na indução do crescimento ósseo, enquanto que IGF-I está relacionado com a produção da matriz óssea (Wargelius *et al.*, 2005; Nordgarden *et al.*, 2006).

O gene do GH tem sido empregado para a manipulação genética em peixes com o objetivo do aumento do crescimento para a aquicultura (Zbikowska, 2003; Devlin *et al.*, 2006). De fato, a superexpressão do hormônio geralmente proporciona um aumento significativo no crescimento (Du *et al.*, 1992, Rahman *et al.*, 1998; Nam *et al.*, 2001; Devlin *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2007a). Entretanto, de acordo com Fauconneau *et al.* (1995), o crescimento se faz por processos harmoniosos do desenvolvimento de importantes tecidos como: ósseo, conjuntivo, muscular e adiposo, juntamente a mudanças nos traços morfométricos, químicos e bioquímicos. Distorções no crescimento de peixes transgênicos para GH têm sido observadas especialmente na cabeça (Devlin *et al.*, 1995a, Ostefeld *et al.*, 1998, Nam *et al.*, 2002), gordura e conteúdo protéica muscular (Chatakondi *et al.*, 1995; Dunham *et al.*, 2002). Desta forma, peixes transgênicos para o GH têm apresentado relações morfométricas diferentes daquelas apresentadas pelos não transgênicos.

Diferenças morfométricas também são encontradas devido ao dimorfismo sexual, onde em peixes podem ser observadas variações no tamanho do corpo e peso entre machos e fêmeas (Imsland *et al.*, 1997; Fletcher, 1999; McMillan, 1999). Variações na morfologia da cabeça, mandíbula e focinho também podem estar relacionadas ao sexo (Goto, 1984; Gramitto & Coen, 1997; Casselman & Schulte-Hostedde, 2004; Ellis & Shackley, 1995). Também, o padrão de secreção do GH é distinto entre os sexos em roedores (Jansson *et al.*, 1985). Neste grupo, o padrão de secreção do GH nos machos é caracterizado por picos abruptos e com uma periodicidade longa entre picos enquanto que nas fêmeas é caracterizado por picos menos acentuados, porém mais frequentes. Assim como em mamíferos, em carpas foi reportado um padrão de secreção pulsátil do GH (Zhang *et al.*, 1994). Entretanto, a secreção do referido hormônio pode ser influenciada por diversos fatores tais como regime alimentar, fotoperíodo e temperatura (Marchant & Peter, 1986; Reddy & Leatherland, 1995). Também, hormônios sexuais podem influenciar a secreção do GH (Kakizawa *et al.*, 1995; Holloway *et al.*, 2000; Mercure *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2002).

Embora existam várias linhagens de peixes transgênicos para o GH produzidas, poucos estudos foram realizados analisando a morfometria ao longo do desenvolvimento e, também, o efeito da superexpressão do GH no perfil morfométrico de machos e fêmeas. Recentemente, Figueiredo *et al.* (2007a) desenvolveram uma linhagem geneticamente modificada de *zebrafish* (*Danio rerio*) superexpressando o gene do GH que pode ser utilizada como um modelo para este propósito. Diferentes genótipos desta linhagem (denominada F0104) têm sido estudados para o crescimento e expressão de genes relacionados ao eixo somatotrófico (Figueiredo *et al.*, 2007b), metabolismo e produção de espécies reativas de oxigênio (Rosa *et al.*, 2008) e mecanismos de controle da sinalização intracelular do eixo somatotrófico (Studzinski *et al.*, 2009). Assim, o objetivo do presente estudo foi analisar a morfometria do

crescimento ao longo do desenvolvimento em juvenis e adultos da linhagem transgênica F0104, avaliando o efeito do sexo nos adultos.

MATERIAL E MÉTODOS

PEIXES TRANSGÊNICOS

Os peixes transgênicos para o gene do GH e não transgênicos (controles) foram obtidos a partir do cruzamento entre fêmeas não transgênicas com machos transgênicos hemizigotos da linhagem F0104 (Figueiredo *et al.*, 2007a). Essa linhagem foi produzida através da co-injeção dos transgenes $c\beta/msGH$ e $c\beta A/GFP$, estando ambos transgenes com a expressão direcionada pelo promotor da β -actina da carpa (*Cyprinus carpio*), porém associados ao cDNA do GH do peixe-rei marinho (*Odontesthes argentinensis*) (Marins *et al.*, 2002) e ao gene da proteína verde fluorescente (GFP). A GFP foi utilizada como um marcador de transgenia, possibilitando a identificação dos transgênicos pela análise da fluorescência (excitação = 485 nm; emissão = 520 nm).

EXPERIMENTO DE CRESCIMENTO

Todas as larvas obtidas, transgênicas e não transgênicas foram criadas até seis meses de idade em um sistema equipado com filtro biológico. Cada grupo (transgênicos – T e não transgênicos – NT) foi dividido em cinco repetições, em uma densidade média de um peixe por litro de água, em recipientes com capacidade máxima de 12 L. A qualidade da água foi monitorada pelo menos uma vez por semana, sendo temperatura, pH, compostos nitrogenados e fotoperíodo mantidos em níveis requeridos por *zebrafish* (Westerfield, 1995). Os peixes foram alimentados com ração comercial com alto teor de proteína bruta (47,5%), duas vezes ao dia *ad libidum*.

ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

Uma vez por mês os animais foram anestesiados (Tricaína, 0.1 mg ml⁻¹), pesados, morfologicamente sexados (somente a partir do quarto mês) e fotografados utilizando câmera digital. De cada imagem digitalizada (conforme a Fig. 1) foram tomadas as seguintes medidas métricas (cm): Comprimento da cabeça (L_h) - distância linear da margem anterior da cabeça até a margem posterior da membrana do opérculo; Comprimento padrão (L_s) - comprimento da margem anterior da cabeça até a margem posterior do corpo (inserção da nadadeira caudal); Altura do corpo (H_b) - distância vertical máxima perpendicular ao eixo do corpo. As medidas foram tomadas utilizando o *software* livre IMAGE J (*E.U. National Institute of Health*, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), onde cada medida foi tomada em triplicata e a média da mesma utilizada para as análises.

Para avaliar a proporcionalidade dos traços morfométricos, foram realizados os seguintes índices: L_h/L_s - Comprimento da cabeça/Comprimento padrão; H_b/L_s - Altura do corpo/Comprimento padrão. A partir dos traços morfométricos e do Peso total (W_T) dos indivíduos também foi calculado o Fator de condição (K), usando a seguinte fórmula: $K = (W_T \cdot L_s^{-3}) \times 10^3$, onde “W_T” representa o peso total em miligramas e “L_s” o comprimento padrão em milímetros.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As médias (± S.E.) de L_s, L_h, H_b, W_T e K de todos os meses foram comparadas entre os grupos dos T e NT, utilizando o teste t de Student. Os grupos das fêmeas transgênicas (TF), machos transgênicos (TM), fêmeas não transgênicas (NTF) e machos não transgênicos (NTM) foram testados através da análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey HSD para *n* desigual (Sokal & Rohlf, 1995). ANOVA de duas vias foi utilizada para comparar as médias dos índices L_h/L_s, H_b/L_s e K entre os grupos e o mesmo grupo ao longo

dos meses. Quando encontrada significância na ANOVA foi realizado o teste de Tukey HSD para n desigual. Foram feitas análises de componentes principais (PCA) utilizando variáveis brutas (L_s , L_h , H_b e W_T) e K dos grupos (TF, TM, NTF e NTM) com quatro, cinco e seis meses de idade. Para todas as análises, foi utilizado o programa R version 2.2.1 (R Development Core Team, 2005), sendo considerada significância $P < 0,05$.

RESULTADOS

As médias das variáveis L_s , L_h , H_b , e W_T na comparação entre os transgênicos e não transgênicos e levando em consideração o sexo estão apresentadas nas Tabelas I e II, respectivamente. Em todos os meses não foram encontradas diferenças em nenhuma variável entre as repetições (dado não demonstrado), assim cada animal foi considerado uma repetição. O grupo dos T apresentou resultados significativamente maiores ao dos NT em todos os meses para todas as variáveis analisadas (Tabela I). Na comparação levando em consideração o sexo (Tabela II), as TF foram superiores as NTF no L_s , L_h e W_T nos três meses analisados. Para H_b , TF foi superior a NTF apenas no sexto mês. Com relação aos machos, os TM foram significativamente maiores do que os NTM para todas as variáveis em todos os meses analisados. Na comparação entre os sexos de cada grupo, foi observado que fêmeas são mais altas e mais pesadas do que os machos tanto nos transgênicos como nos não transgênicos, não havendo diferenças significativas no L_s e no L_h entre machos e fêmeas tanto no grupo dos transgênicos quanto no dos não transgênicos.

Em relação aos índices, as médias de L_h/L_s , H_b/L_s e K não diferiram entre T e NT durante os três primeiros meses (Fig. 2A, B, C). Entretanto, a partir do quarto mês foi observada uma diferença significativa no fator de condição (K) entre T e NT (Fig. 2C). No quarto mês também foi observada uma queda significativa no índice L_h/L_s no grupo dos T ($P < 0,05$), enquanto que uma queda semelhante foi observada nos NT apenas no quinto mês

(Fig. 2A). Já em relação ao índice H_b/L_s , a partir do quarto mês até o sexto mês os T apresentaram um valor significativamente menor que os NT.

Com relação às comparações levando em consideração o sexo, duas diferenças significativas foram observadas para o índice L_h/L_s (Fig. 3A). Primeiro, os não transgênicos de ambos os sexos mostraram um L_h/L_s significativamente maior do que aquele observado para os transgênicos no quarto mês. Este padrão não se repetiu nos meses subsequentes. Segundo, houve uma queda acentuada neste índice para os NTM do quarto para o quinto mês, a qual não foi observada para os outros grupos. As demais comparações possíveis não mostraram diferenças estatisticamente significativas.

Para o índice H_b/L_s foi observado que as fêmeas tanto transgênicas quanto não transgênicas apresentam um índice superior aos machos, com exceção do quinto mês. Também, as NTF foram superiores às TF em todos os meses analisados. Na comparação ao longo do tempo, apenas os TM mostraram uma queda significativa e gradual neste índice do quarto para o sexto mês, enquanto que os demais grupos mantiveram o índice constante (Fig. 3B).

A análise do K para os não transgênicos demonstrou que as fêmeas possuem um K mais elevado do que os machos em todos os meses analisados. Esta diferença não foi observada na comparação entre machos e fêmeas transgênicas no mesmo período. Da mesma forma que foi observado para o índice H_b/L_s , as NTF foram superiores a todos os outros grupos em todos os meses. Entretanto, houve uma queda significativa neste grupo do quarto para o quinto mês, o que também foi observado para o grupo NTM. Já para os transgênicos, o valor de K manteve-se constante ao longo do tempo tanto para TF quanto para TM.

As PCAs mostraram o mesmo padrão nos três meses analisados (quarto, quinto e sexto), sendo que a Fig. 4 representa o resultado da análise com os dados do sexto mês. As PCAs reduziram as variáveis originais em dois fatores, recuperando mais de 95% das

informações dos dados originais. O primeiro fator está correlacionado com as variáveis brutas L_s , H_b , L_h e W_T que representam o tamanho, enquanto que o segundo fator está correlacionado com o K . Quando projetados os casos no plano de fatores, foi possível identificar três grupos distintos (Fig. 4). Interessantemente, os machos transgênicos não formaram um grupo distinto, distribuindo-se entre o grupo formado principalmente pelas fêmeas transgênicas e outro formado pelos machos não transgênicos.

DISCUSSÃO

Embora existam inúmeros trabalhos analisando o crescimento em peixes transgênicos para o GH (Devlin *et al.*, 2006, Nam *et al.*, 2008), estudos enfocando a morfometria são raros. Ao nosso conhecimento, o presente trabalho é o primeiro que relaciona morfometria ao longo do desenvolvimento e o dimorfismo sexual em um modelo de peixe transgênico. A análise das variáveis brutas (L_s , L_h , H_b e W_T) utilizadas no presente estudo mostrou um aumento significativo nos transgênicos (Tabela I), da mesma forma que tem sido reportado para outras espécies de peixes transgênicos para o GH tais como salmão (Devlin *et al.*, 1994, 1995b, 2004), tilapia (Rahman *et al.*, 1998, 2001), carpa (Zhang *et al.*, 1990; Dunham *et al.*, 2002), mud loach (Nam *et al.*, 2001, 2002) e *zebrafish* (Figueiredo *et al.*, 2007a,b; Rosa *et al.*, 2008). A análise das mesmas variáveis levando em consideração o dimorfismo sexual morfológico do quarto ao sexto mês apontou que, de um modo geral, machos e fêmeas transgênicas foram superiores aos seus respectivos pares não transgênicos (Tabela II). Assim, os resultados aqui obtidos sugerem que o efeito do GH sobre o crescimento é sexo-independente. Tomando por exemplo o ganho em peso percentual ao final do sexto mês, tanto TF quanto TM foram aproximadamente 53% superiores do que NTF e NTM, respectivamente. Utilizando o mesmo exemplo, porém comparando entre os sexos de cada grupo, observa-se que ambas as fêmeas são aproximadamente 45% mais pesadas do que os respectivos machos. Ao nosso

conhecimento, esta é a primeira evidência de que a manipulação genética do GH em peixes causa um efeito equivalente sobre o crescimento de machos e fêmeas, caracterizando uma resposta sexo-independente ao excesso de hormônio circulante.

Com relação ao efeito do GH sobre os índices que representam as proporções corporais (L_h/L_s : comprimento da cabeça sobre comprimento padrão; H_b/L_s : altura do corpo sobre o comprimento padrão) e o fator de condição (K), não foram observadas diferenças significativas entre transgênicos e não transgênicos até o terceiro mês de idade (Fig. 2A, B, C). Este fato indica que o excesso de GH não causa uma alteração nas proporções do corpo na fase juvenil. Entretanto, a partir do quarto mês foi observada uma queda significativa de L_h/L_s nos transgênicos, enquanto que nos não transgênicos uma queda similar ocorreu apenas no quinto mês (Fig. 2A). Este índice representa a proporção da cabeça em relação ao corpo, o qual pode refletir discrepâncias no crescimento ósseo e cartilaginoso ou estar relacionado com o processo de maturação sexual visto que, em humanos e mamíferos, ocorre um aumento no crescimento ósseo durante a puberdade (Libanati *et al.*, 1999; Richman *et al.*, 2001).

Anomalias no crescimento da cabeça têm sido reportadas em peixes transgênicos para GH como, por exemplo, salmão (Devlin *et al.*, 1995a; 2000), carpa (Dunham *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009), mud load (Nam *et al.*, 2002) e Tilápia (Rahman *et al.*, 2001). Entretanto, no presente estudo tais anomalias não foram observadas. Desta forma, nós hipotetizamos de que, assim como em mamíferos, em *zebrafish* existe um aumento na taxa de crescimento do corpo em relação à cabeça que está relacionado com o processo de maturação sexual. Neste sentido, a queda antecipada no índice L_h/L_s nos transgênicos pode indicar uma maturação precoce neste grupo. Em estudos recentes foi observado que os *zebrafish* atingem maturidade sexual com aproximadamente 2,3 cm de L_s (Spence *et al.*, 2007; 2008). Observando os dados de L_s na Tabela I, pode-se notar que os transgênicos atingem esta medida do terceiro para o quarto mês, enquanto que os não transgênicos somente do quarto para o quinto. Esta observação

corroborar a hipótese de que os transgênicos estejam maturando precocemente devido ao efeito do excesso de GH. Maturação sexual antecipada em peixes transgênicos para o GH já foi reportada em salmão (Devlin *et al.*, 2004). A análise deste índice levando em consideração o sexo (Fig. 3A) mostra que não existem diferenças significativas entre os sexos dentro de cada grupo nos três meses analisados. Entretanto, observou-se uma queda deste índice nos não transgênicos do quarto para o quinto mês, sendo esta queda mais evidente nos machos do que nas fêmeas. É provável que uma queda semelhante tenha ocorrido nos transgênicos na passagem do terceiro para o quarto mês, porém isto não foi possível de testar devido à dificuldade de distinção morfológica entre os sexos no terceiro mês (Laale, 1977). Estes resultados sugerem que o efeito do excesso de GH sobre a proporção da cabeça em relação ao comprimento do corpo dos transgênicos é independente do sexo, porém possivelmente esteja realmente relacionado com o processo de maturação sexual.

