

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DO  
CRESCIMENTO ASSOCIADO A CARACTERÍSTICAS DE  
CRESCIMENTO DE TILÁPIA DO NILO**

Autora: Maria Del Pilar Rodriguez Rodriguez  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Gasparino  
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Abril – 2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DO  
CRESCIMENTO ASSOCIADO A CARACTERÍSTICAS DE  
CRESCIMENTO DE TILÁPIA DO NILO**

Autora: Maria Del Pilar Rodriguez Rodriguez  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Gasparino  
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de **DOUTORA EM ZOOTECNIA**, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de Concentração: Produção Animal

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Abril – 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

R696p Rodriguez, Maria Del Pilar Rodriguez  
Polimorfismos no gene hormônio do crescimento  
associado a características de crescimento de  
Tilápia do Nilo / Maria Del Pilar Rodriguez  
Rodriguez. - Maringá, 2004.  
81 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Gasparino.  
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento  
de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia, 2014.

1. Aquicultura. 2. Tilápia do Nilo - Hormônio do  
crescimento - Gene. 3. Polimorfismos. I. Gasparino,  
Eliane, orient. II. Ribeiro, Ricardo Pereira,  
coorient. III. Universidade Estadual de Maringá  
Centro de Ciências Agrárias. Departamento de  
Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.  
III. Título.

CDD 21. ed. 639.8

MGC - 001113



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DO  
CRESCIMENTO ASSOCIADO A CARACTERÍSTICAS  
DE CRESCIMENTO EM TILÁPIA DO NILO**

Autora: Maria Del Pilar Rodriguez Rodriguez  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliane Gasparino

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 04 de abril de 2014.

Prof.ª Dr.ª Sandra Maria Simonelli

Prof. Dr. Robie Allan  
Bombardelli

Prof. Dr. Nelson Maurício  
Lopera Barrero

Dr. Christiano Rodrigues  
Schamber

Prof.ª Dr.ª Eliane Gasparino  
(Orientadora)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho à minha mãe Luz Marina Rodriguez Fagua e meu pai Luis Carlos Rodriguez Saldaña, por terem o dom de amar, cuidar, aconselhar, incentivar, e apoiar-me sempre.

Aos meus irmãos Juan Carlos Rodriguez e Ingrid Julieth Rodriguez, por serem confidentes, cúmplices da minha felicidade e fortalezas em momentos de tristeza.

A toda minha família, pois, vocês são uma bênção de DEUS e eu os amo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e seu infinito amor. Obrigada, Deus, tu és fiel e tua Mão sempre me sustentou.

A toda minha família: Luz Marina Rodriguez F., Luis Carlos Rodriguez S., Juan Carlos Rodriguez R., Ingrid Julieth Rodriguez R., Linda Katherine O. Juan Sebastian R.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia (PPZ)

À Prof.Dr. Eliane Gasparino, pela orientação, pela confiança, por acreditar em mim e sempre ser uma mão amiga nos momentos difíceis. Grata, professora.

Ao Prof.Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, pela coorientação e pela confiança em meu trabalho.

Ao Prof. Dr Nelson Mauricio Loprera-Barrero e Angela Poveda, pela força e amizade.

Ao Prof. Dr. Ivanor Nunes do Prado e Maribel Velandia, pela amizade e pelos momentos compartilhados de alegria, tristezas e sorrisos.

À Dilma Botter, pela ajuda no laboratório.

Ao meu grupo de trabalho, Stefania Claudino, Fernanda Tanamati e Ana Paula Del Vesco, pelos momentos compartilhados.

À Daniele Menezes, Elenice Reis, Marcia e Herena, por serem companheiras e amigas.

Aos meus companheiros da universidade, Ivan Araújo e Jeane, Melanie Digmayer, Juliana Minardi, Sheila Oliveira, Aline Mayra, Julio Triamonte, Pedro Castro.

Aos amigos conterrâneos, Juan Carlos Henao, Olga Barreto, Andrea Mayorga, Laura Marcela Diaz, Lina Rodriguez, Alma Ariza, Mirtha Angulo, Angela Gutierrez, Orion Becker, Jonathan, Juan Camilo, Alvaro Soler, pela ajuda nos momentos difíceis e pela cumplicidade.

À Olinda, Mônica, Chiara, família Kappes, José Wagner, Rodrigo Bratifich, pelos bons momentos.

## **BIOGRAFIA**

Maria Del Pilar Rodriguez Rodriguez, filha de Luis Carlos Rodriguez Saldaña e Luz Marina Rodriguez Fagua, nasceu na cidade de Ibagué, Tolima, em 8 de dezembro de 1986.

Em fevereiro de 2003, ingressou no Curso de Biología ofertado pela Universidad del Tolima - UT, no campus universitário de Ibagué, e foi graduada em Fevereiro de 2009, obtendo o título de Bióloga.

Em Março de 2009, iniciou o mestrado em Zootecnia na Universidade Estadual De Maringá, na área de produção Animal, na linha de pesquisa caracterização e desenvolvimento de variedades para cultivo aquícola que tem como objetivo a caracterização de variedades e espécies de peixes, bem como a produção de variedades selecionadas com o auxílio de marcadores moleculares. No mês de março do 2011, concluiu o mestrado e iniciou o doutorado no programa de Zootecnia na Universidade Estadual De Maringá. Em março de 2014 apresentou o exame de qualificação, sendo aprovada pela banca examinadora e posteriormente, no dia 04 de abril, submeteu-se à Banca para defesa do trabalho de tese, sendo aprovada.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiv
RESUMO .....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL</b>	
1. Origem e características de Tilápias do Nilo .....	1
1.1 Mercado de Tilápia .....	1
1.2 Rendimentos de Tilápia .....	3
2 Desenvolvimento e Crescimento muscular .....	4
3 Hormônio do Crescimento .....	6
4 Sequenciamento .....	7
5 Microssatélites .....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
OBJETIVOS GERAIS .....	17
<b>CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM VARIEDADES DE TILÁPIA</b>	
Resumo .....	18
Abstract .....	20
Introdução .....	22
Material e métodos .....	24
Resultados .....	27

Discussão .....	32
Conclusões .....	36
Referências .....	36
<b>CAPÍTULO III - POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO ASSOCIADO A CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E HISTOLOGIA MUSCULAR EM TILÁPIA DO NILO</b>	
Resumo .....	41
Abstract .....	42
Introdução .....	43
material e métodos .....	45
Resultados .....	49
Discussão .....	53
Conclusões .....	57
Referências .....	57

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL</b>	
<b>Tabela 1.</b> Análise de homologia do hormônio do crescimento para várias espécies.....	7
 <b>CAPÍTULO III - POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO ASSOCIADO A CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E HISTOLOGIA MUSCULAR EM TILÁPIA DO NILO</b>	
<b>Tabela 1.</b> Características morfométricas e de desempenho dos genótipos GH/Ho (n=116) e GH/He (n=151) do gene hormônio do crescimento, em tilápia do Nilo provenientes do cruzamento GIFT x Tailandesa.....	50
<b>Tabela 2.</b> Rendimentos corporais e relações entre as características morfométricas dos genótipos GH/Ho (n=116) e GH/He (n=151) em tilápia do Nilo provenientes do cruzamento GIFT x Tailandesa.....	51
<b>Tabela 3.</b> Frequências médias das fibras musculares com crescimento hiperplásico e hipertrófico para o gene GH em Homozigose (GH/Ho) e GH em Heterozigose (GH/He) em diferentes coletas com idades aproximadas 30,60,90 e 120 dias de tilápia do Nilo e sua interação.....	52

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL</b>	
Figura 1. Espécies ou grupos de maior produção na aquicultura no ano 2010. Fonte FAO (2012).....	2
Figura 2. Medidas morfométricas que geralmente são avaliadas nos peixes, onde CT: comprimento total, CP: comprimento padrão; CCA: comprimento da cabeça; AC: altura do corpo; LC: largura do corpo. Adaptado: Melo (2012). .....	4
Figura 3. Processo das fibras musculares. Fonte: (Mareco, 2012).....	5
Figura 4. Corte transversal da musculatura estriada de tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ), após a reação de NADH-TR (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzido-tetrazólio-redutase). demonstrando a musculatura distribuída em compartimentos Vermelho (v), Intermediário (i) e Branco. In: Expressão gênica de fatores que controlam o crescimento muscular de Pacu (Almeida, 2011).....	5
Figura 5. Modelo esquemático de uma reação de sequenciamento automatizado. Fonte: Oliveira et al., 2014.....	9
<b>CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM VARIEDADES DE TILÁPIA</b>	
Figura 1. 1- Alinhamento das sequências GH1 e GH2 do gene hormônio de crescimento. Em roxo <i>primers Forward e Reverse</i> , em azul número de repetições do microssatélite (CTGT), em vermelho	

- deleção de uma repetição do microssatélite em GH2 e em amarelo éxon 1 e éxon 2..... 25
- Figura 2. Indivíduos escolhidos para sequenciamento, gel de agarose 2%. Variedade GIFT (G) - indivíduos GHbs = G1 e G2, cruzamentos GIFT x Bouaké (GxB) indivíduos GHbd = GxB1 e GxB2, GIFT x Tailandesa (GxT) indivíduos GHbs= GxT1 e GxT2, indivíduos GHbd= GxT3 e GxT4, variedade Tailandesa (T) GHbs indivíduos= T1 e T2 e GHbd indivíduos = T3 e T4 e variedade Bouaké GHbd indivíduos= B1 e B2. Marcador Ladder de 100 pb..... 27
- Figura 3. Alinhamentos das sequências das GH banda simples (GHbs) para as linhagens GIFT (G) Tailandesa (T1 e T2), cruzamento entre GIFT x Tailandesa (GxT) e sequências GH1 (M97766.1) e GH2 (M97765). Programa utilizado: CLUSTAL 2.1 - multiple sequence alignment. Em vermelho éxon 1 e 2, as setas (↑) indicam onde teve algum tipo de mutação ao igual que as letras em azul e os traços (-) onde foram apresentadas deleções..... 28
- Figura 4. Alinhamentos das sequências do gene GH banda dupla fragmento de 700 pb para as variedades de tilápia Bouaké (B), Tailandesa (T) e o cruzamento entre GIFT x Bouaké (GxB). As setas (↑) indicam onde teve algum tipo de mutação. Programa utilizado: CLUSTAL 2.1 - multiple sequence alignment..... 30
- Figura 5. Alinhamentos GH banda dupla – fragmento de 650 pb. Tilápias Bouaké (B1 e B2) comparadas com GH banda simples da variedade GIFT (G), as setas (↑) e nucleotídeos em azul indicam onde teve algum tipo de mutação. Programa utilizado: CLUSTAL 2.1 - multiple sequence alignment..... 30
- Figura 6. Comparação de amostras em gel de agarose e poliacrilamida. **A.** Gel de agarose 2%. Canaletas 3 e 4 são GHbd e canaletas 1, 2, 5, 6, 7 e 8 são GHbs. **B.** Amostras em gel de Poliacrilamida (29:1) 10% desnaturante. Amostra 1, 2, 5 e 6 apresentam gene

	hormônio de crescimento em homozigose (GHbs) com sete repetições do microssatélite CTGT e amostras 7 e 8, (GHbs) para seis repetições; amostras 3 e 4 indivíduos heterozigotos (GHbd) seis e sete repetições.....	31
Figura 7	Amostras em gel de Poliacrilamida (29:1) 10% desnaturante. Canaletas 4,6,8,12,13 e 14 apresentam indivíduos gene GHbd homozigotos para sete <i>motifs</i> , amostra 5 e 11 apresentam gene GHbd homozigotos para seis <i>motifs</i> , amostras 2, 10 e 15 apresentam outras variantes polimórficas do gene GH e amostras 3, 7, 9 e 10 indivíduos heterozigotos para seis e sete <i>motifs</i> . As setas indicam variações de 9 a 12 <i>motifs</i> . L: marcador Ladder de 100 pb.....	32
<b>CAPÍTULO III - POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO ASSOCIADO A CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E HISTOLOGIA MUSCULAR EM TILÁPIA DO NILO</b>		
Figura 1.	Gel de agarose 2%. Marcador molecular ladder 100pb (M), genótipos GH/Ho canaletas (2, 3, 5, 8, 10) e genótipo GH/He canaletas (1, 4, 6, 7, 9, 11).....	50
Figura 2.	Corte transversal do músculo branco de tilápia do Nilo. Aumento 40x. Fibras em hiperplasia >30 e hipertrofia <30. As setas brancas indicam os núcleos periféricos.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

### CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM VARIEDADES DE TILÁPIA DO NILO

GH: Hormônio do crescimento

GHbs: gene hormônio do crescimento banda simples fragmento de 650 pb

GHbd: gene hormônio do crescimento banda dupla fragmentos de 650 pb e 700 pb

mRNA: RNA mensageiro

(6:6) = relação do numero de repetições (seis) do microssatélite CTGT em GH1: GH2

(7:7) = relação do numero de repetições (sete) do microssatélite CTGT em GH1: GH2

### CAPÍTULO III POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO ASSOCIADO A CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E HISTOLOGIA MUSCULAR EM TILÁPIA DO NILO

GH/Ho: gene hormônio do crescimento em homozigose

GH/He: gene hormônio do crescimento em heterozigose

PF: Peso final na hora do abate;

GP: Ganho em peso;

CT: comprimento Total, compreendido entre a extremidade anterior da cabeça até o final da nadadeira caudal;

CP: comprimento padrão, compreendido entre a extremidade anterior da cabeça e a inserção da nadadeira caudal;

LC: largura do corpo;

ACA: Altura da cabeça, entre a extremidade posterior do processo occipital e o istmo;

LCA: largura da cabeça;

CCA: comprimento da cabeça, compreendido entre a extremidade anterior da cabeça e a borda caudal do opérculo;

PCA: Peso da cabeça;

PPevis: Peso peixe eviscerado;

PPele: Peso da pele;

PFilé: Peso do filé sem pele;

PFig: Peso do Fígado;

## RESUMO

O gene hormônio do crescimento (GH) tem sido ponto de estudo para muitos pesquisadores, pois se tem demonstrado que ele atua em vários processos fisiológicos. Técnicas moleculares como o sequenciamento, têm permitido o acesso à informação da estrutura genômica do gene GH e seus polimorfismos, alguns destes relacionados com melhores desempenhos e/ou produção. As tilápias apresentam dois GH chamados de GH1 e GH2 suas sequências se encontram no banco genômico GENBANK, com números de acesso M97766.1 e M97765 respectivamente, quando feito o alinhamento destas sequências, encontramos uma alta homologia. No entanto, observa-se a repetição de um microssatélite (CTGT) localizado a dois pares de bases do éxon 2. O GH1 apresenta sete repetições e o GH2 seis repetições. Um par de *primers* específicos para os genes GH1 e GH2 que amplificam uma região comum, onde a única diferença esperada são os quatro pares de bases referentes à repetição (CTGT) a menos, anteriormente descrita em GH2, e apresenta uma diferença de aproximadamente 50pb em alguns indivíduos de tilápias, definindo assim, dois tipos de indivíduos quando usado o par de *primers*: aqueles que apresentam um só fragmento de 650 pb chamados de GHbs (GH banda simples) e os que apresentam dois fragmentos 650pb e 700pb GHbd (GH banda dupla). Ante esta observação, o objetivo da pesquisa foi caracterizar polimorfismos ainda não reportados GHbs e GHbd, por meio da técnica de sequenciamento para variedades de tilápia GIFT, Tailandesa, Bouaké e alguns dos seus cruzamentos e calcular as frequências destes polimorfismos. A partir dos resultados do sequenciamento GHbs, passou a ser chamado GH/Ho indivíduos que se encontram em homozigose com o mesmo número de repetições (CTGT) em GH1 e GH2 e GHbd como GH/He indivíduos que se encontram em heterozigose com número diferente de repetições (CTGT) em GH1 e GH2. Sendo assim, os outros objetivos, como avaliar a relação que existe entre os polimorfismos GH/Ho e GH/He com as características de desempenho, sendo feita avaliação do crescimento de tilápias GIFT x