O índice H_b/L_s (altura do corpo sobre o comprimento padrão) reflete o formato geral do corpo do peixe e está intimamente relacionado com o fator de condição (K), uma vez que este último representa uma relação entre o comprimento e o peso que pode indicar o estado fisiológico do animal. Na comparação entre transgênicos e não transgênicos, ambos índices apresentaram o mesmo resultado, onde não foram verificadas diferenças até o terceiro mês de idade (Fig. 2B, C). Esta observação sugere uma ausência de efeito do excesso de GH no formato do corpo e no estado fisiológico do animal na fase juvenil. Entretanto, a partir do quarto mês, os transgênicos apresentaram valores inferiores aos não transgênicos tanto para H_b/L_s quanto para K. Na comparação por sexo para estes mesmos índices (Fig. 3B, C), este padrão foi mantido apenas nas fêmeas, o que pode ser um efeito do acúmulo de vitelo para o processo de maturação das gônadas e formação de ovócitos no estado gravídico (Laale, 1977). É interessante observar que este efeito é maior nas fêmeas não transgênicas do que nas transgênicas, provavelmente devido à dificuldade imposta pelo excesso de GH no acúmulo de

reservas lipídicas associado ao aumento do comprimento do corpo. Entre os machos, ambos os índices não mostraram diferenças significativas nos três meses analisados, com exceção do K no quarto mês. Neste caso, os machos não transgênicos apresentaram um valor de K superior aos transgênicos, provavelmente devido à necessidade de um acúmulo de reservas para iniciar os processos de maturação sexual (Godø & Haug, 1999). Com relação especificamente ao índice H_b/L_s , nos machos transgênicos observou-se uma queda gradual significativa ao longo do tempo. Esta alteração pode estar refletindo um efeito do GH no formato do corpo, tornando os TM mais esguios ao longo do tempo em relação aos demais grupos devido à aceleração do crescimento ósseo e alterando os processos homeostáticos que mantém a morfologia normal do peixe (Devlin *et al.*, 2001). Este efeito não foi tão evidente nas TF provavelmente devido ao aumento da altura do corpo decorrente da manutenção do estado gravídico nos meses analisados.

Levando em consideração o conhecido efeito lipolítico do GH (Sheridan, 1994), é plausível pensar que o excesso de GH em um animal transgênico possa prejudicar o acúmulo de reservas lipídicas e afetar não só o formato do corpo, mas também uma série de funções fisiológicas. De fato, um estudo realizado com carpas (*Cyprinus carpio*) transgênicas para o GH comprovou que o excesso deste hormônio promove uma redução significativa no teor de gordura do animal (Dunham *et al.*, 2002). Neste sentido, a diminuição na quantidade de gordura disponível pode dificultar a produção de hormônios sexuais esteróides. De acordo com Godø & Haug (1999), peixes necessitam de energia extra para iniciarem a maturação sexual. Zaboloukas *et al.* (2006) mostraram que no bonito (*Sarda sarda*) ocorre uma redução na gordura do tecido muscular esquelético e hepático em ambos os sexos durante o período de maturação sexual, o que efetivamente pode influenciar o valor de K. Considerando que o K pode indicar o início do processo de maturação sexual, os dados apresentados na Fig. 2C mostram que os valores máximos de K para os transgênicos foram obtidos no terceiro mês

enquanto que nos não transgênicos no quarto. Este resultado distinto entre os grupos reflete, possivelmente, o estado de maior reserva energética de cada animal que ocorre imediatamente antes da maturação sexual. Assim, esta evidência corrobora a hipótese de maturação sexual dos transgênicos no quarto mês e dos não transgênicos no quinto. Cabe ressaltar que a diferença significativa observada nos valores máximos de K nos dois grupos (T = 16,9; NT = 21,4) também pode ser explicada pelo efeito lipolítico do GH nos transgênicos associado ao acelerado crescimento ósseo que aumenta o comprimento do corpo, afetando diretamente o valor de K. Um K menor indica um crescimento mais rápido no comprimento em relação ao peso (Rahman *et al.*, 1998; 2001).

As análises de componentes principais (PCAs) foram realizadas para verificar se as variáveis e índices utilizados no presente trabalho poderiam caracterizar eficientemente os quatro grupos estudados: TF, TM, NTF e NTM. Os resultados obtidos mostraram que 95% dos dados originais podem ser explicados por dois fatores, o primeiro mais correlacionado com as variáveis brutas L_s , H_b , L_h e W_T , e o segundo com K. A Fig. 4 mostra que a projeção dos casos no plano de fatores possibilitou a identificação de três grupos distintos. Um grupo representando principalmente pelas TF, outro principalmente pelas NTF, e um terceiro representado principalmente pelos NTM. O único grupo que não ficou definido por estas análises foi TM, o qual se apresentou distribuído entre as fêmeas transgênicas e os machos não transgênicos. Estes resultados sugerem que existe uma maior variabilidade no tamanho dos machos transgênicos em resposta ao excesso de GH circulante, fato que não foi observado para os demais grupos analisados.

Uma explicação para a variabilidade no tamanho de machos transgênicos pode decorrer do fato de que existe um padrão sexo-específico de secreção do GH ao longo do dia. Em mamíferos, um padrão de secreção pulsátil sexo-específico do GH já foi bem caracterizado, onde a fêmea apresenta picos de secreção mais frequentes e menos

pronunciados ao longo do dia, enquanto que o padrão do macho é caracterizado por picos menos frequentes, porém com maior amplitude (Jansson *et al.*, 1985). Apesar de que as informações disponíveis em peixes são mais escassas, existem evidências de que o GH também pode ser secretado de forma episódica (Zhang *et al.*, 1994). Embora, ao nosso conhecimento, uma secreção sexo-específica ainda não tenha sido caracterizada neste grupo de vertebrados, machos imaturos de truta arco-íris apresentam picos de GH mais elevados do que fêmeas (Gomez *et al.*, 1996). Em *brook charr* também foi detectada uma maior expressão de IGF-I e GHR em machos (Côté *et al.*, 2007), a qual pode ser decorrente de níveis mais elevados de GH circulante. Assim, parece que além da quantidade de GH circulante, o padrão de secreção do GH é uma variável que também deve ser levada em consideração visto que sua alteração pode implicar em respostas fisiológicas sexo-dependentes. No caso do modelo de *zebrafish* transgênico objeto do presente estudo, a superexpressão do GH de forma constante ao longo do tempo pode representar um padrão semelhante ao padrão típico de fêmea reportado para mamíferos. Neste caso, é possível que os machos transgênicos estejam respondendo não apenas ao excesso de GH, mas também ao padrão alterado de secreção do hormônio. Isto poderia explicar a alta variabilidade no tamanho dos machos transgênicos evidenciada pelas análises de componentes principais. Assumindo a hipótese de que a alteração do padrão de secreção tenha um efeito maior nos machos do que nas fêmeas, surge a questão de porque nem todos os machos respondem da mesma forma? Sabendo-se que o GH pode ter uma ação direta sobre as gônadas estimulando a esteroidogênese, gametogênese e vitelogênese e que existe uma influência dos hormônios esteróides sobre a secreção de GH hipofisário (para revisão veja Canosa *et al.*, 2007), é provável de em alguns machos transgênicos a superexpressão do GH esteja induzindo o crescimento gonadosomático e maturação e, em outros, o crescimento somático. Neste cenário, os peixes que investem na reprodução diminuem a taxa de crescimento devido ao alto custo energético deste processo.

Entretanto, indivíduos que são afetados na sua capacidade reprodutiva podem utilizar a energia disponível para atingir maior tamanho. Esta resposta é diferente para cada indivíduo e depende da constituição genética do animal, a qual define o efeito biológico final decorrente do excesso de hormônio circulante e da alteração no padrão de secreção direcionada pela expressão constitutiva do transgene. Desta forma, é provável que os machos transgênicos de maior tamanho tenham dificuldades reprodutivas, enquanto que os menores possivelmente sejam reprodutivamente mais eficientes. De fato, dados não publicados a respeito do potencial reprodutivo de machos de *zebrafish* transgênicos da linhagem F0104 mostram uma diminuição significativa no comportamento reprodutivo e na capacidade de fertilização de desovas, sugerindo que alguns destes indivíduos podem realmente ter uma capacidade reprodutiva afetada.

Em resumo, os dados obtidos no presente estudo mostram que a superexpressão do GH promove um aumento no crescimento, o qual é sexo-independente. Os índices que medem as proporções do corpo e o estado fisiológico sugerem que o excesso de GH está induzindo uma maturação sexual precoce nos transgênicos que, provavelmente, também é sexo-independente. Finalmente, as análises de componentes principais evidenciaram um crescimento heterogêneo nos machos transgênicos que pode ser explicado pela alteração do perfil de secreção do GH associado à variabilidade genética individual na resposta ao excesso de GH circulante.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Tabajara Lucas de Almeida pelo apoio nas análises estatísticas deste estudo. Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-PROFIX, Proc. No. 540903/01-9) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de bolsa concedida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura (PPGAq) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Referências

- Benito, M., Valverde, A. M. & Lorenzo, M. (1996). IGF-I: A mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **28**, 499-510.
- Butler, A. A. & Le Roith, D. (2001). CONTROL OF GROWTH BY THE SOMATROPIC AXIS: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annual Review of Physiology* **63**, 141-164.
- Canosa, L., Chang, J. P. & Peter, R. E. (2007). Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology* **151**, 1-26.
- Casselman, S. J. & Schulte-Hostedde, A. I. (2004). Reproductive roles predict sexual dimorphism in internal and external morphology of lake whitefish, *Coregonus clupeaformis*. *Ecology of Freshwater Fish* **13**, 217-222.
- Chatakondi, N., Lovell, R. T., Duncan, P. L., Hayat, M., Chen, T. T., Powers, D. A., Weete, J. D., Cummins, K. & Dunham, R. A. (1995). Body composition of transgenic common carp, *Cyprinus carpio*, containing rainbow trout growth hormone gene. *Aquaculture* **138**, 99-109.
- Cheng, C. M. & Chen, T. T. (1995). Synergism of GH and IGF-I in stimulation of sulphate uptake by teleostean branchial cartilage *in vitro*. *Journal of Endocrinology* **147**, 67-73.
- Côté, G., Perry, G., Blier, P. & Bernatchez, L. (2007). The influence of gene-environment interactions on GHR and IGF-1 expression and their association with growth in brook charr, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *BMC Genetics* **8**:87. doi:10.1186/1471-2156-8-87
- Czerwinski, S. M., Martin, J. M. & Bechtel, P. J. (1994). Modulation of IGF mRNA abundance during stretch-induced skeletal muscle hypertrophy and regression. *Journal of Applied Physiology* **76**, 2026-2030.

- Devlin, R. H., Sundström, L. F. & Muir, W. M. (2006). Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. *Trends in Biotechnology* **24**, 89-97.
- Devlin, R. H., Biagi, C. A. & Yesak, T. Y. (2004). Growth, viability and genetic characteristics of GH transgenic coho salmon strains. *Aquaculture* **236**, 607-632.
- Devlin, R. H., Biagi, C. A., Yesaki, T. Y., Smailus, D. E. & Byatt, J. C. (2001). Growth of domesticated transgenic fish. *Nature* **409**, 781-782.
- Devlin, R. H., Swanson, P., Clarke, W. C., Plisetskaya, E., Dickhoff, W., Moriyama, S., Yesaki, T. Y. & Hewe, C. L. (2000). Seawater adaptability and hormone levels in growth-enhanced transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* **191**, 367-385.
- Devlin, R. H., Yesaki, T. Y., Donaldson, E. M., & Hew, C. L. (1995a) Transmission and phenotypic effects of an antifreeze/GH gene construct in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* **137**, 161-169.
- Devlin, R. H., Yesaki, T. Y., Donaldson, E. M., Du, S. J. & Hew, C. L. (1995b). Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**, 1376-1384.
- Devlin, R. H., Yesaki, T. Y., Biagi, C. A., Donaldson, E. M., Swanson, P. & Chan, W. K. (1994). Extraordinary salmon growth. *Nature* **371**, 209-210.
- Du, S. J., Gong, Z. Y., Fletcher, G. L., Shears, M. A., King, M. J., Idler, D. R. & Hew, C. L. (1992). Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* **10**, 176-181.

- Duan, C. & Hirano, T. (1990). Stimulation of ^{35}S -sulfate uptake by mammalian insulin-like growth factors I and II in cultured cartilages of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *The Journal of Experimental Zoology* **256**, 347-350.
- Dunham, R. A., Chatakondi, N., Nichols, A. J., Kucuktas, H., Chen, T. T., Powers, D. A., Weete, J. D., Cummins, K. & Lovell, R. T. (2002). Effect of rainbow trout growth hormone complementary DNA on body shape, carcass yield, and carcass composition of F1 and F2 transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)* **4**, 604-611.
- Ellis J. R. & Shackley S. E. (1995) Ontogenic changes and sexual dimorphism in the head, mouth and teeth of the lesser spotted dogfish. *Journal of Fish Biology* **47**,155 – 164.
- Eppler, E., Caelers, A., Shved, N., Hwang, G., Rahman, A. M., Maclean, N., Zapf, J. & Reinecke, M. (2007). Insulin-like growth factor I (IGF-I) in a growth-enhanced transgenic (GH-overexpressing) bony fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*): indication for a higher impact of autocrine/paracrine than of endocrine IGF-I. *Transgenic Research* **16**, 479-489.
- Fauconneau, B., Alami-Durante, H., Laroche, M., Marcel, J. & Vallo, D. (1995). Growth and meat quality relations in carp. *Aquaculture* **129**, 265-297.
- Figueiredo, M. A., Lanes, C. F. C., Almeida, D. V. & Marins, L. F. (2007a). Improving the production of transgenic fish germlines: *in vivo* evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. *Genetics and Molecular Biology* **30**, 31-36.
- Figueiredo, M. A., Lanes, C. F. C., Almeida, D. V., Proietti, M. C. & Marins, L. F. (2007b). The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* **2**, 228-233.

- Fletcher, D. E. (1999). Male ontogeny and size-related variation in mass allocation of bluenose tright shiners (*Pteronotropis welaka*). *Copeia* **2**, 479-486.
- Florini, J. R., Ewton, D. Z. & Coolican, S. A. (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocrine Reviews* **17**, 481-517.
- Godø, O. R. & Haug, T. (1999). Growth Rate and Sexual Maturity in Cod (*Gadus morhua*) and Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science* **25**, 115–123.
- Gomez, J. M., Boujard, T., Fostier, A. & Le Bail, P. Y. (1996). Characterization of growth hormone nycthemeral plasma profiles in catheterized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Zoology* **274**, 171-180.
- Goto, A. (1984). Sexual dimorphism in a river sculpin *Cottus hangiongensis*. *Japanese Journal of Ichthyology* **31**, 161-166.
- Gramitto, M. E. & Coen, B. (1997). New records of *Bellottia apoda* (Bythitidae) in the Adriatic Sea with notes on morphology and biology. *Cybium* **21**, 163-172.
- Holloway, A. C., Melroe, G. T., Ehrman, M. M., Reddy, P. K., Leatherland, J. F. & Sheridan, M. A. (2000). Effect of 17beta-estradiol on the expression of somatostatin genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The American Journal of Physiology* **279**, R389–R393.
- Ihle, J. N. (1996). STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription. *Cell* **84**, 331-334.
- Imsland, A. K., Folkvord, A., Grung, G. L., Stefansson, S. O. & Taranger, G. L. (1997). Sexual dimorphism in growth and maturation of turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque, 1810). *Aquaculture Research* **28**, 101-114.
- Jansson, J. O., Edén, S. & Isaksson, O. (1985). Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocrine reviews* **6**,128-150.