Tailandesa num período de 150 dias e analisar o crescimento hipertrófico e hiperplásico do músculo branco aos 30-60-90 e 120 dias de idade das tilápias, sendo coletado músculo lateral direito que foi incluído em parafina para cortes semi-seriados e coloração hematoxilina-eosina. Os resultados do sequenciamento mostraram que, quando feitos os alinhamentos das sequências dos genótipos GHbs e GHbd, estes apresentam mutações pontuais como transversões, transições e deleções, quando comparadas com as sequências dos genes GH1 e GH2. Também foi descrito que os indivíduos podem estar tanto em homozigose (GH/Ho) ou heterozigose (GH/He) com relação ao número de repetições do microssatélite (CTGT) em GH1 e GH2. As frequências dos genótipos na variedade Tailandesa e cruzamento GIFT x Tailandesa apresentaram 50% de GH/He e GH/Ho, GIFT da quinta geração proveniente de um programa de melhoramento apresentou 90% de GH/Ho e cruzamentos GIFT x Bouake (GxB) verificou-se 100% de indivíduos GH/He. Nos resultados para as características morfométricas e de desempenho, foi observado efeito significativo do padrão de amplificação GH/He para peso final (PF), ganho em peso (GP), comprimento total (CT), comprimento de cabeça (CCAB), peso de cabeça (PCAB), peso de peixe eviscerado (PPEvis) e peso do filé sem pele (PFilé). As avaliações histológicas das fibras musculares brancas dos genótipos não apresentaram diferença significativa nas frequências para a maioria das idades consideradas. Podemos concluir que, tanto GH1 e GH2 podem apresentar 6 ou 7 repetições do microssatélite CTGT, outros polimorfismos de baixa frequência podem ser encontrados na região estudada do gene GH na variedade GIFT e as frequências de GH/Ho ou GH/He podem estar associadas à variedade. Nas avaliações do desempenho, os indivíduos GH/He apresentaram diferenças significativas para algumas características, no entanto, é preciso um estudo que verifique se existe alteração nos aminoácidos ou regiões regulatórias do gene GH, já no crescimento do músculo branco não se encontram diferenças entre os polimorfismos.

**Palavras-chave:** Fibras musculares, Desempenho, Polimorfismos, tilápia.

## **ABSTRACT**

The growth hormone gene (GH) has been a point of study for many researchers because it has been shown that it acts in various physiological processes. Molecular techniques such as sequencing have enabled access to the genomic structure information of GH gene and its polymorphisms, some of these correlated with improved performance and/or production. Tilapia have two GH called GH1 and GH2 their genomic sequences are in the GENBANK database with access numbers of M97766.1 and M97765, respectively, when done the alignment of these sequences we found a high homology. However, there is the repetition of a microsatellite (CTGT) located at two base pairs of the exon 2, the GH1 has seven replications and GH2 has six replications. A pair of specific primers for the GH1 and GH2 genes that amplify a common region, where the only expected difference are the four base pairs relating to repetition (CTGT) at least, previously described in GH2, shows a difference of approximately 50bp tilapia in some individuals of tilapia, thus defining two types of individuals when using the primer pair, those with a single fragment of 650bp called GHbs (GH single band) and those with two fragments 650pb and 700pb GHbd (GH band double). Given this observation the research objective was to characterize polymorphisms not yet reported GHbs and GHbd by sequencing technique for varieties of GIFT tilapia, Thai, Bouaké and some of its crossings and calculate the frequencies of these polymorphisms. From the results of sequencing GHbs came to be called GH/Ho individuals who are homozygous with the same number of repetitions (CTGT) in GH1 and GH2 and GHbd as GH/He individuals who are heterozygous with different number of repetitions (CTGT) in GH1 and GH2. Thus, the other objectives were to evaluate the relationship between the polymorphisms GH/HO and GH/He with the performance characteristics polymorphisms, assessing the growth of tilapia GIFT x Thai in a period of 150 days and analyze the hyperplastic and hypertrophic growth of white muscle at 30-60-90 and 120 days of age tilapia, being collected right lateral muscle which was insert paraffin for semi-serial cuts and hematoxylin-eosin staining. The results of

sequencing revealed that, when made the sequences alignments of genotypes GHbs and GHbd these have mutations as transversions, transitions and deletions when compared to the sequences of the GH1 and GH2 genes. It was also described that individuals can be either homozygous (GH/Ho) or heterozygous (GH/He) with respect to the number of the microsatellite repeats (CTGT) in GH1 and GH2. The genotype frequencies in Thai variety and crossing Thai Thai x GIFT showed 50% of GH/HE and GH/Ho, GIFT of fifth generation from a breeding program showed 90% of GH/Ho and crossing GIFT x Bouake (GXB) found up 100% of individuals GH/He. The results of the morphometric and performance was a significant effect of amplification pattern GH/He for final weight (FW), weight gain (WG), total length (TL), head length (CCAB), head weight was observed (PCAB), weight of gutted fish (PPEvis) and weight of skinless fillet (pFILE). Histological evaluations of white muscle fibers of the genotypes showed no significant difference in the frequencies for most ages considered. We can conclude that both GH1 and GH2 may have 6 or 7 repeats of microsatellite CTGT, other low-frequency polymorphisms can be found in the studied region of the GH gene in variety GIFT and frequencies of GH/HO or GH/He may be associated with variety. Evaluations of performance the GH/He individuals showed significant differences for some features, however, it takes a study to examine whether there is change in the amino acid or regulatory regions of the GH gene, yet in the growth of white muscle there are no differences between the polymorphisms.

**Key Words:** Growth Hormone, Polymorphisms, tilapia.

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Origem e características de tilápias do Nilo

Nativas da África, Israel e Jordânia, antigamente as tilápias eram classificadas taxonômicamente por importância comercial em um único gênero. Já na metade dos anos 70, foram separadas por comportamento de incubação dos ovos, aquelas que incubam externamente (*Tilapia spp*) daquelas que incubam na boca, classificando estas últimas no gênero *Sarotherodon*. Novamente, no início dos anos 80, o gênero *Sarotherodon* foi dividido, separando aquelas que tinham incubação maternal (*Oreochromis spp*), daquelas que tinham comportamento paternal e biparental (*Sarotherodon spp*) (Popma & Lovshin, 1995).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) pertence à família dos ciclídeos e é um peixe rústico de alimentação Omnívora e filtradora (micrófaga) e, em algumas etapas de alevinagem, podem mostrar canibalismo, apresentam fácil reprodução, carne branca de boa qualidade, com bom valor de mercado, baixos custos de produção e se adaptam bem a diferentes sistemas de cultivo, suportam temperaturas baixas e águas salobras. Um dos maiores problemas para o cultivo é sua reprodução precoce, no entanto, nos sistemas de cultivo são empregados apenas os alevinos machos, sexados manualmente ou revertidos através de hormônios sexuais (Popma & Lovshin, 1995).

### 1.2 Mercados de Tilápia

No ano de 2010, na produção mundial de peixes de água doce, as tilápias apresentaram a segunda espécie de maior produção na aquicultura (Figura 1), entre os maiores produtores de tilápia estão a Ásia com 72% da produção mundial, seguida pela África e América do Norte (FAO 2012).

Segundo dados do boletim estatístico do ministério de pesca e aquicultura do Brasil-2010, na produção aquícola continental discriminada por espécie, a tilápia e a carpa são às espécies mais cultivadas somando um 63,4% da produção nacional de pescado, sendo que as regiões que mais cultivam tilápia são o Nordeste, Noroeste Paulista e Sudeste.