- Kajimura, S., Uchida, K., Yada, T., Riley, L. G., Byatt, J. C., Collier, R. J., Ainda, K., Hirano, T. & Grau, E. G. (2001). Stimulation of insulin-like growth factor-I production by recombinant bovine growth hormone in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiology and Biochemistry* **25**, 221-230.
- Kakizawa, S., Kaneko, T., Ogasawara, T. & Hirano, T. (1995). Changes in plasma somatolactin levels during spawning migration of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Fish Physiology and Biochemistry* **14**, 93–101.
- Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology* **10**, 121–173.
- Le Roith, D., Scavo, L. & Buttle, A., (2001). What is the role of circulating IGF-I? *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* **12**, 48-52.
- Li, D., Hu, W., Wang, Y., Zhu, Z. & Fu, C. (2009) Reduced swimming abilities in fast-growing transgenic common carp *Cyprinus carpio* associated with their morphological variations. *Journal of Fish Biology* **74**, 186–197.
- Libanati, C., Baylink, D. J., Lois-Wenzel, E., Srinivasan, N. & Mohan, S. (1999). Studies on the potential mediators of skeletal changes occurring during puberty in girls. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **84**, 2807-2814.
- Lupu, F., Terwilliger, J. D., Lee, K., Segre, G. V. & Efstratiadis, A. (2001). Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Developmental Biology* **229**, 141-162.
- Marchant, T. A. & Peter, R. E. (1986). Seasonal variations in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. *The Journal of Experimental Zoology* **237**, 231–239.

- Marins, L. F., Iyengar, A., Maclean, N., Levy, J. A. & Sohm, F. (2002). Simultaneous overexpression of GH and STAT5b genes inhibits the STAT5 signalling pathway in tilapia (*Oreochromis niloticus*) embryos. *Genetics and Molecular Biology* **23**, 293–298.
- McMillan, P. J. (1999). New grenadier fishes of the genus *Coryphaenoides* (Pisces; Macrouridae), one from off New Zealand and one widespread in the southern Indo West pacific and Atlantic Oceans. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **33**, 481-489.
- Mercure, F., Holloway, A. C., Tocher, D. R., Sheridan, M. A., Van der Kraak, G. & Leatherland, J. F. (2001). Influence of plasma lipid changes in response to 17 beta-oestradiol stimulation on plasma growth hormone, somatostatin, and thyroid hormone levels in immature rainbow trout. *Journal of Fish Biology* **59**, 605–615.
- Moriyama, S., Ayson, F. G. & Kawauchi, H. (2000). Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **64**, 1553-1562.
- Nam, Y. K., Maclean, N., Hwang, G. & Kim, D. S. (2008). Autotransgenic and allotransgenic manipulation of growth traits in fish for aquaculture: a review. *Journal of Fish Biology* **72**, 1-26.
- Nam, Y. K., Cho, Y. S., Cho, H. J. & Kim, D. S. (2002). Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *Aquaculture* **209**, 257-270.
- Nam, Y. K., Noh, J. K., Cho, Y. S., Cho, H. J., Cho K. N., Kim, C. G. & Kim, D. S. (2001). Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Research* **10**, 353–362.
- Nordgarden, U., Fjellidal, P. G., Hansen, T., Björnsson, B. T. & Wargelius, A. (2006). Growth hormone and insulin-like growth factor-I act together and independently when regulating

- growth in vertebral and muscle tissue of atlantic salmon postsmolts. *General and Comparative Endocrinology* **149**, 253–260.
- Ostenfeld, T. H., McLean, E. & Devlin, R. H. (1998). Transgenesis changes body and head shape in Pacific salmon. *Journal of Fish Biology* **52**, 850–854.
- R Development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rabinovsky, E. D., Gelir, E., Gelir, S., Lui, H., Kattash, M., Demayo, F. J., Shenaq, S. M. & Schwartz, R. J. (2003). Targeted expression of IGF-1 transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 53-55.
- Rahman, M. A., Ronyai, A., Engidaw, B. Z., Jauncey, K., Hwang, G. L., Smith, A., Roderick, E., Penman, D., Varadi, L. & Maclean, N. (2001). Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. *Journal of Fish Biology* **59**, 62-78.
- Rahman, M. A., Mak, R., Ayad, H., Smith, A. & Maclean, N. (1998). Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Research* **7**, 357-369.
- Reddy, P. K. & Leatherland, J. F. (1995). Influence of combination of time of feeding and ration levels on the diurnal hormone rhythms in rainbow trout. *Fish Physiology and Biochemistry* **14**, 25–36.
- Reinecke, M., Björnsson, B. T., Dickhoff, W. W., McCormick, S. D., Navarro I., Power D. M. & Gutiérrez J. (2005). Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *General and Comparative Endocrinology* **42**, 20-24.

- Richman, C., Kutilek, S., Miyakoshi, N., Srivastava, A. K., Beamer, W. G., Donahue, L. R., Rosen, C. J., Wergedal, J. E., Baylink, D. J. & Mohan, S. (2001). Postnatal and pubertal skeletal changes contribute predominantly to the differences in peak bone density between C3H/HeJ and C57BL/6J mice. *Journal of Bone and Mineral Research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **16**, 386-397.
- Riley, L. G., Hirano, T. & Grau, E. G. (2002). Disparate effects of gonadal steroid hormones on plasma and liver mRNA levels of insulin-like growth factor-I and vitellogenin in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiology and Biochemistry* **26**, 223–230.
- Rosa, C. E., Figueiredo, M. A., Lanes, C. F. C., Almeida, D.V., Monserrat, J.M. & Marins, L.F. (2008). Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **149**, 209-214.
- Schindler, C. & Darnell, Jr, J. E. (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annual Review of Biochemistry* **64**, 621-651.
- Sheridan, M. A. (1994). Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. Biochemistry & Molecular Biology* **107**, 495-508.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1995). Biometry. The principles and practice of statistics in biological research (3rd ed.), pp.887. New York: W. H. Freeman.
- Sotiropoulos, A., Ohanna, M., Kedzia, C., Menon, R. K., Kopchick, J. J., Kelly, P. A. & Pende, M. (2006). Growth hormone promotes skeletal muscle cell fusion independent of insulin-like growth factor 1 up-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7315–7320.

- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **83**, 13-34.
- Spence, R., Fatema, M. K., Ellis, S., Ahmed, Z. F. & Smith, C. (2007). The diet, growth and recruitment of wild zebrafish (*Danio rerio*) in Bangladesh. *Journal of Fish Biology* **71**, 304–309.
- Stewart, C. E. & Rotwein, P. (1996). Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiological Reviews* **76**, 1005-1026.
- Studzinski, A. L., Almeida, D. V., Lanes, C. F., Figueiredo, M. A. & Marins, L. F. (2009). SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the somatotrophic axis in liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *General and Comparative Endocrinology* **161**, 67-72.
- Takagi, Y. & Björnsson, B. T. (1997). Cortisol Inhibits Glycosaminoglycan Synthesis in Cultured Rainbow Trout Cartilage. *General and Comparative Endocrinology* **108**, 80-86.
- Takagi, Y. & Björnsson, B. T. (1996). Regulation of cartilage glycosaminoglycan synthesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by 3,3',5-tri-iodo-L-thyronine and IGF-I. *Journal of Endocrinology* **149**, 357-365.
- Uchida, K., Kajimura, S., Riley, L. G., Hirano, T., Aida, K. & Grau, E. G. (2003). Effects of fasting on growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **134**, 429-433.
- von Hofsten, J. & Olsson, P. E. (2005). Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. *Reproductive Biology and Endocrinology* **3**:63. doi:10.1186/1477-7827-3-63

- Wargelius, A., Fjellidal, P. G., Benedet, S., Hansen, T., Björnsson, B. T. & Nordgarden, U. (2005). A peak in gh-receptor expression is associated with growth activation in Atlantic salmon vertebrae, while upregulation of igf-I receptor expression is related to increased bone density. *General and Comparative Endocrinology* **142**, 163–168.
- Waters, M. J., Hoang, H. N., Fairlie, D. P., Pelekanos, R. A. & Brown, R. J. (2006). New insights into growth hormone action. *Journal of Molecular Endocrinology* **36**, 1-7.
- Westerfield, M., (1995). *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish Danio rerio*, third ed. University of Oregon Press, Eugene, OR, USA.
- Wood, A. W., Duan, C. & Bern, H. A. (2005). Insulin-like growth factor signaling in fish. *International Review of Cytology*. **243**, 215-285.
- Yakar, S., Liu, J., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., & Le Roith, D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 7324–7329.
- Zaboukas, N., Miliou, H., Megalofonou, P. & Moraitou-Apostolopoulou, M. (2006) Biochemical composition of the Atlantic bonito *Sarda sarda* from the Aegean Sea (eastern Mediterranean Sea) in different stages of sexual maturity. *Journal of Fish Biology*. **69**, 347–362.
- Zbikowska, H. M. (2003). Fish can be first – advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Research* **12**, 379-389.
- Zhang, W. M., Lin, H. R. & Peter, R. E. (1994) Episodic growth hormone secretion in the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* (C. & V.). *General and Comparative Endocrinology* **95**, 337–341.
- Zhang, P. J., Hayat, M., Joyce, C., Gonzalez-Villaseñor, L. I., Lin C. M., Dunham, R. A., Chen, T. T. & Powers, D. A. (1990). Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-

rainbow trout-GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Molecular Reproduction and Development* **25**, 3-13.

Tabela I – Médias do comprimento padrão (L_s), altura do corpo (H_b), comprimento da cabeça (L_h) e peso total (W_T) de *zebrafish* (*Danio rerio*), comparando transgênicos (T) e não transgênicos (NT).

		Meses					
		1	2	3	4	5	6
L_s (cm)	T	1,10±0,02 ^a	1,57±0,03 ^a	2,18±0,04 ^a	2,62±0,05 ^a	2,96±0,05 ^a	3,38±0,05 ^a
	NT	1,02±0,02 ^b	1,39±0,02 ^b	1,86±0,03 ^b	2,22±0,03 ^b	2,47±0,02 ^b	2,79±0,02 ^b
H_b (cm)	T	0,25±0,01 ^a	0,36±0,01 ^a	0,56±0,01 ^a	0,66±0,02 ^a	0,71±0,02 ^a	0,80±0,02 ^a
	NT	0,22±0,01 ^b	0,33±0,01 ^b	0,48±0,01 ^b	0,59±0,01 ^b	0,64±0,02 ^b	0,74±0,02 ^b
L_h (cm)	T	0,28±0,01 ^a	0,38±0,01 ^a	0,54±0,01 ^a	0,58±0,01 ^a	0,68±0,01 ^a	0,78±0,01 ^a
	NT	0,26±0,01 ^b	0,35±0,01 ^b	0,46±0,01 ^b	0,54±0,01 ^b	0,55±0,01 ^b	0,65±0,01 ^b
W_T (mg)	T	19,37±1,15 ^a	68,33±3,85 ^a	189,38±12,50 ^a	297,72±18,49 ^a	413,40±23,38 ^a	608,05±27,31 ^a
	NT	14,63±0,82 ^b	49,72±2,48 ^b	119,00±6,97 ^b	241,50±12,28 ^b	281,13±13,08 ^b	428,17±18,26 ^b
n	T	71	62	52	51	51	54
	NT	81	77	65	54	50	46

Letras sobrescritas diferentes indicam as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no mesmo mês e para cada variável ($P < 0,05$).

Tabela II – Médias do comprimento padrão (L_s), altura do corpo (H_b), comprimento da cabeça (L_h) e peso total (W_T) de *zebrafish* (*Danio rerio*), comparando transgênicos e não transgênicos e considerando o sexo.

		<i>Meses</i>		
		4	5	6
L_s (cm)	TF	2,70±0,11 ^a	3,11±0,11 ^a	3,57±0,07 ^a
	NTF	2,28±0,06 ^b	2,51±0,06 ^b	2,82±0,06 ^b
	TM	2,59±0,04 ^a	2,90±0,04 ^a	3,32±0,04 ^a
	NTM	2,17±0,03 ^b	2,45±0,03 ^b	2,77±0,03 ^b
H_b (cm)	TF	0,72±0,03 ^a	0,79±0,04 ^a	0,94±0,02 ^a
	NTF	0,67±0,02 ^{ab}	0,73±0,02 ^{ab}	0,83±0,01 ^b
	TM	0,63±0,02 ^b	0,68±0,02 ^b	0,75±0,02 ^c
	NTM	0,53±0,01 ^c	0,58±0,01 ^c	0,66±0,01 ^d
L_h (cm)	TF	0,59±0,02 ^a	0,71±0,02 ^a	0,81±0,01 ^a
	NTF	0,55±0,01 ^b	0,57±0,01 ^b	0,68±0,01 ^b
	TM	0,58±0,01 ^a	0,67±0,01 ^a	0,78±0,01 ^a
	NTM	0,53±0,01 ^b	0,54±0,01 ^b	0,65±0,01 ^b
W_T (mg)	TF	371,56±42,32 ^a	512,44±51,42 ^a	786,80±44,17 ^a
	NTF	293,77±17,37 ^b	339,05±24,00 ^b	513,39±27,44 ^b
	TM	266,95±19,86 ^b	379,53±22,73 ^b	545,49±27,78 ^b
	NTM	199,70±10,48 ^c	239,19± 9,96 ^c	353,17±10,34 ^c
<i>n</i>	TF	15	13	14
	NTF	24	21	22
	TM	36	38	40
	NTM	30	29	25

(TF) fêmeas transgênicas; (NTF) fêmeas não transgênicas; (TM) machos transgênicos; (NTM) machos não transgênicos. Letras sobrescritas diferentes indicam as diferenças estisticamente significativas entre os grupos no mesmo mês e para cada variável ($P < 0,05$).



Fig. 1 – Medidas utilizadas nas análises morfométricas de *zebrafish* (*Danio rerio*). Comprimento padrão (L_s): comprimento da margem anterior da cabeça até a margem posterior do corpo (inserção da nadadeira caudal); Altura do corpo (H_b): distância vertical máxima perpendicular ao eixo do corpo; Comprimento da cabeça (L_h): Distância linear da margem anterior da cabeça até a margem posterior da membrana do opérculo.