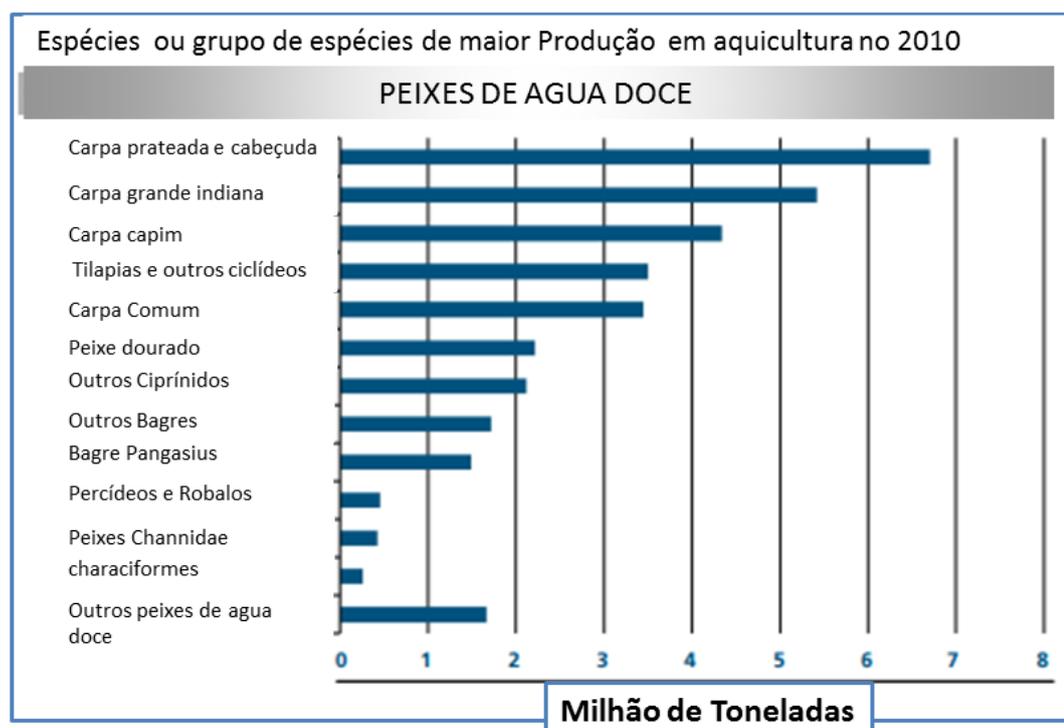


Figura 1. Espécies ou grupos de maior produção na aquicultura no ano 2010. Fonte FAO (2012).

A grande diversidade de apresentações da carne de tilápia no mercado faz dela um dos produtos mais populares no comércio de peixes, encontrando-se: tilápia eviscerada fresca e congelada, inteira ou em filés sem pele ou com pele. No entanto, este último é menos comum (Sousa, 2002, Pereira & Gameiro, 2007).

Quando comparadas as diferentes espécies de tilápias, é a *Oreochromis niloticus* a mais empregada na indústria da filetagem, por exibir características de interesse zootécnico como, carne branca e textura firme (Moreira, 2007). Entre as apresentações de produto final de tilápia, a mais comercializada é o filé, embora a tilápia apresente um menor rendimento de filé comparado com outras espécies (Melo, 2012).

### 1.3 Rendimentos de Tilápia

Em produção animal, as metodologias mais usadas para avaliar o crescimento corpóreo são as biometrias e pesagens, (Crepaldi et al., 2006). Outras metodologias como tomografia computadorizada e ressonância magnética para avaliar a composição centesimal dos peixes ainda têm menor uso devido ao alto custo (Melo, 2012).

Nos peixes, as medidas morfométricas ou biometrias descrevem a forma do corpo do peixe e esta pode variar dependendo da capacidade diferencial de acúmulo de massa muscular em diferentes partes do corpo que ocorre durante o processo de crescimento, influenciando no formato e rendimentos corporais. Assim, é possível a seleção indireta de genótipos superiores por meio de coeficientes de correlação linear de características de interesse que apresentem alta herdabilidade (Melo, 2012).

O rendimento é influenciado pelo formato do corpo. Peixes com formato fusiforme devido à massa muscular cilíndrica apresentam melhores rendimentos que peixes comprimidos lateralmente. Alguns autores constataram que peixes com cabeça maior em relação ao corpo apresentam menor rendimento de filé, quando comparados aos de cabeça menores (Eyo, 1993; Melo, 2012). Boscolo et al., (2001) postularam que maiores valores nas relações largura/comprimento e largura/altura indicam peixes mais robustos.

As biometrias que geralmente são realizadas consistem em medições das características do corpo do peixe como exibido na Figura 2. São coletados dados do peso do peixe inteiro, peixe sem vísceras, peso da cabeça, peso das vísceras, peso do fígado, peso da pele, peso do filé entre outros. Com isto, são calculados os rendimentos, razões morfométricas e índices, para as avaliações de crescimento comparativo de variedades, teste de rações ou mesmo seleção genética.

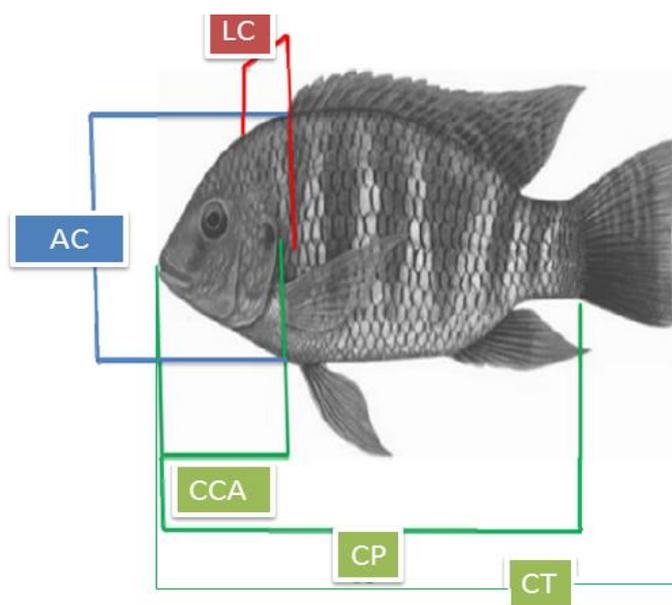


Figura 2. Medidas morfométricas que geralmente são avaliadas nos peixes, onde CT: comprimento total, CP: comprimento padrão; CCA: comprimento da cabeça; AC: altura do corpo; LC: largura do corpo. Adaptado: Melo (2012).

## 2. Desenvolvimento e crescimento muscular

O tecido muscular esquelético estriado é de grande importância para a produção de carne nos peixes, e constitui 40 a 75% do peso total (Carani et al., 2008). A unidade de organização estrutural do músculo esquelético são as fibras musculares (Carani et al., 2008).

O desenvolvimento muscular inicia-se durante a fase embrionária do animal. As células somáticas mesodermis dependentes dos sinais indutivos formam células precursoras miogênicas que, por sua vez, dão origem aos mioblastos (células mononucleadas). Estes mioblastos se fusionam gerando miotubos multinucleados com seus núcleos localizados na região central que maturados migram para a periferia formando as miofibras e aumentando a síntese e acúmulo de proteínas miofibrilares que ajudam na contínua formação de miofibrilas (figura 3). Nem todos os mioblastos se fundem, alguns permanecem quiescentes entre a membrana plasmática da fibra muscular e a lâmina basal, sendo nomeadas de células satélites ou mioblastos adultos indiferenciados (Dal Pai-Silva & Carvalho, 2007; Mareco, 2012).