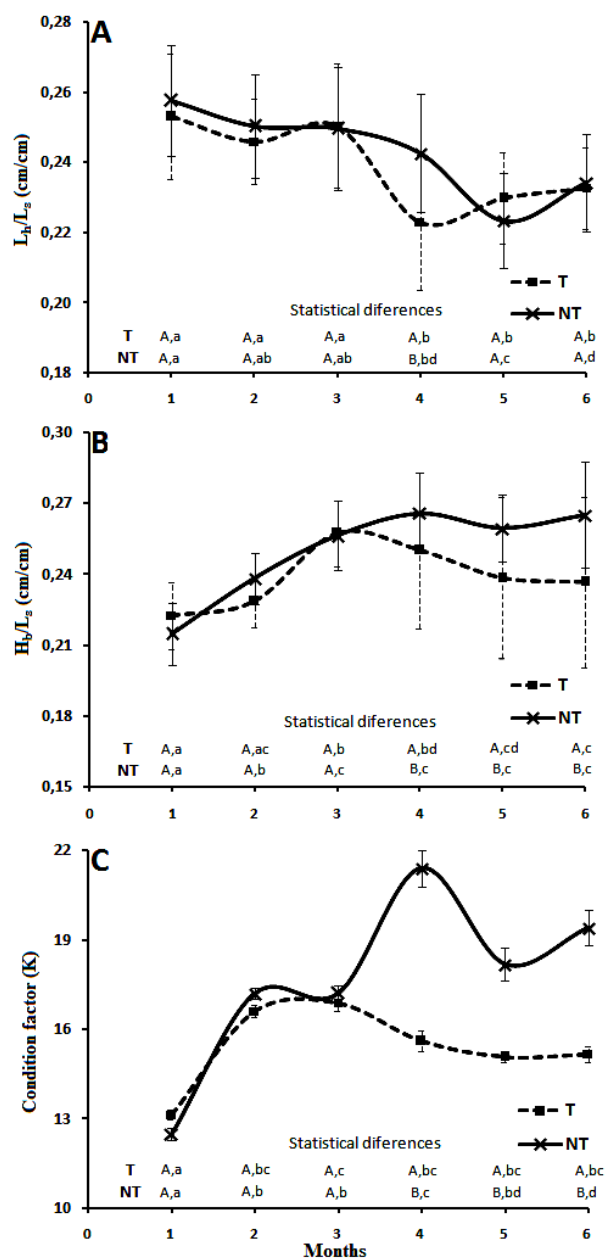


Fig. 2 – Índices morfométricos e fator de condição comparando *zebrafish* (*Danio rerio*) transgênicos (T) e não transgênicos (NT) ao longo do tempo. (A) comprimento da cabeça (L_h) em relação ao comprimento padrão (L_s). (B) altura do corpo (H_b) em relação a L_s . (C) fator de condição (K). As letras sobscritas maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos no mesmo mês ($P < 0,05$), enquanto que as letras minúsculas representam diferenças significativas do mesmo grupo entre os meses ($P < 0,05$).

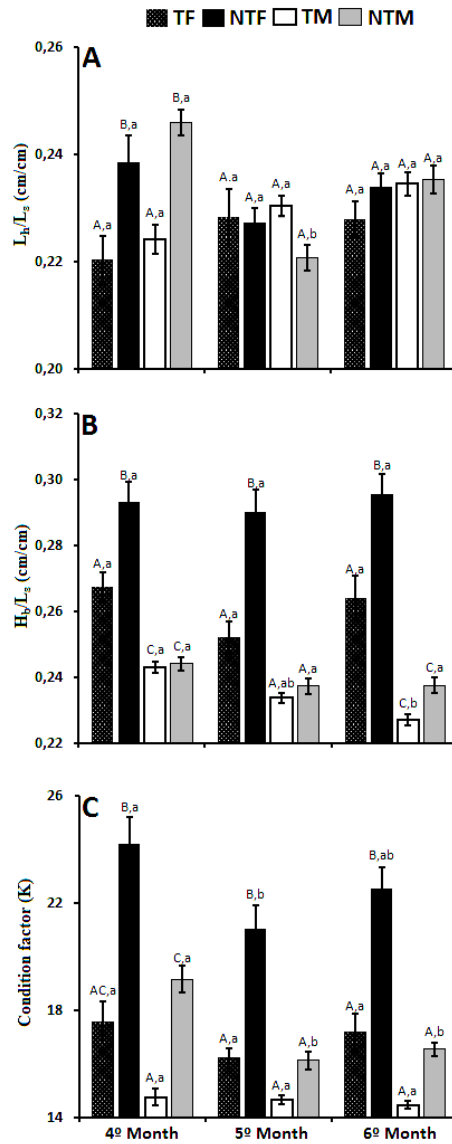


Fig. 3 – Índices morfométricos e fator de condição comparando *zebrafish* (*Danio rerio*) transgênicos e não transgênicos ao longo do tempo, considerando o sexo. TF: fêmeas transgênicas; TM: machos transgênicos; NTF: fêmeas não transgênicas; NTM: machos não transgênicos. (A) comprimento da cabeça (L_h) em relação ao comprimento padrão (L_s). (B) altura do corpo (H_b) em relação a L_s . (C) fator de condição (K). As letras sobrescritas maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos no mesmo mês ($P < 0,05$), enquanto que as letras minúsculas representam diferenças significativas do mesmo grupo entre os meses ($P < 0,05$).

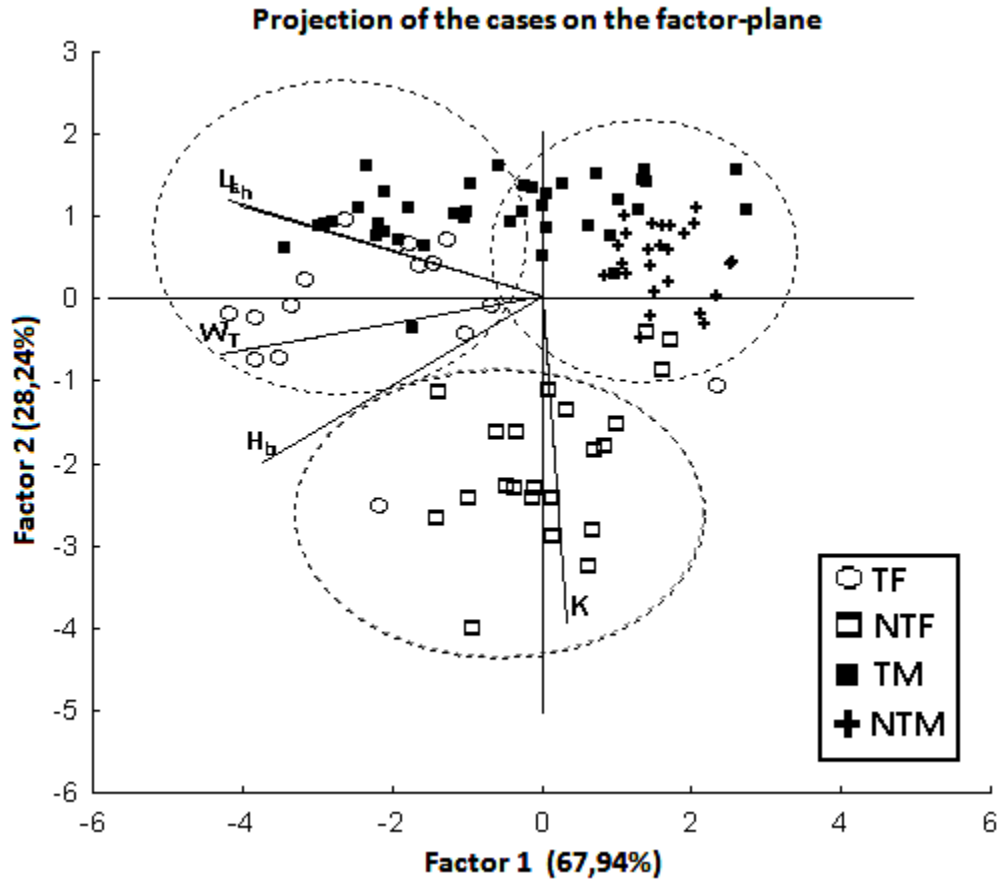


Fig. 4 – Projeção dos casos sobre o plano de fatores da análise de componentes principais (PCA) de *zebrafish* (*Danio rerio*) com seis meses de idade. TF: fêmeas transgênicas; TM: machos transgênicos; NTF: fêmeas não transgênicas; NTM: machos não transgênicos. L_s : comprimento padrão, L_h : comprimento da cabeça, H_b : altura do corpo, W_T : peso total e K : fator de condição.

Capítulo II

Crescimento muscular hipertrófico independente da indução de IGF-I local em um modelo de peixe transgênico (*Danio rerio*) para o hormônio do crescimento (GH)

Co-autores: Márcio Azevedo Figueiredo, Carlos Frederico Ceccon Lanes, Carlos Eduardo da Rosa, Daniela Volcan Almeida, Rodrigo Maggioni, Maeli Dal Pai Silva e Luis Fernando Marins

Segundo normas da revista "Journal of Experimental Biology"

Crescimento muscular hipertrófico independente da indução de IGF-I local em um modelo de peixe transgênico (*Danio rerio*) para o hormônio do crescimento (GH)

R. Y. Kuradomi¹, M. A. Figueiredo¹, C. F. C. Lanes², C. E. Rosa³, D. V. Almeida³, R. Maggioni⁴, M. Dal Pai Silva⁵, e L. F. Marins^{1,3,6*}

¹Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande -FURG, Rio Grande, RS - Brasil.

²Faculty of Biosciences and Aquaculture, Bodø University College, NO-8049 Bodø, Norway.

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS - Brasil.

⁴Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza, CE - Brasil

⁵Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP - Brasil.

⁶Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS - Brasil.

*Autor para correspondência: L. F. Marins. Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Itália, Km 8, CEP 96201-900, Rio Grande, RS - Brasil. Tel.: +55 53 3233 6851; Fax: +55 53 3233 6848. E-mail: dqmluf@furg.br

Resumo

O objetivo do presente estudo foi analisar a morfologia do tecido muscular esquelético branco e a expressão de genes relacionados ao eixo somatotrófico e a miogênese em machos e fêmeas de *zebrafish* (*Danio rerio*) transgênicos para o hormônio do crescimento (GH). As análises histológicas demonstraram que os transgênicos apresentam uma hipertrofia muscular acentuada quando comparados com os não transgênicos, sendo as fêmeas transgênicas mais hipertróficas do que os machos transgênicos. A expressão dos genes relacionados com o crescimento muscular mostrou que a hipertrofia muscular observada nos transgênicos é independente do fator de crescimento tipo insulina I (IGF-I). Adicionalmente, nos machos transgênicos foi observada uma indução significativa na expressão da *miogenina*, indicando que esta proteína pode estar mediando, pelo menos em parte, o crescimento hipertrófico neste grupo. A expressão gênica mostrou, também, uma indução da α -actina somente em machos, independentemente da transgenia. Entretanto, não foi observada alteração no teor de proteínas totais de músculo. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a hipertrofia observada nos *zebrafish* transgênicos é independente de IGF-I muscular e, provavelmente, resultado do efeito direto do excesso de GH e/ou IGF-I circulante. O modelo de *zebrafish* aqui utilizado mostrou-se uma ferramenta interessante para estudos da ação do GH em peixes que apresentem crescimento limitado.

Palavras-chave: *zebrafish* transgênico, hormônio do crescimento, músculo esquelético, hipertrofia, fatores miogênicos,

Summary

The aim of the present study was to analyse the morphology of white skeletal muscle in males and females from the GH-transgenic zebrafish lineage F0104, comparing with the expression of genes related to the somatotrophic axis and myogenesis. Histological analysis demonstrated that transgenic presented an enhanced muscle hypertrophy when compared to non-transgenic, being transgenic females more hypertrophic than transgenic males. The expression of genes related to muscle growth revealed that transgenic hypertrophy is independent from insulin-like growth factor I (IGF-I). In addition, transgenic males had a significantly *myogenin* gene expression induction indicating that, at least partially, this protein may be mediating hypertrophic growth in this group. It was also shown an induction in males of the α -*actin* gene independently from transgenesis. However, there were no differences in total protein content from the muscle. The results obtained in the present study demonstrated that transgenic hypertrophy is independent from muscle IGF-I and, probably, a direct effect of excess circulating GH and/or IGF-I. The zebrafish model used here can be considered an interesting tool for the study of fishes with limited growth.

Keywords: transgenic zebrafish, growth hormone, skeletal muscle, hypertrophy, myogenic factors.

Introdução

O hormônio de crescimento (GH) é um hormônio pluripotente produzido pela glândula pituitária de vertebrados, cuja principal função é o crescimento somático. A ação do GH é realizada a partir da sua ligação com receptores transmembrânicos específicos (GHR) presentes em tecidos-alvo (Reinecke et al., 2005). Esta ligação acarreta na ativação de uma cascata de sinalização intracelular que culmina com a transcrição de genes específicos envolvidos no desenvolvimento das respostas biológicas ao GH (Schindler e Darnell Jr., 1995; Ihle, 1996; Waters et al., 2006). Desta forma, as respostas biológicas do GH são desenvolvidas e controladas principalmente pelo denominado “eixo somatotrófico”, onde o Fator de Crescimento tipo Insulina I (IGF-I) é o principal mediador da ação fisiológica do GH (Moriyama et al., 2000; Butler e Le Roith, 2001).

O IGF-I exerce sua função na integração entre a regulação tecido-específica e outros eventos biológicos através da ligação com seus receptores específicos (IGF-IR) presentes nas células-alvo (Moriyama et al., 2000; Wood et al., 2005). Em peixes e em outros vertebrados, o fígado é o principal sítio produtor do IGF-I (Yakar et al., 1999; Reinecke et al., 2005; Wood et al., 2005), sendo demonstrada a existência de uma correlação positiva entre a concentração de IGF-I plasmático e a taxa de crescimento (Kajimura *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 2003). Entretanto, a expressão do gene *IGF-I* pode ocorrer em outros tecidos, exercendo um papel autócrino e parácrino (para uma revisão ler: Wood et al., 2005), o qual também parece ter importante efeito sobre o crescimento (Yakar et al., 1999; Butler e Le Roith, 2001, Nordgarden et al., 2006; Eppler et al., 2007).

No músculo esquelético, o GH pode atuar sobre o crescimento muscular de forma independente do IGF-I (Nordgarden et al., 2006; Sotiropoulos et al., 2006). No entanto, o IGF-I também atua na formação, manutenção e regeneração deste tecido (Stewart e Rotwein, 1996; Benito et al., 1996; Le Roith et al., 2001; Rabinovsky et al., 2003), participando na proliferação de mioblastos, diferenciação miogênica e na hipertrofia muscular (Czerwinski et al., 1994; Florini et al., 1996; Le Roith et al., 2001), sugerindo que o GH e o IGF-I devem atuar em sinergismo no processo do crescimento muscular esquelético. O crescimento da musculatura esquelética em peixes se faz pela proliferação e diferenciação das células progenitoras miogênicas também conhecidas como mioblastos adultos ou células mio-satélites, responsáveis pelo crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Koumans e Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowleron e Veggetti, 2001; Johansen e Overturf, 2005). A hiperplasia e a hipertrofia são reguladas por fatores reguladores miogênicos (MRFs) que incluem a família MyoD, Myf5, miogenina, e MRF4 (Watabe, 1999; 2001). Os MRFs

possuem um domínio central conservado conhecido como *E-box*, o qual é importante para que os MRFs reconheçam uma seqüência no DNA presente na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos (Lassar et al., 1989; Murre et al., 1989; Blackwell e Weintraub, 1990). O crescimento muscular, tanto em mamíferos quanto em peixes, parece ser controlado pela miostatina (MSTN), a qual pertence à família TGF- β (*transforming growth factor* β) e é reconhecida como um potente controlador do crescimento muscular (McPherron et al., 1997; Acosta et al., 2005).

O gene do GH tem sido empregado para a manipulação genética em peixes com o objetivo do aumento do crescimento para a aquicultura (Devlin et al., 2006). De fato, a superexpressão deste hormônio geralmente proporciona um aumento significativo no crescimento (Du et al., 1992, Rahman et al., 1998; Nam et al., 2001; Devlin et al., 2004; Figueiredo et al. 2007a; 2007b). Entretanto, este crescimento acelerado induzido tanto pela administração GH quanto pela superexpressão do gene, pode alterar a estrutura do tecido muscular esquelético aumentando a proporção de fibras de menor diâmetro como demonstrado em truta arco-íris, salmão coho e Arctic char (Weatherly e Gill, 1982; Fauconneau et al., 1997; Hill et al., 2000; Pitkänen et al., 2001).

Embora existam várias linhagens de peixes transgênicos para o GH, ao nosso conhecimento não existem estudos relacionando o efeito da superexpressão do GH, a estrutura do tecido muscular e a expressão sexo-específica de genes que codificam para proteínas do eixo somatotrófico e miogênese. O perfil sexo-dependente de secreção de GH hipofisário já foi reportado em mamíferos (Jansson et al., 1985; Canosa et al., 2007), porém em peixes este padrão ainda não foi verificado. Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma linhagem geneticamente modificada de *Danio rerio* (linhagem F0104) superexpressando o gene do GH que pode ser utilizada como um modelo para estudos de crescimento muscular (Figueiredo et al., 2007a). Diferentes genótipos desta linhagem têm sido estudados para o crescimento e expressão de genes relacionados ao crescimento (Figueiredo et al., 2007b), metabolismo e produção de espécies reativas de oxigênio (Rosa et al., 2008) e mecanismos de controle da sinalização intracelular do eixo somatotrófico (Studzinski et al., 2009). Assim, o objetivo do presente estudo foi relacionar a morfologia do tecido muscular esquelético branco com a expressão dos genes relacionados ao eixo somatotrófico e a miogênese em adultos da linhagem transgênica F0104, avaliando o efeito do sexo.

Material e Métodos

Peixes transgênicos

Os peixes transgênicos e não transgênicos (controles) foram obtidos a partir do cruzamento entre fêmeas não transgênicas com machos transgênicos hemizigotos da linhagem F0104, segundo o procedimento descrito por Figueiredo et al. (2007a). Essa linhagem foi produzida através da co-injeção dos transgenes $c\beta/msGH$ e $c\beta A/GFP$, estando ambos transgenes com a expressão direcionada pelo promotor da β -actina da carpa (*Cyprinus carpio*), porém associados ao cDNA do GH do peixe-rei marinho (*Odontesthes argentinensis*) (Marins et al., 2002) e ao gene da proteína verde fluorescente (GFP). A GFP foi utilizada como um marcador de transgenia, possibilitando a identificação dos transgênicos pela análise da fluorescência (excitação = 485 nm; emissão = 520 nm).

Experimentos de crescimento

Todos os peixes transgênicos e não transgênicos foram criados até sete meses de idade em um sistema equipado com filtro biológico. Cada grupo (fêmeas transgênicas – TF, machos transgênicos – TM, fêmeas não transgênicas – NTF e machos não transgênicos - NTM) foi mantido em uma densidade média de um peixe por litro de água. A qualidade da água foi monitorada pelo menos uma vez por semana, sendo temperatura, pH, compostos nitrogenados e fotoperíodo mantidos em níveis adequados para o *zebrafish* (Westerfield, 1995). Os peixes foram alimentados com ração comercial com alto teor de proteína bruta (47,5%), duas vezes ao dia *ad libidum*. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados (Tricaína, 0.1 mg mL⁻¹) e fotografados utilizando câmera digital. De cada imagem digitalizada foi tomada a medida de comprimento padrão (L_s) utilizando o *software* livre IMAGE J (*E.U. National Institute of Health*, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Extração do RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi isolado de tecido muscular branco de seis indivíduos de cada grupo utilizando *TRI Reagent Solution*[®] (Applied Biosystems, Brasil), seguindo os métodos e as instruções do fabricante. O RNA total foi tratado com o kit *RNAse free DNase I* (Applied Biosystems, Brasil), e quantificado em fluorímetro (*Qubit*[®], Invitrogen, Brasil) utilizando o kit *Quant iT[®]-RNA Assay* (Invitrogen, Brasil). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA complementar (cDNA) foi confeccionado com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Brasil), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante.

Expressão Gênica

A expressão gênica foi analisada quantitativamente através de PCR em tempo Real (qRT-PCR). Cada amostra (n = 4) foi analisada em triplicata. Os *primers* gene-específicos (Tabela 1) foram desenhados utilizando o programa *Primer Express*[®] 2.0 (Applied Biosystems, Brasil), com base em sequências disponíveis no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov). As PCRs foram realizadas com o equipamento *7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Brasil) usando o kit *SYBR green PCR Master Mix*[®] (Applied Biosystems, Brasil). Um décimo de cDNA foi utilizado para cada PCR em um volume final de 20µL. PCRs com diluições seriadas de cDNA foram realizadas com todos os *primers* para testar a eficiência da reação. As condições da reação de PCR foram as seguintes: 50°C por 3 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. A curva de dissociação foi realizada a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min e 95°C por 15 s. A expressão dos genes-alvo (receptor do hormônio do crescimento - *GHR*, fator de crescimento tipo insulina I - *IGF-I*, proteína de determinação miogênica - *MyoD*, miogenina - *MYOG*, miostatina - *MSTN*, subunidade beta do fator eucariótico de início da síntese protéica 2 - *eIF2β*, miosina de cadeia pesada 4 - *MHC4* e α -actina - *ACTA1*) foi normalizada utilizando o gene *EF1 α* (Fator de alongação 1 Alfa). A expressão de *EF1 α* não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais utilizados (dados não mostrados).

Quantificação da proteína total

Para a quantificação de proteína total, seis amostras de tecido muscular de cada grupo foram pesados (aproximadamente 12 mg) e, posteriormente, solubilizados em tampão (Tris-HCl 100mM; EDTA 2mM; MgCl₂ + 6H₂O 5mM, pH 7,75) em uma proporção um mg de tecido para nove µL de tampão. O material homogeneizado foi centrifugado por 15 min a 1257 rad.s⁻¹ a 4°C e o sobrenadante foi conservado em gelo. Uma alíquota de 1 µL do sobrenadante foi utilizado para medir o teor de proteína total em fluorímetro (*Qubit*[®], Invitrogen, Brasil) usando o kit *Quant-iT*[®] *Protein Assay* (Invitrogen, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Os valores obtidos foram normalizados pelo peso da amostra e utilizados nas análises em miligramas de proteína por grama de tecido muscular (mg g⁻¹).

Análises histológicas

Seis exemplares adultos de *Danio rerio* com sete meses de idade foram anestesiados (Tricaína, 0,1 mg mL⁻¹) e eutanasiados em gelo para a coleta das amostras de tecido muscular. As amostras foram imediatamente fixadas em Karnovsky (2,5% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 0.1 M tampão fosfato, pH 7,2) e conservadas em álcool a 70%. Em seguida, as amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (80%, 95% e 100%) e incluídas em resina (Historesin[®] - *Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha*), seguindo o protocolo do fabricante. Cortes histológicos (2 µm) transversais das fibras musculares foram obtidos em micrótomo com lâmina de vidro e submetidos a coloração HE (Hematoxilina-Eosina). As lâminas permanentes foram observadas em microscópio ótico (400X) acoplado com câmera digital, sendo documentadas digitalmente. Das imagens digitalizadas foram medidos o menor diâmetro (µm) de, no mínimo, 100 fibras musculares brancas de cada animal. As medidas foram tomadas utilizando o *software* livre IMAGE J.

Análises Estatísticas

Para a comparação das médias de L_s (comprimento padrão) e P_T (proteína total) entre transgênicos e não transgênicos foi utilizado teste t de Student, enquanto que na comparação entre os grupos TF, TM, NTF e NTM, foi utilizada análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey HSD com nível de significância de 5% (P<0,05) (Sokal e Rohlf, 1995). As proporções das fibras musculares foram analisadas estatisticamente através de tabela r × c, com nível de significância de 5%. Caso encontrado diferença significativa, foi aplicado o procedimento de Marascuillo para comparações de múltiplas proporções (National Institute of Statistics – NIST, www.itl.nist.gov/div898/handbook). Para análise da expressão gênica foi aplicado método de quantificação relativa utilizando o *software* REST[®] (Pfaffl *et al.*, 2002), onde foram feitas comparações pareadas entre T X NT, TF X NTF, TM X NTM, TM X TF e NTM X NTF. A amostra de referência em cada comparação foi sempre o não transgênico ou a fêmea.

Resultados

O grupo dos transgênicos apresentou maior comprimento padrão (3,40 ± 0,35 cm; n=20) em relação aos não transgênicos (2,82 ± 0,19 cm; n=20). Na comparação entre sexos no mesmo grupo, as fêmeas transgênicas (3,56 ± 0,32 cm; n=10) foram significativamente maiores do que os machos transgênicos (3,22 ± 0,30 cm; n=10). Entretanto, no grupo dos não

transgênicos, as fêmeas ($2,93 \pm 0,18$ cm; $n=10$) não diferiram significativamente dos machos ($2,72 \pm 0,13$ cm; $n=10$). Já na comparação entre animais do mesmo sexo, tanto as fêmeas quanto os machos transgênicos foram significativamente maiores que os seus respectivos pares não transgênicos.

Nas análises das fibras musculares, a frequência de distribuição das diferentes classes de diâmetro mostrou perfis significativamente diferentes na comparação entre transgênicos e não transgênicos, sendo que o diâmetro de $40 \mu\text{m}$ melhor distinguiu os dois grupos (Fig. 1). Utilizando esta informação, no presente estudo foram consideradas fibras finas aquelas em que o diâmetro foi $\leq 40 \mu\text{m}$ e fibras grossas $>40 \mu\text{m}$. A Fig. 2 mostra que o percentual relativo de fibras grossas foi significativamente maior nos transgênicos (75%) em relação aos não transgênicos (39%). Na comparação levando em consideração o sexo (Fig. 3), o perfil de distribuição das classes de diâmetro não foi diferente entre machos e fêmeas não transgênicas, enquanto que entre os transgênicos o perfil foi diferente. A análise do percentual de fibras grossas e finas entre machos e fêmeas de ambos os grupos (Fig. 4) evidenciou uma grande similaridade entre os não transgênicos, enquanto que entre os transgênicos as fêmeas apresentaram tanto uma diminuição significativa do percentual relativo de fibras finas, quanto um aumento no percentual de fibras grossas em relação aos machos transgênicos. Na comparação por sexo, tanto machos quanto fêmeas transgênicas apresentaram um aumento significativo no percentual de fibras grossas em relação aos seus pares não transgênicos.

Na análise de expressão gênica, a comparação entre transgênicos e não transgênicos mostrou um aumento significativo de 60% da miogenina nos transgênicos. Os demais genes analisados não mostraram diferenças significativas (Fig. 5). Nas análises levando em consideração o sexo no grupo dos não transgênicos, apenas o gene da α -actina mostrou uma indução significativa (133%) nos machos em relação às fêmeas (Fig. 6A). Entretanto, nos transgênicos os machos apresentaram não só uma indução da α -actina (47%), mas também uma indução na miogenina (53%) em relação às fêmeas (Fig. 6B). Na comparação por sexo, não foram observadas diferenças significativas entre fêmeas transgênicas e não transgênicas em nenhum gene analisado (Fig. 7A). Entretanto, nos machos houve uma indução significativa da miogenina (124%) nos transgênicos em relação aos não transgênicos (Fig. 7B). Na quantificação protéica, não foram observadas diferenças significativas entre transgênicos e não transgênicos (Fig. 8A), nem nas comparações levando em consideração o sexo (Fig. 8B).

Discussão

A miogênese envolve uma série de processos que culminam com o desenvolvimento e crescimento do tecido muscular. Em mamíferos, o crescimento muscular pós-natal ocorre principalmente por hipertrofia (aumento no tamanho dos miotubos) e muito pouco por hiperplasia (proliferação celular resultante da formação de novos miotubos). Entretanto, na maioria das espécies de peixes, o crescimento muscular continua tanto por hipertrofia quanto por hiperplasia ao longo de toda a vida (Rowlerson e Veggetti, 2001). Contudo, em algumas espécies como o *zebrafish* (*Danio rerio*) que apresentam crescimento muscular limitado, este processo desenvolve-se principalmente a partir de um período de crescimento hiperplásico curto seguido por uma hipertrofia de fibras formadas nas fases iniciais do desenvolvimento (Weatherley et al., 1988). De fato, o *zebrafish* pode ser considerado como um modelo que representa o crescimento muscular de mamíferos, atingindo um platô quando maturam sexualmente (Biga e Goetz, 2006).

Considerando o *zebrafish* como um modelo análogo a mamíferos e que os modelos de camundongos transgênicos superexpressando GH apresentam uma marcada hipertrofia (Dudley e Portanova, 1987; Hikida et al., 1995; Clark et al., 2006), seria esperado que o modelo de *zebrafish* utilizado no presente estudo também apresente um crescimento muscular mais hipertrófico como efeito do excesso de GH circulante, da mesma forma que ocorre em mamíferos. De fato, a análise da estrutura do tecido muscular mostrou que o excesso de GH nos *zebrafish* transgênicos acarretou num perfil distinto na distribuição das classes de diâmetro das fibras musculares (Fig. 1). Este perfil caracteriza um tecido com uma maior frequência de fibras mais grossas (>40 μm), indicando um efeito hipertrófico do hormônio. Os transgênicos apresentaram um diâmetro médio das fibras de aproximadamente 51 μm , enquanto que os não transgênicos tiveram uma média de 38 μm . Esta diferença refletiu claramente em perfis de distribuição distintos entre os dois grupos, onde os transgênicos tiveram, proporcionalmente, 36% a mais de fibras maiores do que 40 μm (Fig. 2). É possível que estas diferenças estejam relacionadas à fusão dos mioblastos a fibras pré-existentes, o que caracteriza o processo de hipertrofia (Valente et al., 1999; Rowlerson e Veggetti, 2001).

Assumindo que o excesso de GH em *zebrafish* transgênicos adultos da linhagem F0104 acarreta na indução da transcrição de *IGF-I* hepático (Figueiredo et al., 2007b), e o estado hipertrófico no tecido muscular do *zebrafish* transgênico encontrado no presente estudo, surge a seguinte questão: este efeito é uma ação direta do GH, do IGF-I hepático circulante ou de ambos? Para elucidar esta questão, a expressão dos genes *GHR* e *IGF-I*

muscular foi quantificada comparando transgênicos e não transgênicos (Fig. 5). Os resultados desta análise demonstraram que o excesso de GH circulante nos transgênicos não está produzindo aumento na transcrição tanto de *GHR* quanto de *IGF-I* muscular. Sotiropoulos et al. (2006) fornecem uma série de evidências de que o GH exerce um efeito hipertrófico facilitando a fusão de mioblastos nos miotubos em mamíferos. Estes mesmos autores sugerem, ainda, que o GH não regula a expressão de *IGF-I* em miotubos e que ambos os hormônios apresentam efeitos hipertróficos aditivos através de vias de sinalização distintas, o que corrobora os dados obtidos no presente estudo. Considerando que o IGF-I seja reconhecido como um agente miogênico crítico para o crescimento muscular (Florini et al., 1996; Shavlakadze et al., 2005), os resultados aqui obtidos indicam que a hipertrofia observada no músculo dos transgênicos parece ser um efeito direto do excesso de GH circulante, sendo provável que o *IGF-I* muscular não esteja induzido nos transgênicos devido ao possível já elevado nível de IGF-I circulante.

A análise da expressão de outros fatores reguladores miogênicos (*MyoD*, *miogenina* e *miostatina*) demonstrou que apenas a *miogenina* foi induzida significativamente nos transgênicos (Fig. 5). Uma série de estudos reportam que a miogenina está efetivamente envolvida no controle da fusão e crescimento de miotubos (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993; Black e Olson, 1998; Pownall et al., 2002), sendo um possível indicador de hipertrofia (Johansen e Overturf, 2005). Desta forma, o aumento observado da *miogenina* nos transgênicos confirma a hipertrofia detectada nas análises histológicas destes animais. Entretanto, fica evidente que este aumento observado na expressão do gene da miogenina nos transgênicos ocorre apenas nos machos transgênicos, embora as fêmeas transgênicas também apresentem elevada hipertrofia. Neste caso, uma explicação possível seria que as fêmeas transgênicas já teriam atingido seu limite de crescimento. Tomando por referência o estudo de Spence et al. (2007), o maior comprimento padrão observado em *zebrafish* selvagem foi de 3,5 centímetros. As fêmeas transgênicas aqui utilizadas apresentaram um comprimento padrão médio de $3,56 \pm 0,32$ cm. Também, cabe ressaltar que o nível de hipertrofia observado para as fêmeas transgênicas foi significativamente superior àquele observado para os machos transgênicos, os quais atingiram um comprimento padrão médio inferior ($3,22 \pm 0,30$ cm) ao máximo descrito para a espécie. Embora estas evidências sugiram que os machos transgênicos estejam em processo de crescimento muscular hipertrófico, e as fêmeas transgênicas estão apenas mantendo a hipertrofia máxima adquirida, isto ainda deve ser elucidado.