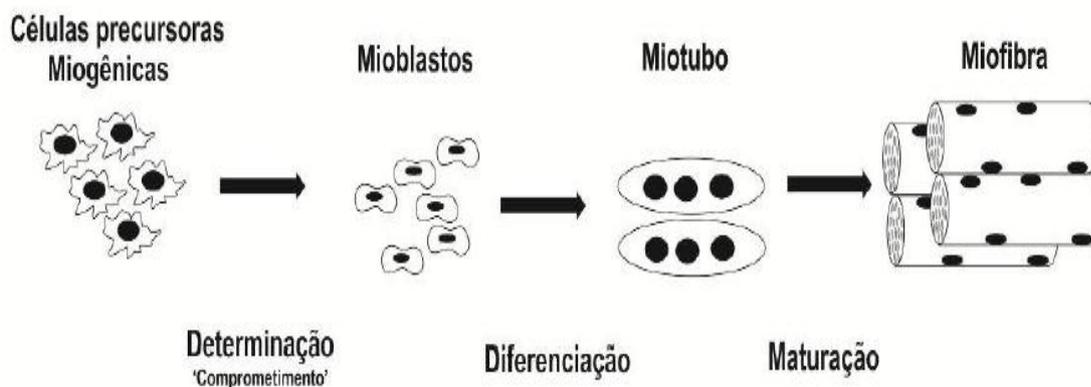


Figura 3. Processo das fibras musculares. Fonte: (Mareco, 2012).

As fibras musculares são classificadas em vermelhas que apresentam pequeno diâmetro (entre 25 á 45  $\mu\text{m}$ ), brancas (50 á 100  $\mu\text{m}$ ) e intermediárias que possuem propriedades morfofisiológicas intermediárias em relação às das fibras musculares brancas e vermelhas e apresentam contração rápida com metabolismo oxidativo/glicolítico (Almeida, 2011). Estes três tipos de fibras se encontram organizadas em compartimentos específicos. O compartimento vermelho ocupa aproximadamente 5 a 15% em relação a toda a musculatura miotomal, apresenta uma contração lenta e metabolismo oxidativo, o compartimento branco corresponde aproximadamente 70% do volume total do tecido muscular, possui contração rápida e metabolismo glicolítico, carece de capilares sanguíneos e contém baixas concentrações de mioglobinas e mitocôndrias (Almeida, 2011).

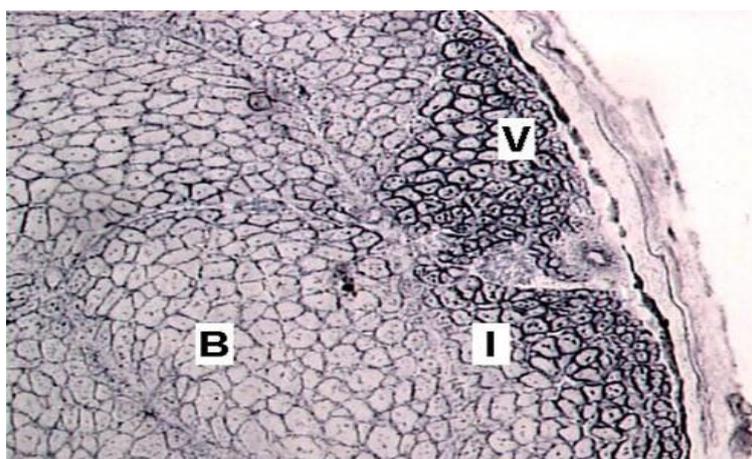


Figura 4. Corte transversal da musculatura estriada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), após a reação de NADH-TR (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzido-tetrazólio-redutase), demonstrando a musculatura distribuída em compartimentos Vermelho (v), Intermediário (i) e Branco. In: Expressão gênica de fatores que controlam o crescimento muscular de Pacu (Almeida, 2011).

Na maioria das espécies de peixes, existe um crescimento muscular indeterminado que ocorre por dois processos, um é a hiperplasia e hipertrofia. A primeira é denominada quando há um aumento do número de fibras musculares, e este processo de crescimento é mais evidente durante a fase juvenil; já na hipertrofia, acontece quando as células satélites ativadas se unem com fibras musculares existentes, levando ao aumento no diâmetro ou área da fibra muscular, sendo mais frequente na fase adulta do animal (Almeida et al., 2008). Tanto a hipertrofia como a hiperplasia acontecem por todo o período de crescimento pós-embrionário da musculatura estriada. No entanto, a contribuição do tipo de crescimento muscular é relativa e pode depender da fase de crescimento, tipo de músculo e da espécie (Dal Pai-Silva et al., 2003).

### 3. Hormônio do Crescimento

O hormônio do crescimento (GH) é uma proteína constituída por cadeias polipeptídicas longas com 191 aminoácidos em mamíferos (Nunes, 1991) e 188 aminoácidos com 5 resíduos de cisteína em carpa (Peter & Marchant, 1995) com um peso aproximado de cerca de 22 kDa e chamado de hormônio hipofisiário devido ao local de origem a hipófise sendo regulado pelo hipotálamo. Estimula o crescimento por ação direta sobre alguns tecidos e grande parte de seus efeitos através de substâncias intermediárias chamadas fatores de crescimento semelhante à insulina ou IGFs (Moriyama et al., 2000).

Reconhecido como um dos principais controladores do crescimento nos peixes o GH tem sido isolado para várias espécies como a carpa (Chien-Shun et al., 1990), salmão (Komourdjian et al., 1976, 1978; Komourdjian & Idler, 1979), tilápia (Rentier-Delrue et al., 1989; Ber & Daniel, 1992), truta arco-íris (Agellon et al., 1988), atum (*Thunnus thynnus*) (Sato et al., 1988) e charuteiro do Japão (*Serióla quinqueradiata*) (Watahiki et al., 1988).

A estrutura genômica do GH varia entre as espécies. A Tabela 1 apresenta a homologia que existe do gene GH, comparando diferentes espécies, em carpas, por exemplo. Esta consiste em cinco éxons e quatro íntrons, como é observado em mamíferos e aves (Tanaka et al., 1995), enquanto que o gene do GH de tilápias do Nilo é composto por seis éxons e cinco íntrons, igual ao GH de truta arco-íris (Agellon et al., 1988), o salmão do Atlântico (Johansen et al., 1989; Male et al., 1992), salmão chinook (Du et al., 1993) e dourada – *Sparus aurata* (Sánchez-Ramos et al., 2004) entre outros.

**Tabela 1.** Análise de homologia do hormônio de crescimento para várias espécies.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Carpa cabeçuda (1)	100									
Salmão (2)	68	100								
Tilapia (3)	56	67	100							
Atum (4)	54	66	89	100						
Enguia (5)	52	48	45	46	100					
Tubarão (6)	49	36	47	42	45	100				
Sapo (7)	44	42	43	40	52	53	100			
Tartaruga (8)	45	40	45	40	58	68	64	100		
Frango (9)	45	40	46	38	57	60	63	89	100	
Bovino (10)	43	37	38	37	53	61	56	76	78	100

Fonte: Chang et al., (1992)

Polimorfismos no GH têm sido associados a características de produção em animais de interesse zootécnico, como em suínos (Faria et al., 2006), touros (Schlee et al., 1994), touros Brangus (Thomas et al., 2007), codornas (Marques, 2009), peixe *Tinca tinca* L. (Kocour & Kohlmann, 2011) e salmão (Gross & Nilsson, 1999). Estes polimorfismos de DNA podem estar localizados ao longo do genoma em regiões codificantes ou não codificantes, dentro de um gene ou entre genes. Regiões exônicas de genes têm sido o alvo da maioria dos estudos, mas existe uma evidência crescente de que as regiões de não codificação de genes também explicam diferentes fenótipos de características de produção (Ibeaghaawemu et al., 2008)

#### 4. Sequenciamento

O processo para determinar a ordem dos nucleotídeos de um fragmento de DNA, RNA ou uma sequência de aminoácidos de uma proteína é chamada de sequenciamento. Esta técnica surgiu em meados dos anos 70, onde por meio da fragmentação de uma cadeia de DNA e usando diversas moléculas químicas marcadas visíveis a radiação, estes fragmentos eram evidenciados em gel de eletroforese (Sanger, 1977).