A análise de expressão do gene da α -actina mostrou uma expressão sexo-dependente e independente da transgenia. Neste caso, os machos de ambos os grupos apresentaram um

expressão significativamente aumentada em relação às suas respectivas fêmeas. Estudos recentes com mamíferos sugerem o envolvimento de hormônios andrógenos e seus receptores com a região promotora do gene da α -actina, o que afeta sua expressão (Vlahopoulos et al., 2005; Hong et al., 2008). Possivelmente, esta relação pode estar influenciando a expressão da α -actina nos machos, acarretando em uma indução na expressão deste gene nos machos de ambos os grupos. Sabe-se que a α -actina é uma proteína importante do músculo esquelético, sendo então esperado que os andrógenos produzam um efeito anabólico aumentando sua expressão (Hong et al., 2008). Ao nosso conhecimento, esta é a primeira vez que é reportada expressão sexo-específica da α -actina em tecido muscular de peixe.

Na análise de quantificação protéica, não foi encontrada diferença entre os transgênicos e não transgênicos (Fig. 8A), e entre machos e fêmeas de ambos os grupos (Fig. 8B). Embora a expressão do gene da α -actina esteja induzida em machos de ambos os grupos, surpreendentemente não foi encontrada diferença significativa no teor de proteínas totais entre machos e fêmeas sugerindo, assim, que a indução da expressão deste gene não parece ser suficiente para alterar a quantidade total de proteínas musculares. Este resultado é corroborado pelo fato do $eIF2\beta$ não ter sua expressão aumentada, visto que este gene é um marcador de síntese protéica em geral atuando na reciclagem de outros fatores de iniciação (Price et al., 1996). Estudos com carpas transgênicas para o GH reportam maior teor de proteína bruta nos transgênicos (Chatakondi et al., 1995; Fu et al., 1998; Dunham et al., 2002). No entanto, níveis inferiores de proteína total em transgênicos foram encontrados em salmão (Cook et al., 2000) e em tilápia (Rahman et al., 2001). Estes dados controversos sugerem que o efeito do excesso de GH sobre o teor de proteína nos transgênicos pode variar com a espécie.

Em geral, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que *zebrafish* transgênicos para o GH apresentam uma arquitetura muscular mais hipertrófica em relação aos não transgênicos de mesma idade, possivelmente devido à ação direta do excesso de GH e/ou em conjunto com o IGF-I hepático circulante. Este efeito pode ser, pelo menos parte, mediado também pela miogenina. Embora espécies comerciais transgênicas para o GH como salmões apresentem crescimento hiperplásico (Hill et al., 2000; Pitkänen et al., 2001), no presente estudo com *zebrafish* transgênicos foi observado crescimento hipertrófico, resultado semelhante ao reportado para modelos de mamíferos transgênicos. Isto confirma que o *zebrafish*, devido ao seu crescimento limitado, apresenta um padrão de crescimento muscular semelhante ao de mamíferos, o que o torna um modelo comparativo interessante.

Lista de símbolos e abreviaturas

GH	Hormônio do crescimento
GHR	Receptor do hormônio do crescimento
IGF-I	Fator de crescimento tipo insulina I
IGF-IR	Receptor de fator de crescimento tipo insulina I
MRFs	Fatores reguladores miogênicos
MyoD	Proteína de determinação miogênica
Myf5	Fator miogênico 5
MYOG	Miogenina
MRF4	Herculina
MSTN	Miostatina
TGF- β	<i>Transforming growth factor</i> β
eIF2 β	Subunidade beta do fator eucariótico de início da síntese protéica 2
MHC4	Miosina de cadeia pesada 4
ACTA1	Alfa-actina
EF1 α	Fator de alongação 1 Alfa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
GFP	Proteína verde fluorescente
nm	Nanômetros
T	Transgênicos
NT	Não transgênicos
TF	Fêmeas transgênicas
TM	Machos transgênicos
NTF	Fêmeas não transgênicas
NTM	Machos não transgênicos
pH	Potencial hidrogeniônico
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetros

°C	Grau Celsius
min	Minutos
s	Segundos
rad.s ⁻¹	Radianos por segundo
L _s	Comprimento padrão
HE	Hematoxilina-Eosina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	Ensaio quantitativo de transcriptase reversa-PCR
ANOVA	Análise de variância
HSD	<i>Honest significance difference</i>
HCl	Ácido clorídrico
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
H ₂ O	Água
M	Massa molar

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela agência Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-PROFIX, Proc. No. 540903/01-9) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de bolsa concedida ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura (PPGAq) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Referências

- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O. and Estrada, M. P.** (2005) Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J. Biotechnol.* **119**, 324-331.
- Benito, M., Valverde, A. M. and Lorenzo, M.** (1996). IGF-I: A mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**, 499-510.
- Biga, P. R. and Goetz, F. W.** (2006). Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **291**, R1327-R1337.
- Black, B. L. and Olson, E. N.** (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 167-196.

- Blackwell, T. and Weintraub, H.** (1990). Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* **250**, 1104–1110.
- Butler, A. A. and Le Roith, D.** (2001). CONTROL OF GROWTH BY THE SOMATROPIC AXIS: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 141-164.
- Canosa, L., Chang, J. P. and Peter, R. E.** (2007). Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **151**, 1-26.
- Chatakondi, N., Lovell, R. T., Duncan, P. L., Hayat, M., Chen, T. T., Powers, D. A., Weete, J. D., Cummins, K. and Dunham, R. A.** (1995). Body composition of transgenic common carp, *Cyprinus carpio*, containing rainbow trout growth hormone gene. *Aquaculture* **138**, 99-109.
- Clark, R. P., Schuenke, M., Keeton, S. M., Staron, R. S. and Kopchick J. J.** (2006). Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on muscle in mouse models of human growth disorders. *Horm. Res.* **66**, 26-34.
- Cook, J. T., McNiven, M. A., Richardson, G. F. and Sutterlin, A. M.** (2000). Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth enhanced Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **188**, 15–32.
- Czerwinski, S. M., Martin, J. M. and Bechtel, P. J.** (1994). Modulation of IGF mRNA abundance during stretch-induced skeletal muscle hypertrophy and regression. *J. Appl. Physiol.* **76**, 2026-2030.
- Devlin, R. H., Sundström, L. F. and Muir, W. M.** (2006). Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. *Trends Biotechnol.* **24**, 89-97.
- Devlin, R. H., Biagi, C. A. and Yesak, T. Y.** (2004). Growth, viability and genetic characteristics of GH transgenic coho salmon strains. *Aquaculture* **236**, 607-632.
- Devlin, R. H., Biagi, C. A., Yesaki, T. Y., Smailus, D. E. and Byatt, J. C.** (2001). Growth of domesticated transgenic fish. *Nature* **409**, 781-782.
- Du, S. J., Gong, Z. Y., Fletcher, G. L., Shears, M. A., King, M. J., Idler, D. R. and Hew, C. L.** (1992). Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Biotechnology (N.Y.)* **10**, 176-181.
- Dudley, G. A. and Portanova, R.** (1987). Histochemical characteristics of soleus muscle in hGH transgenic mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **185**, 403–408.

- Dunham, R. A., Chatakondi, N., Nichols, A. J., Kucuktas, H., Chen, T. T., Powers, D. A., Weete, J. D., Cummins, K. and Lovell, R. T.** (2002). Effect of rainbow trout growth hormone complementary DNA on body shape, carcass yield, and carcass composition of F1 and F2 transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). *Mar. Biotechnol.* **4**, 604-611.
- Eppler, E., Caelers, A., Shved, N., Hwang, G., Rahman, A. M., Maclean, N., Zapf, J. and Reinecke, M.** (2007). Insulin-like growth factor I (IGF-I) in a growth-enhanced transgenic (GH-overexpressing) bony fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*): indication for a higher impact of autocrine/paracrine than of endocrine IGF-I. *Transgenic Res.* **16**, 479-489.
- Fauconneau, B., Andre, S., Chmaitilly, J., Le Bail, P., Krieg F. and Kaushik S. J.** (1997). Control of skeletal muscle fibres and adipose cells size in the flesh of rainbow trout. *J. Fish Biol.* **50**, 296–314.
- Figueiredo, M. A., Lanes, C. F. C., Almeida, D. V. and Marins, L. F.** (2007a). Improving the production of transgenic fish germlines: *in vivo* evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. *Genet. Mol. Biol.* **30**, 31-36.
- Figueiredo, M. A., Lanes, C. F. C., Almeida, D. V., Proietti, M. C. and Marins, L. F.** (2007b). The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* **2**, 228-233.
- Florini, J. R., Ewton, D. Z. and Coolican, S. A.** (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr. Rev.* **17**, 481-517.
- Fu, C., Cui, Y., Hung, S. S. O. and Zhu, Z.** (1998). Growth and feed utilization by F4 human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. *J. Fish Biol.* **53**, 115–129.
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N. and Klein, W. H.** (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* **364**, 501-506.
- Hikida, R. S., Knapp, J. R., Chen, W. Y., Gozdanovic, J. A. and Kopchick, J. J.** (1995). Effects of bovine growth hormone analogs on mouse skeletal muscle structure. *Growth Dev. Aging* **59**, 121–128.
- Hill, J. A., Kiessling, A. and Devlin, R. H.** (2000). Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transgenic for a growth hormone gene construct exhibit increased rates of muscle

- hyperplasia and detectable levels of differential gene expression. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**, 939–950.
- Hong, M. H., Sun, H., Jin, C. H., Chapman, M., Hu, J., Chang, W., Burnett, K., Rosen, J., Negro-Vilar, A. and Miner, J. N.** (2008). Cell-specific activation of the human skeletal alpha-actin by androgens. *Endocrinology* **149**, 1103-1112.
- Ihle, J. N.** (1996). STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription. *Cell* **84**, 331-334.
- Jansson, J. O., Edén, S. and Isaksson, O.** (1985). Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr. Rev.* **6**, 128-150.
- Johansen, K. A. and Overturf, K.** (2005). Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol.* **7**, 576–587.
- Johnston, I. A.** (1999). Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture* **177**, 99–115.
- Kajimura, S., Uchida, K., Yada, T., Riley, L. G., Byatt, J. C., Collier, R. J., Aida, K., Hirano, T. and Grau, E. G.** (2001). Stimulation of insulin-like growth factor-I production by recombinant bovine growth hormone in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiol. Biochem.* **25**, 221-230.
- Koumans, J. T. M. and Akster, H. A.,** (1995). Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* **110**, 3–20.
- Lassar, A., Buskin, J. N., Lockshon, D., Davis, R. L., Apone, S., Hauschka, S. D. and Weintraub, H.** (1989). MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* **58**, 823–831.
- Le Roith, D., Scavo, L. and Buttle, A.** (2001). What is the role of circulating IGF-I? *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 48-52.
- Marins, L. F., Iyengar, A., Maclean, N., Levy, J. A. and Sohm, F.** (2002). Simultaneous overexpression of GH and STAT5b genes inhibits the STAT5 signalling pathway in tilapia (*Oreochromis niloticus*) embryos. *Genet. Mol. Biol.* **23**, 293–298.
- McPherron, A. C., Lawler, A. M. and Lee, S. J.** (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83–90.
- Moriyama, S., Ayson, F. G. and Kawauchi, H.** (2000). Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1553-1562.

- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D. and Lassar, A. B.** (1989). Interactions between heterologous helix–loop–helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**, 537–544.
- Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I. and Nabeshima, Y.** (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* **364**, 532-535.
- Nam, Y. K., Noh, J. K., Cho, Y. S., Cho, H. J., Cho K. N., Kim, C. G. and Kim, D. S.** (2001). Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res.* **10**, 353–362.
- Nordgarden, U., Fjelldal, P. G., Hansen, T., Björnsson, B. T. and Wargelius, A.** (2006). Growth hormone and insulin-like growth factor-I act together and independently when regulating growth in vertebral and muscle tissue of atlantic salmon postsmolts. *Gen. Comp. Endocrinol.* **149**, 253–260.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**, e36.
- Pitkänen, T. I., Xie, S. Q., Krasnov, A., Mason, P. S., Mölsä, H. and Stickland, N. C.** (2001). Changes in tissue cellularity are associated with growth enhancement in genetically modified arctic char (*Salvelinus alpinus L.*) carrying recombinant growth hormone gene. *Mar. Biotechnol. (NY)* **3**,188-197.
- Pownall, M. E., Gustafsson, M. K. and Emerson, C. P. Jr.** (2002). Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 747-783.
- Price, N. T., Kimball, S. R., Jefferson, L. S. and Proud, C. G.** (1996). Cloning of cDNA for the gamma-subunit of mammalian translation initiation factor 2B, the guanine nucleotide-exchange factor for eukaryotic initiation factor 2. *Biochem. J.* **318**, 631–636.
- R Development Core Team** (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rabinovsky, E. D., Gelir, E., Gelir, S., Lui, H., Kattash, M., Demayo, F. J., Shenaq, S. M. and Schwartz, R. J.** (2002). Targeted expression of IGF-1 transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. *FASEB J.* **17**, 53-55.

- Rahman, M. A., Ronyai, A., Engidaw, B. Z., Jauncey, K., Hwang, G. L., Smith, A., Roderick, E., Penman, D., Varadi, L. and Maclean, N.** (2001). Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. *J. Fish Biol.* **59**, 62-78.
- Rahman, M. A., Mak, R., Ayad, H., Smith, A. and Maclean, N.** (1998). Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgenic Res.* **7**, 357-369.
- Reinecke, M., Björnsson B. T., Dickhoff W. W., McCormick S. D., Navarro I., Power D. M. and Gutiérrez J.** (2005). Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *Gen. Comp. Endocrinol.* **42**, 20-24.
- Rosa, C. E., Figueiredo, M. A., Lanes, C. F. C., Almeida, D. V., Monserrat, J. M. and Marins, L. F.** (2008). Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* **149**, 209-214.
- Rowlerson, A. and Veggetti, A.** (2001). Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: *Muscle Development and Growth*. (Ed. Johnston, I.A.), pp. 103–140. London: Academic Press.
- Schindler, C. and Darnell, Jr, J. E.** (1995). Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 621-651.
- Shavlakadze, T., Winn, N., Rosenthal, N. and Grounds M. D.** (2005) Reconciling data from transgenic mice that overexpress IGF-I specifically in skeletal muscle. *Growth Horm. IGF Res.* **15**, 4-18.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J.** (1995). Biometry. The principles and practice of statistics in biological research (3rd ed.), pp.887. New York: W. H. Freeman.
- Sotiropoulos, A., Ohanna, M., Kedzia, C., Menon, R. K., Kopchick, J. J., Kelly, P. A. and Pende, M.** (2006). Growth hormone promotes skeletal muscle cell fusion independent of insulin-like growth factor 1 up-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 7315–7320.
- Spence, R., Fatema, M. K., Ellis, S., Ahmed, Z. F. and Smith, C.** (2007). The diet, growth and recruitment of wild zebrafish (*Danio rerio*) in Bangladesh. *J. Fish Biol.* **71**, 304–309.
- Stewart, C. E. and Rotwein, P.** (1996). Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev.* **76**, 1005-1026.
- Studzinski, A. L., Almeida, D. V., Lanes, C. F., Figueiredo, M. A. and Marins, L. F.** (2009). SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the somatotrophic axis

- in liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **161**, 67-72.
- Uchida, K., Kajimura, S., Riley, L. G., Hirano, T., Aida, K. and Grau, E. G.** (2003). Effects of fasting on growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **134**, 429-433.
- Valente, L. M. P., Rocha, E., Gomes, E. F. S., Silva, M. W., Oliveira, M. H., Monteiro, R. A. F. and Fauconneau, B.** (1999). Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast and slow-growing strains of rainbow trout. *J. Fish Biol.* **55**, 675– 691.
- Vlahopoulos, S., Zimmer, W. E., Jenster, G., Belaguli, N. S., Balk, S. P., Brinkmann, A. O., Lanz, R. B., Zoumpourlis, V. C. and Schwartz, R. J.** (2005). Recruitment of the androgen receptor via serum response factor facilitates expression of a myogenic gene. *J. Biol. Chem.* **280**, 7786-7792.
- Watabe, S.** (2001). Myogenic regulatory factors. In: *Muscle Development and Growth*. (Ed. Johnston, I.A.), pp. 19–41. London: Academic Press.
- Watabe, S.** (1999). Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.* **55**, 1–18.
- Waters, M. J., Hoang, H. N., Fairlie, D. P., Pelekanos, R. A. and Brown, R. J.** (2006). New insights into growth hormone action. *J. Mol. Endocrinol.* **36**, 1-7.
- Weatherley, A. H. and Gill, H.** (1982). Influence of bovine growth hormone on the growth dynamics of mosaic muscle in relation to somatic growth of rainbow trout *O. mykiss*. *J. Fish Biol.* **20**, 165–172.
- Weatherley, A., Gill, H. and Lobo, A.F.** (1988). Recruitment and maximal diameter of axial muscle fibers in the teleosts and their relationship to somatic growth and ultimate size. *J. Fish Biol.* **33**, 851–859.
- Westerfield, M.** (1995). *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish Danio rerio*, third ed. University of Oregon Press, Eugene, OR, USA.
- Wood, A. W., Duan, C. and Bern, H. A.** (2005). Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int. Rev. Cytol.* **243**, 215-285.
- Yakar, S., Liu, J., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B. and Le Roith, D.** (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7324–7329.

Tabela 1 - *Primers* desenhados para a qRT-PCR com base em sequências disponíveis no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) para os genes que codificam para o receptor do hormônio do crescimento (*GHR*), fator de crescimento tipo insulina I (*IGF-I*), proteína de determinação miogênica (*MyoD*), miogenina (*MYOG*), miostatina (*MSTN*), subunidade beta do fator eucariótico de início da síntese protéica 2 (*eIF2β*), miosina de cadeia pesada 4 (*MHC4*), α -actina (*ACTA1*) e fator de alongação 1 Alfa (*EF1 α*).

Gene	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	GenBank
<i>EF1α</i>	5' - CAAAATTGGAGGTATTGGAAGTGTAC - 3'	5' - TCAACAGACTTGACCTCAGTGGTT - 3'	L47669
<i>GHR</i>	5' - TGCTGTGCGCTACAAAATGG - 3'	5' - GCTTCTGCAAAGGCTGATAGAAA - 3'	BC134903
<i>IGF-I</i>	5' - ACTTTGTGGGCACATGCAAA - 3'	5' - CATGATCTCATTGCGAATTCCTT - 3'	BC114262
<i>MyoD</i>	5' - GGAGCGAATTTCCACAGAGACT - 3'	5' - GTGCCCTCCGGTACTGA - 3'	BC114261
<i>MYOG</i>	5' - GGCCGCTACCTTGAGAGAGA - 3'	5' - GAGCCTCAAAGGCCTCGTT - 3'	AF202639
<i>MSTN</i>	5' - TGCTTTCCGCAAGACACTGT - 3'	5' - GAAGCGGTGCCAGAGAGT - 3'	AF540956
<i>eIF2β</i>	5' - GCGCTCGTGGGTTTGTG - 3'	5' - CCTCAGGCTTTCGGTTTCC - 3'	BC066706
<i>MHC4</i>	5' - GCGCGCTGACATTTCTGA - 3'	5' - CAGCGTCACGGCTTTTGG - 3'	AY921650
<i>ACTA1</i>	5' - TCTGTCCACCTTCCAGCAGAT - 3'	5' - GATGGACCTGCCTCGTCGTA - 3'	AF180887

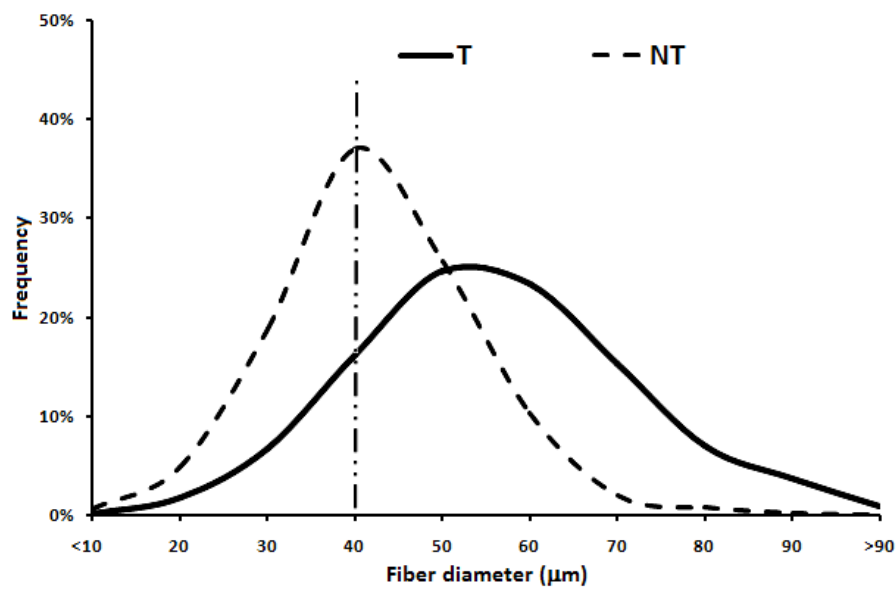
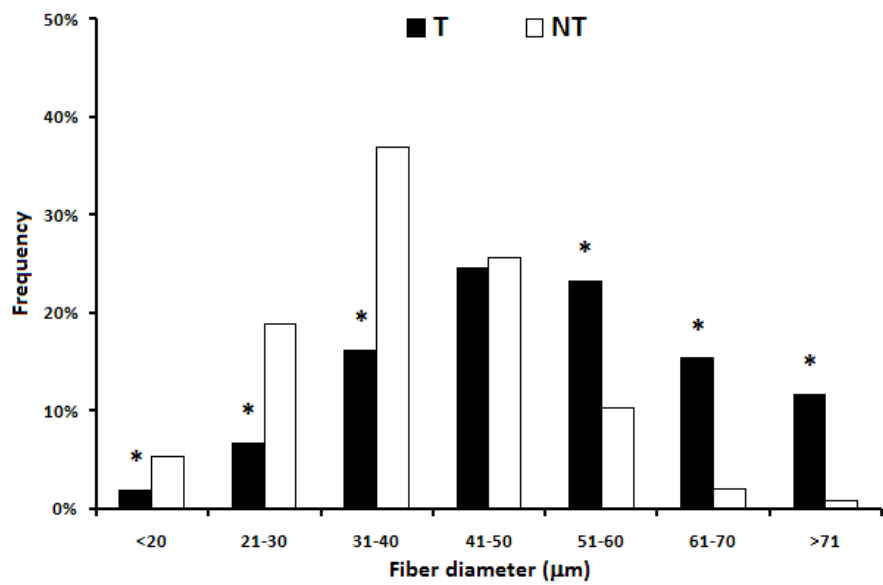


Fig. 1 – Distribuição diamétrica de fibras musculares *zebrafish* (*Danio rerio*). T: transgênicos; NT: não transgênicos. Asteriscos representam diferenças significativas ($P<0,05$).

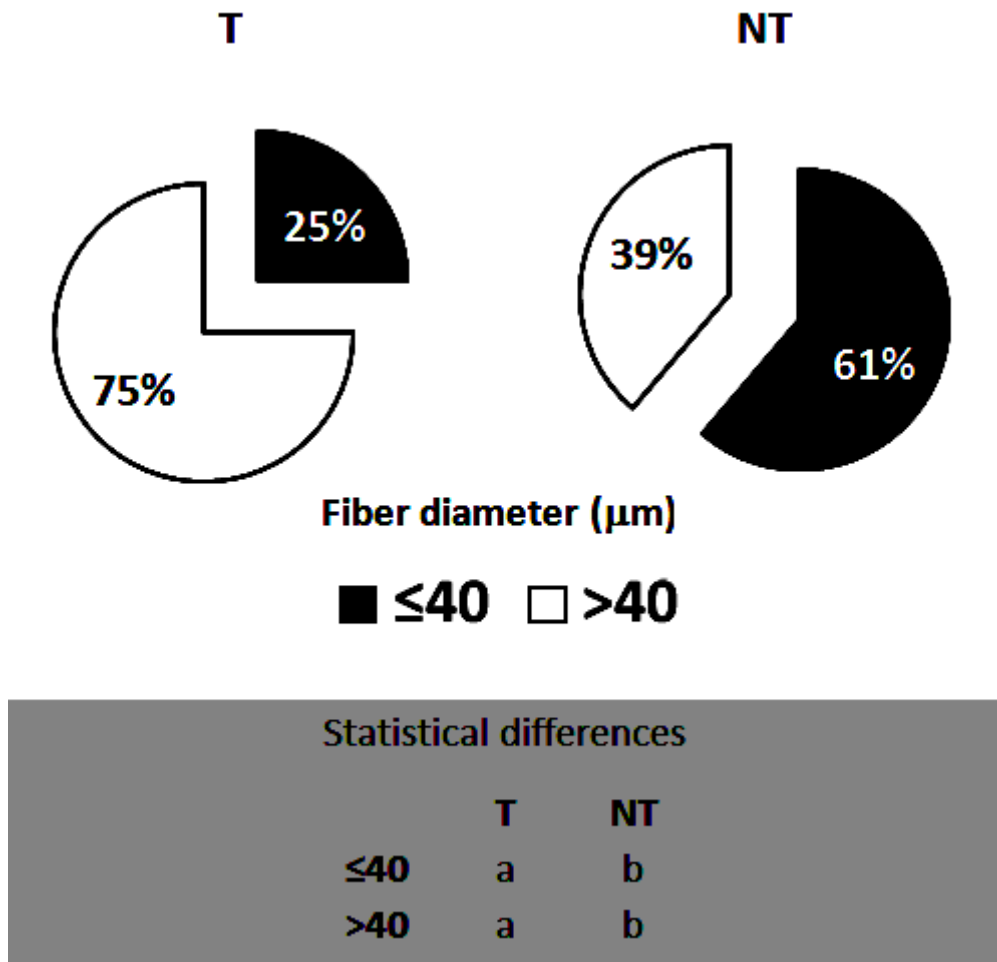


Fig. 2 – Proporção das fibras finas ($\leq 40 \mu\text{m}$) e grossas ($> 40 \mu\text{m}$) entre *zebrafish* (*Danio rerio*) transgênicos (T) e não transgênicos (NT). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

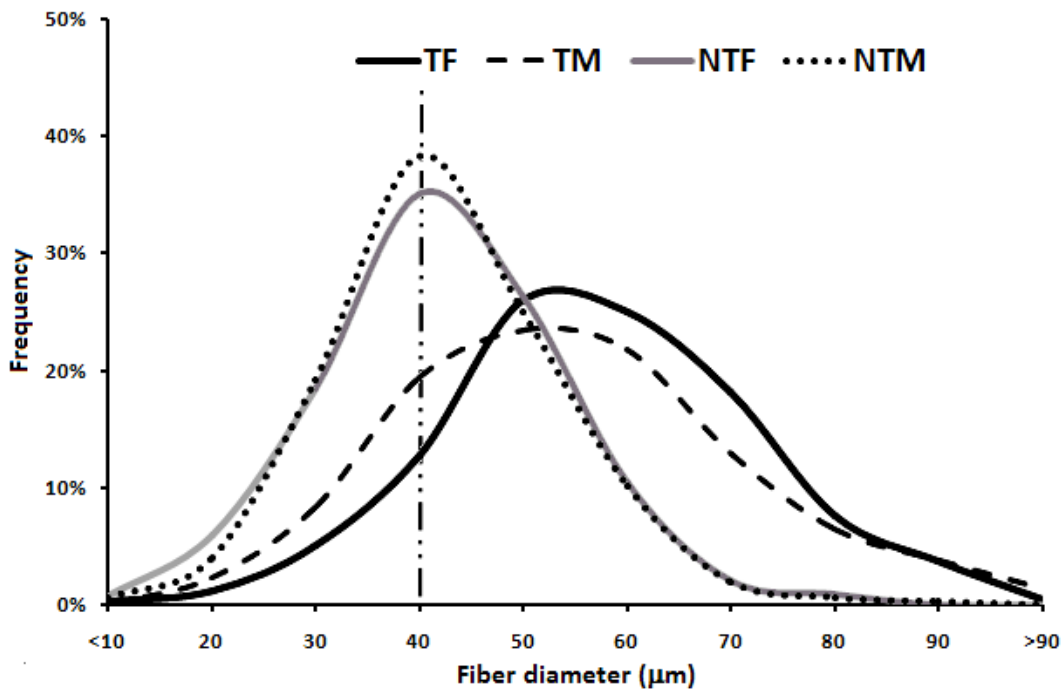
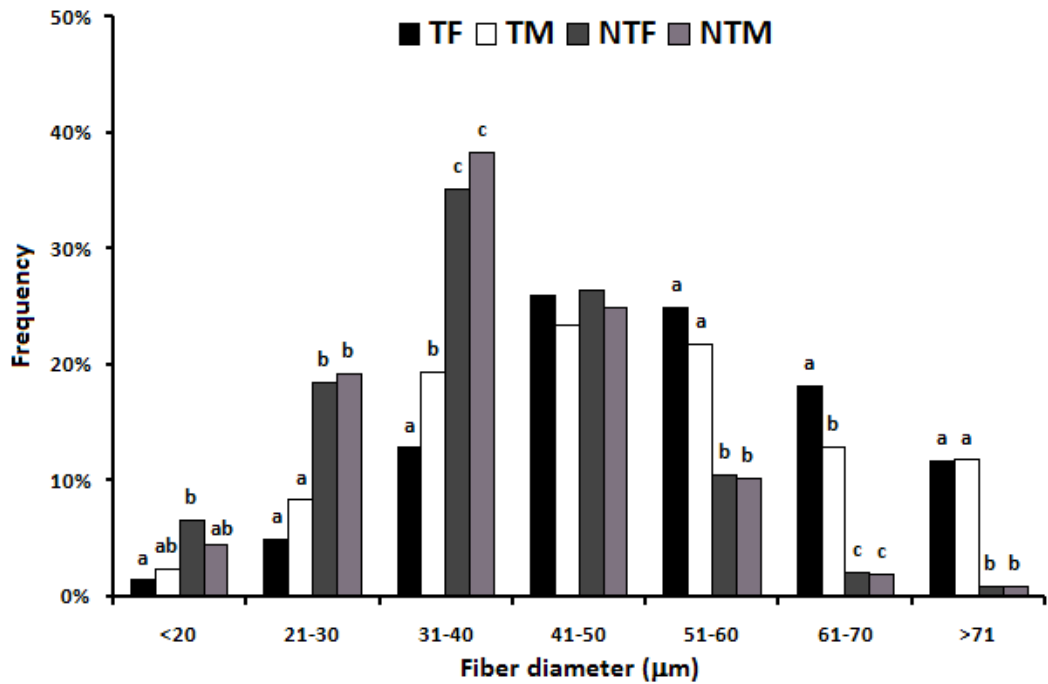


Fig. 3 – Distribuição diamétrica das fibras musculares de *zebrafish* (*Danio rerio*), levando em consideração o sexo. TF: fêmeas transgênicas; TM: machos transgênicos; NTF: fêmeas não transgênicas; NTM: machos não transgênicos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