Nos anos 80, avanços tecnológicos e um melhor conhecimento das moléculas permitiram implementar uma técnica conhecida como método de Sanger automatizado ou técnica dideoxi ou dideoxi . Esta consiste na utilização de nucleotídeos que carecem de grupo hidroxila no carbono 3' (dideoxinucleótidos). Tendo como fundamento o processo de replicação do DNA, estes dideoxinucleótidos (ddNTP) quando ligados ao DNA em replicação

impedem a elongação do fragmento devido á falta do grupo hidroxilo terminal 3' que é onde normalmente se adiciona o nucleotídeo seguinte. Quando feita a solução com quatro réplicas (número de nucleotídeos) contendo o DNA molde de fita simples, o *primer* ou sequência iniciadora, DNA polimerase e os dNTP (dinucleotídeos trifosfato) é adicionada uma pequena quantidade em cada microtubo de um dos ddNTP ( ddATP, ddTTP, ddGTP e ddCTP). Assim, em cada reação se produzirão DNA de distintos tamanhos, terminadas todas no local onde se inseriu o ddNTP correspondente, que são submetidos a eletroforeses. Assim se obtém um padrão e separação das bandas por peso molecular, os ddNTP emitem uma fluorescência uma cor para cada quando é iluminado por um feixe de laser que fica num local do gel e à medida que elas atravessam este ponto são identificadas (Sanger & Stoiber, 2001).

Um sistema de microcâmeras sensoras transformam os sinais de leitura da fluorescência num gráfico (eletroferograma) que é formado por picos representando os fragmentos. Picos altos e agudos apresentam uma boa qualidade e maior confiabilidade na base lida.

Nos anos 90, apareceram os sequenciadores de última geração onde os géis são substituídos por um feixe de capilares cobertos por um polímero e a fluorescência de cada capilar é detectada individualmente evitando comprometimento do resultado por causas de desalinhamentos, o que ocorre com os géis na eletroforeses. E, tanto sequenciadores automáticos como sequenciadores de capilares são utilizados amplamente (figura 5). No entanto, o capilar comparado com o método de Sanger automatizado é mais rápido e completamente automatizado (Varuzza, 2013).

O resultado do sequenciamento é uma representação linear da sequência de nucleotídeos, que faz referência à estrutura da molécula sequenciada. Essas sequências são analisadas e geralmente alinhadas com sequências já descritas que se encontram depositadas em bancos genômicos com sequências de ácidos nucléicos, aminoácidos e estruturas de proteínas. Alguns destes bancos são: GenBank, o DDBJ (DNA Data Bank of Japan, o PDB (Protein Data Bank) e o EBI (European Bioinformatics Institute), entre outros. O alinhamento é feito por programas disponíveis na internet, com isto se pode determinar o grau de similaridade entre dois ou mais fragmentos (Varuzza, 2013).

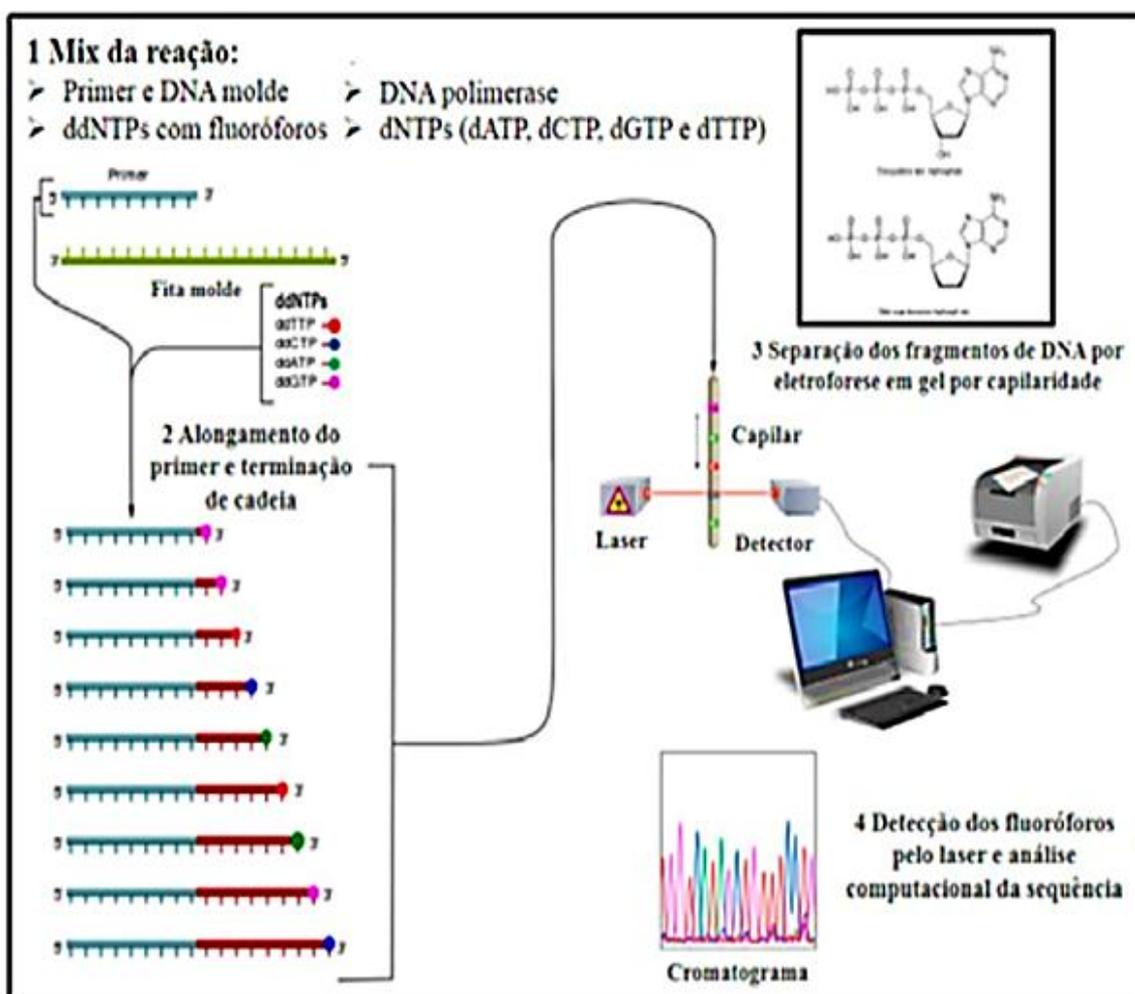


Figura 5. Modelo esquemático de uma reação de sequenciamento automatizado. Fonte: Oliveira et al., 2014.

## 5. Microssatélites

Microssatélites são segmentos genômicos ou pequenas sequências nucleotídicas que se repetem em tandem. Podem variar de 2 a 6 unidades de pares de base (Parker et al., 1998). Também são conhecidos como simples Sequências Repetidas (SSRs) sendo utilizados como marcadores moleculares devido a que podem apresentar polimorfismos (Ferreira & Grattapaglia, 1995) entre indivíduos dentro de uma espécie.

Estes polimorfismos podem ser conferidos por variações no comprimento, alelos entre os indivíduos ou mutações. Apresentam uma herança mendeliana codominante portanto, podem ser identificados indivíduos homozigotos e heterozigotos.

A utilização de microssatélites é de grande interesse nas pesquisas na aquicultura (Chistiakov et al., 2006) sendo empregados para diversas informações, por exemplo: Lee et

al., (2005) utilizaram os microssatélites para a construção de mapas de ligação para *oreochromis spp*, sendo que, estes podem ser empregados para o mapeamento de características quantitativas economicamente importantes, a partir da identificação dos genes responsáveis por estas. Rodriguez- Rodriguez et al., (2013) caracterizaram por meio de microssatélites material genético de tilápias do Nilo, em diferentes gerações de seleção.