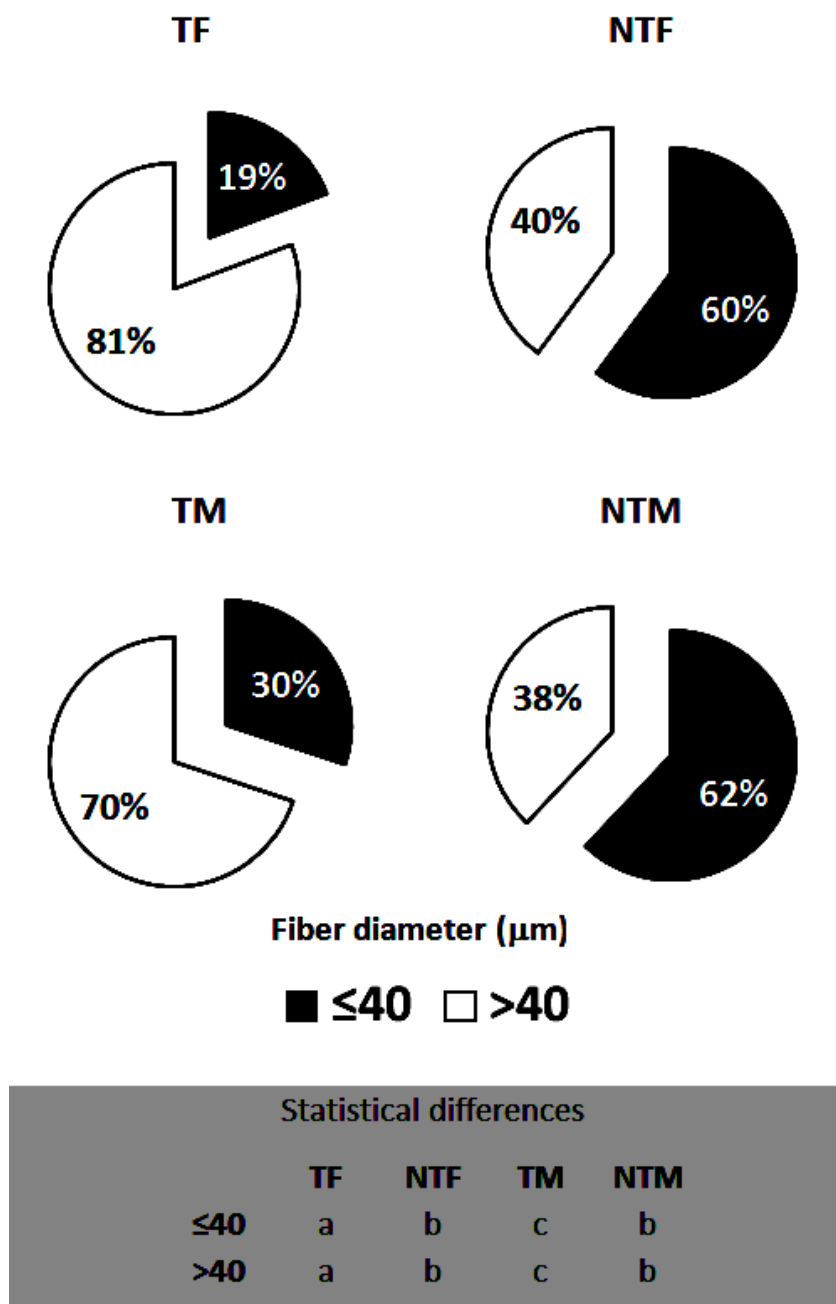


Fig. 4 – Proporção das fibras finas ($\leq 40 \mu\text{m}$) e grossas ($> 40 \mu\text{m}$) em *zebrafish* (*Danio rerio*), levando em consideração o sexo. TF: fêmeas transgênicas; TM: machos transgênicos; NTF: fêmeas não transgênicas; NTM: machos não transgênicos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

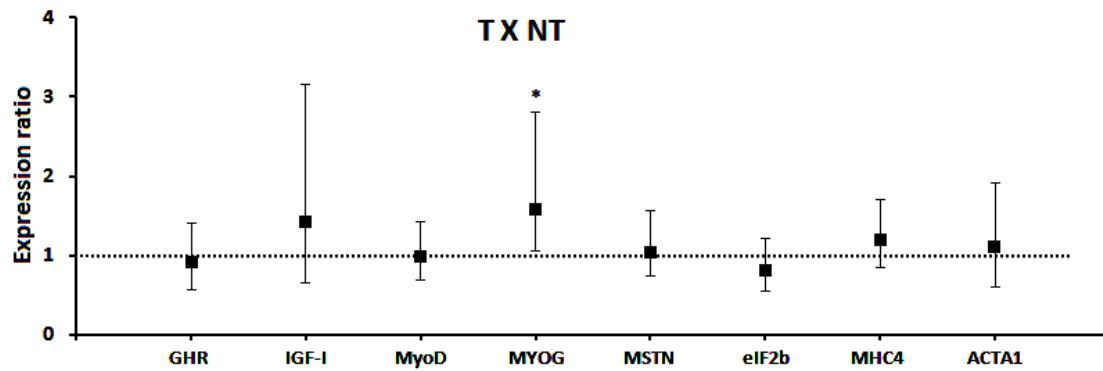


Fig. 5 – Expressão gênica relativa comparando *zebrafish* (*Danio rerio*) transgênico (T) e não transgênico (NT). Os não transgênicos foram considerados o grupo controle, cuja expressão está representada pela linha tracejada. Asterisco indica diferença significativa de cada gene em relação ao controle ($P < 0,05$).

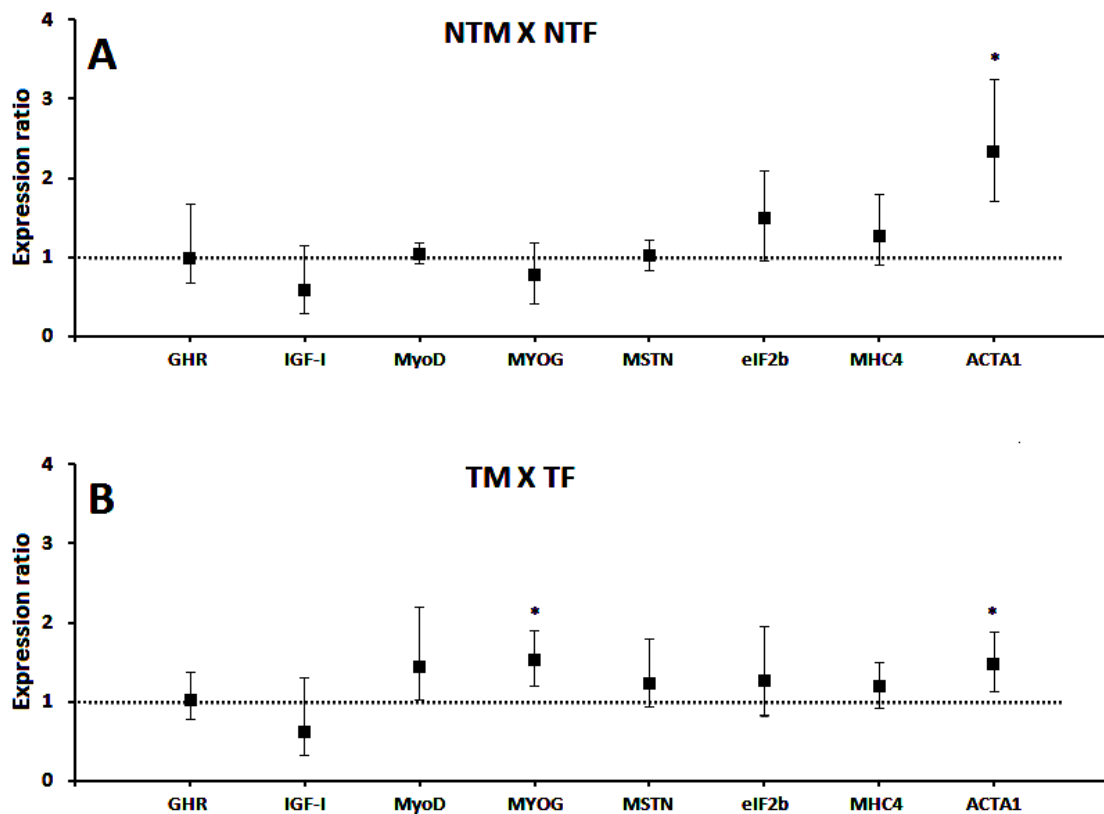


Fig. 6 – Expressão gênica relativa comparando *zebrafish* (*Danio rerio*) machos e fêmeas, levando em consideração o grupo (transgênico e não transgênico). (A) comparação entre não transgênicos, (B) comparação entre transgênicos. TF: fêmeas transgênicas; TM: machos transgênicos; NTF: fêmeas não transgênicas; NTM: machos não transgênicos. Em cada comparação as fêmeas foram consideradas como controle, cuja expressão está representada pela linha tracejada. Asteriscos indicam diferenças significativas de cada gene em relação ao controle ($P < 0,05$).

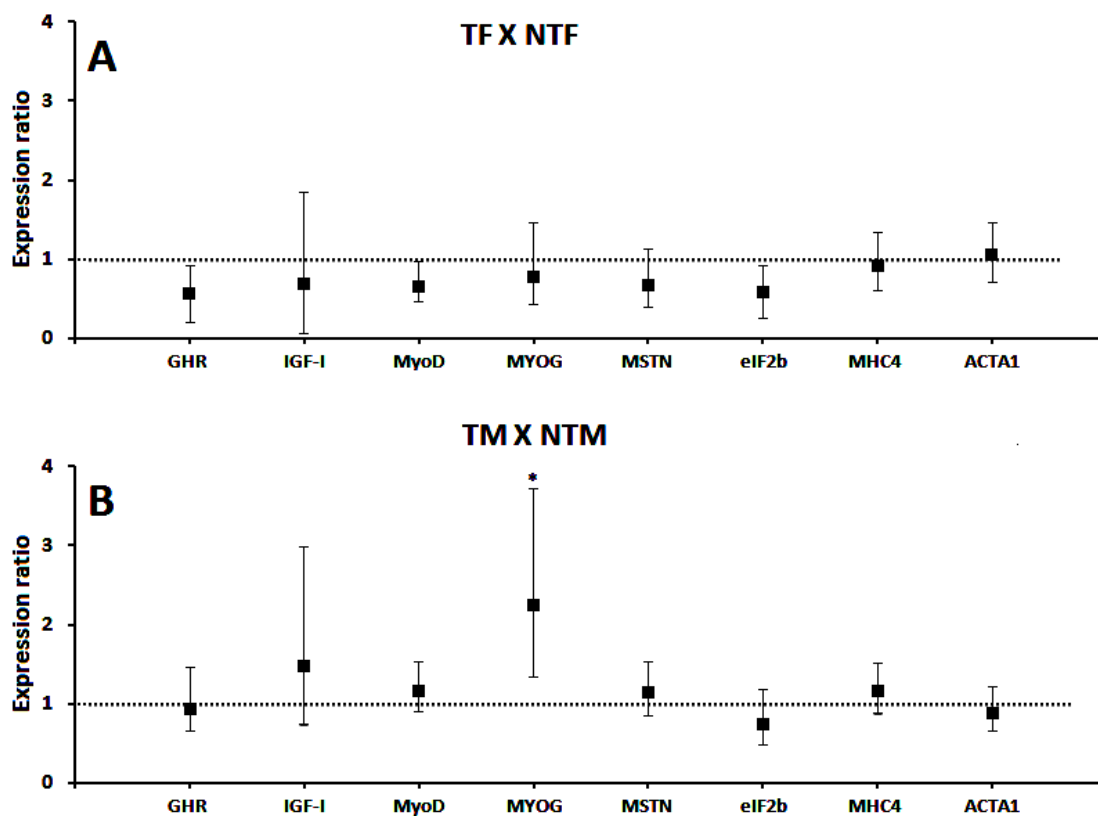


Figura 7 – Expressão gênica relativa comparando *zebrafish* (*Danio rerio*) transgênicos e não transgênicos, levando em consideração o sexo. (A) comparação entre fêmeas, (B) comparação entre machos. TF: fêmeas transgênicas; TM: machos transgênicos; NTF: fêmeas não transgênicas; NTM: machos não transgênicos. Em cada comparação os não transgênicos foram considerados como controle, cuja expressão está representada pela linha tracejada. Asterisco indica diferença significativa de cada gene em relação ao controle ($P < 0,05$).

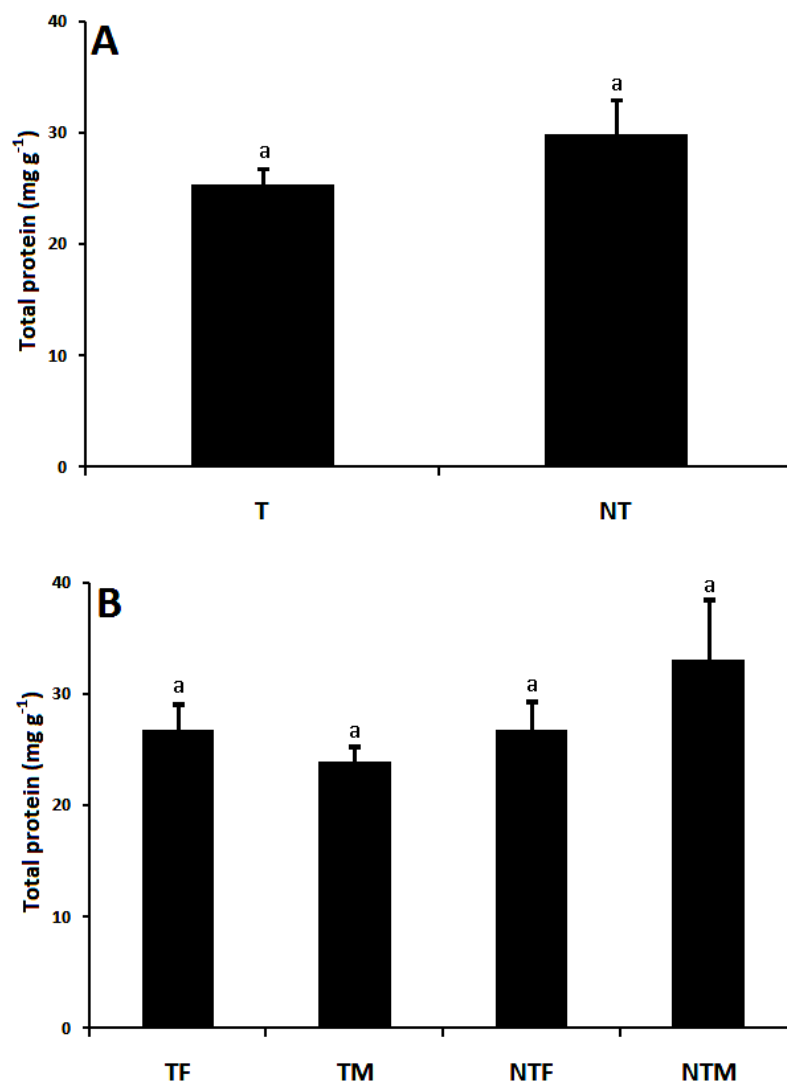


Fig. 8 – Concentração de proteína total em tecido muscular de *zebrafish* (*Danio rerio*) (A) comparação entre transgênicos (T) e não transgênicos (NT); (B) comparação levando em consideração o sexo: fêmeas transgênicas (TF); machos transgênicos (TM); fêmeas não transgênicas (NTF); machos não transgênicos (NTM). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$).

Conclusões gerais

- 1) O excesso de GH pode estar induzindo uma maturação sexual precoce nos transgênicos.
- 2) Na média, o excesso de GH induziu um aumento no crescimento dos transgênicos que foi sexo-independente.
- 3) Foi encontrado um gradiente no tamanho de machos transgênicos, o que evidencia um crescimento heterogêneo neste grupo.
- 4) O GH promoveu alteração na estrutura muscular de transgênicos, sendo estes mais hipertróficos em relação aos não transgênicos de mesma idade.
- 5) A hipertrofia muscular nos transgênicos parece envolver a ação da miogenina e ser independente da indução do *IGF-I* muscular.
- 6) A expressão do gene da α -actina mostrou-se sexo-dependente, sendo mais induzido nos machos independentemente da quantidade de GH circulante.