Almuly et al., (2005), comparando as sequências nucleotídeos de populações de *Sparus aurata*, revelou que microssatélites com diferentes números de repetições na região promotora do gene GH podem ser candidatos a marcadores genéticos para programas de seleção.

Além disso, os microssatélites têm aplicações em programas de conservação da variabilidade genética, fluxo gênico, migração e diferenciação e avaliação dos estoques cultivados. Existem bibliotecas genômicas ou bancos de dados de biologia molecular (BDBM) que se encontram disponíveis à comunidade científica, onde podem ser encontrados microssatélites já caracterizados. Alguns destes, GenBank Sequence, Genome Database (GDB) e DNA Data Bank of Japan (DDBJ) entre outros (Espindola et al., 2009).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGELLON, L.B.; DAVIES, S.L.; LIN, C.M.; CHEN T.T.; POWERS, D.A. Rainbow trout has two genes for growth hormone. **Molecular Reproduction and Development**, v.1 p.11–17, 1988.

ALMEIDA, F. L. A.; CARVALHO, R. F.; PINHAL, D. et al. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus*) Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. **Micron**, v.39, p.1306 – 1311, 2008.

ALMEIDA, F. L. A. **Expressão genica de fatores que controlam o crescimento muscular do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2011. 127p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas– Campinas.

ALMULY, R.; POLEG-DANIN, Y.; GORSHKOV, S.; GORSHKOVA, V.; RAPOPORT, B.; SOLLER, M.; KASHI, Y.; FUNKENSTEIN, B. Characterization of the 5 flanking region of the growth hormone gene of the marine teleost, gilthead sea bream *Sparus aurata*: Analysis of a polymorphic microsatellite in the proximal promoter. **Fisheries science journal**, v.71, p.479-490, 2005.

BER, D.; DANIEL, V. Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from tilapia Nilotica. **Gene**, v.113, p.245-250, 1992.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; MEURER, F.; FEIDEN, A.; WOLFF, L. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*),

variedade Tailandesa e Comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

CARANI, F.R.; AGUIAR, D.H.; ALMEIDA, F.L.A.; GONÇALVES, H.S.; PADOVANI, C.R.; DAL PAI M.S. Morfologia e crescimento do músculo estriado esquelético no pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier, 1817 (Teleostei, Arapaimidae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**. v. 30, n. 2, p. 205-211, 2008.

CHANG, Y.S.; LIU, T.C.S.; HUANG, F. L.; Lo, T. B. The Primary Structures of Growth Hormones of Three Cypriniid Species: *Bighead Carp*, *Silver Carp*, and *Grass Carp*. **General and comparative endocrinology**, v. 87, p.385-393, 1992.

CHIEN-SHUN, C.; HUANG-TSU, C.; WEN-CHANG, C. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). **Biochimica et Biophysica Acta, Elsevier**. v.1087. p. 91-94, 1990.

CHISTIAKOV, DA; HELLEMANS, B E VOLCKAERT, .FA.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special references to fish genetics. **Aquaculture**, n.255, p. 1-29, 2006.

CREPALDI, D.V.; FARIA, P. M.C.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A.A. P.; MELO, D.C.DE.; CINTRA, A.P.R.; PRADO, S. DE A. COSTA, F .A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; MORAES, V. E. DE. A situação da Aquicultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.30, p.81-85, 2006.

DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R. F.; PELLIZZON, C. H.; PAI, V. DAL. Muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) histochemical, ultrastructural and morphometric study. **Tissue and Cell**, v.35, p.179-187, 2003.

DAL PAI-SILVA, M. & CARVALHO, R. F.; Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.36, p.21-31, 2007.

DU, S.J.; DEVLIN, R.H.; HEW, C.L. Genomic structure of growth hormone genes in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): presence of two functional genes, GH-I and GH-II, and a male specific pseudogene, GH-q **DNA and Cell Biology**, v.12, p. 739-751, 1993.

ESPINDOLA, F.S.; CALÁBRIA, L.K.; REZENDE, A.A.A.; PEREIRA, B.B.; SANTANA, F.A.; AMARAL, I.M.R.; FRANÇA, V. J.; MARIO, J.L.; FIGUEIREDO, L.B.; SANTOS-LOPES; L.P.; GOUVEIA; N.M.; NASCIMENTO, R.; TEIXEIRA; R.R.; REIS, T.A.; ARAÚJO, T.G. Recursos de bioinformática aplicados às ciências ômicas como genômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 3, p. 463-477, 2010.

EYO, A.A. Carcass composition and filleting yield of ten fish species from Kainji Lake: proceedings of the FAO expert consultation on fish technology in Africa. **FAO Fisheries Report**, Rome, n. 467, p. 173-175, 1993.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2012**. FAO Fisheries and Aquaculture Department. food and agriculture organization of the united nations. Roma 2012. 207 p. <http://www.fao.org/icalog/inter-e.htm>. p. 3- 207. Acesso em: Janeiro de 2014.

FARIA, D.A. de; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; PIRES, A.V.; PAIVA, S.R.; SOLLERO, B.P.; WENCESLAU, A.A. Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.634-640, 2006.

FERREIRA, M. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. EMBRAPA – CENARGEM, 2ª edição, Brasília (DF), 1995, 220p.

GROSS, R. & NILSSON, J. Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. **Aquaculture**, v. 173, p. 73–80, 1999.

IBEAGHA-AWEMU, E. M.; KGWATALALA, P.; ZHAO, X. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. **Mamm Genome**, v.19, p.591–617, 2008.

JOHANSEN, B.; JOHNSEN, O.C.; VALLA, S. The complete nucleotide sequence of the growth hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Gene**, v.77, p.317-324, 1989.

KOCOUR, M. & KOHLMANN, K. Growth hormone gene polymorphisms in tench, *Tinca tinca* L. **Aquaculture**. v. 310, p. 298–304, 2011.

KOMOURDJIAN, M. P.; SAUNDERS, R. L.; FENWICK, J.C. Evidence for the role of growth hormone as a part of a "light-pituitary axis" in growth and smoltification of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 54, p. 544-551. 1976.

KOMOURDJIAN, M. P.; BURTON, M. P.; IDLER, D. R. Growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, after hypophysectomy and somatotropin therapy. **General and Comparative Endocrinology**, v.34, p. 158-162. 1978.

KOMOURDJIAN, M.P. & IDLER, D. R. Chum salmon pituitary fractions: Somatotropic activity and cytoimmunofluorescence studies. **General and Comparative Endocrinology**, v.37, p. 343-349. 1979.

Lee, B.Y.; Lee, W.J.; Streebman, J.T.; Carleton, K.L.; Howe, A. E.; Hulata, G.; Slettan, G.; Stern, J.E.; Terai, Y.; Kocher, T.D. A Second-Generation Genetic Linkage Map of Tilapia (*Oreochromis spp.*) **Genetics**, v.170, p: 237–244, 2005.

MALE, R.; NERLAND, A.H.; LORENS, J.B.; TELLE, W.; LOSSIUS, I.; TOTLAND, G.K. The complete nucleotide sequence of the Atlantic salmon growth hormone I gene. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1130, p.345-348, 1992.

MARECO, A.E. **Efeitos da temperatura na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade GIFT**. 2012. 63p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências de Botucatu. Botucatu– São Paulo.

MARQUES, D.S. **Polimorfismos no gene do hormônio do crescimento em variedades de codorna (*coturnix japonica*) e sua associação com características de desempenho**. 2009. 73p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá. Maringá-Paraná.

MELO, C.C.V. **Efeitos diretos e indiretos das medidas e razões morfométricas sobre os rendimentos corporais da tilápia do nilo *oreochromis niloticus***. 2012. 46p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras.

MOREIRA, A.A.; HILSDORF, A.W.S.; SILVA, J.V.; SOUZA, V.R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, p.521-526, 2007.

MORIYAMA, S. AYSON, F.G; KAWAUCHI, H. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.64. p. 1553-1562, 2000.

NUNES, M. T. A Glandula Hipofise. In: AIRES, M.M. De. (Org.). **Fisiologia**. Rio de janeiro: Guanabara-koogan, Cap. 63, 1991, p. 679-695.

OLIVEIRA, J. A. DE.; CRISPIM, B. A.; PEREIRA, R. M.; SENO, L. DE O.; VARGAS, J.F. M.; RISOLIA, A. B. Sequenciamento de DNA Mitochondrial para Avaliação de diferenças genéticas em ovinos (*Ovis aries*) **Journal of the Selva Andina Animal Science**, v.1, p.11-20.2014

PEREIRA, E.P. & GAMEIRO, A.H. Análise da tilapicultura brasileira com ênfase no comércio internacional. In: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2007, Londrina. **Anais**, Londrina, XLV congresso da SOBER, 2007. p. 1-14.

PETER, R.E & MARCHANT, T.A. The endocrinology of Growth in Carp and related species. **Aquaculture**. v.129. p. 299-321, 1995.

POPMA, T.J. & LOVSHIN, L.L. **Worldwide Prospects for Commercial Production of Tilapia**. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments, Department of Fisheries and Allied Aquacultures, Auburn University, Alabama. p.38. 1995.(Commercial tilapia production).

RENTIER-DELRUE, F.; SWENNEN, D.; MERCIER, L.; LION, M.; BENRUBI O.; MARTIAL, J.A. Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA: expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli*. **DNA**. v.8, p.109-117,1989.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.DEL.P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.D.; ALBUQUERQUE, D.M.; GOES, E.S. R.; O.P.P.; RIBEIRO, R.P. Caracterização genética de gerações de tilápia Gift por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília**, v.48, n.10, p.1385-1393, 2013.

SÁNCHEZ-RAMOS, I.; CROSS, I.; REBORDINOS, L. Determination of RFLP's in genes related to growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In: ADAMS, S.; OLAFSEN, J.A.

(Ed.). *Biotechnologies for quality: extended abstracts and short communications*. Barcelona: **European Aquaculture Society**, p.713-714, 2004.

SANGER, F.; NICKLEN S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, **Biochemistry**. v.74, p. 5463-5467, 1977.

SANGER, A. & STOIBER, W. Muscle fiber diversity and plasticity. In I. a Johnston (Ed.), **Fish physiology**. v.18, p. 187–250, 2001.

SATO, N.; WATANABE, K.; MURATA, K.; SAKAGUCHI, M.; KARIYA, Y.; KIMURA, S.; NONAKA, M.; KIMURA, A. Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.949, p.35-42, 1988.

SCHLEE, P.; GRAML, R.; SCHALLEMBERGER, E.; SCHAMS, D.; ROTTMANN, O. et al. Growth hormone and insulin-like growth factor-1 concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88 p.497–500, 1994.

SOUZA, M.L.R. Comparação de Seis Métodos de Filetagem, em Relação ao Rendimento de Filé e de Subprodutos do Processamento da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) Revista Brasileira de Zootecnia, v.31, n.3, p.1076-1084, 2002.

TANAKA, M.; TOMA Y.; OHKUBO, T.; SUDO, S.; NAKASHIMA, K. Sequence of the flounder growth hormone encoding gene and its promoter region. **Gene**, v.165, p. 321–322, 1995.

THOMAS, M.G.; ENNS, R.M.; SHIRLEY, K.L.; GARCIA, M.D.; GARRETT, A.J. Associations of DNA polymorphisms in growth hormone and its transcriptional regulators with growth and carcass traits in two populations of Brangus bulls. **Genetics and Molecular Research**, v.6, p.222–237, 2007.

WATAHIKI, M.; TANAKA, M.; MASUDA, N.; YAMAKAWA, M.; YONEDA, Y.; NAKASHIMA. cDNA cloning and primary structure of yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) pregrowth hormone. **General and Comparative Endocrinology**, v. 70, p. 401-406, 1988.

VARUZZA, L. Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração. Apostila de bioinformática, 76p, 2013.

## **OBJETIVOS GERAIS**

Sequenciar e caracterizar os polimorfismos GHbs e GHbd do gene do hormônio do crescimento em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) nas variedades GIFT, Tailandesa, Bouaké e cruzamentos GIFT x Bouaké, GIFT x Tailandesa.

Associar o desempenho zootécnico comparando os polimorfismos caracterizados no sequenciamento como GH/Ho e GH/He do gene do hormônio do crescimento em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cruzamento GIFT x Tailandesa.

Avaliar por histologia o crescimento do músculo branco em quatro idades diferentes em tilápia do Nilo, comparando dois polimorfismos GH/Ho e GH/He do gene do hormônio do crescimento.

## **II. Caracterização de polimorfismos do gene do hormônio do crescimento em variedades de tilápia do Nilo**

**Resumo** – Quando é amplificada uma região comum de aproximadamente 650 pb dos genes do hormônio de crescimento GH1 e GH2, onde somente é esperada uma diferença de 4 pb devido á falta de uma repetição do microssatélite (CTGT) em GH2, sendo que GH1 apresenta 7 repetições. Observa-se que alguns indivíduos de tilápia designados GH banda simples (GHbs) apresentam um fragmento de 650 pb e outros designados GH banda dupla (GHbd) apresentam dois fragmentos, um de 650 pb e outro de 700pb indicando uma diferença de aproximadamente 50 pb. Para entender o aparecimento do fragmento de 700 pb, objetivou-se o sequenciamento dos polimorfismos GHbs e GHbd em diferentes variedades e cruzamentos de tilápia, além de calcular as frequências destes polimorfismos. O sequenciamento revelou mutações pontuais, deleções e o alinhamento das sequências mostraram que indivíduos GHbs de tilápia Tailandesa, encontram-se homocigotos para o número de repetições do microssatélite (6 ou 7). Indivíduos GHbd, mostram que o fragmento 650 pb faz referência aos genes do GH e o fragmento de 700pb mesmo que não apresente homologia com os genes do GH é similar em todas as variedades analisadas. Quando observados indivíduos GHbd em gel de poliacrilamida, nota-se dois fragmentos possíveis da heterocigose com relação ao número de microssatélites presentes em GH1 e GH2. Também foi verificado que 100% dos indivíduos heterocigotos (GHbd) apresentam duas bandas adicionais, provavelmente produto de rearranjos genéticos que ocorrem em indivíduos heterocigotos. Nas frequências, verifica-se as seguintes porcentagens: variedade Tailandesa e cruzamento GIFT x Tailandesa 50% de GHbs e GHbd, respectivamente, GIFT 90% de GHbs e cruzamento GIFT x Bouake (GxB)

100% de indivíduos GHbd. Podemos concluir que existe mais de dois polimorfismos para a região estudada dos genes do GH, portanto, as cópias GH1 e GH2 podem apresentar-se em homozigose (6:6 e 7:7) ou em heterozigose (6:7 ou 7:6) repetições do microssatélite (CTGT) e que estes polimorfismos encontram-se em diferentes frequências nas variedades de tilápia, podendo ser úteis para definição e caracterização das variedades de tilápia do Nilo.

**Termos para indexação:** heterozigose, homozigose, polimorfismos, sequenciamento, *Oreochromis niloticus*.

## **Polymorphism characterization of growth hormone gene in varieties of Nile tilapia**

**Abstract-** When is amplified a common region of approximately 650 bp from the growth genes GH1 and GH2, which is expected a difference of only 4 bp due to repetition lack of the microsatellite (CTGT) in GH2, being that GH1 has 7 repetitions. It is observed that some tilapia individuals designated GH single band (GHbs) present a fragment of 650 bp and other designated GH dual band (GHbd) present two fragments, 650 bp and other 700pb indicating a difference of approximately 50 bp. To understand the appearance of the 700 bp fragment was aimed the sequencing and of polymorphisms GHbs and GHbd in different varieties and breeding of tilapia, besides calculating the frequencies of these polymorphisms. Sequencing revealed point mutations, deletions and sequence alignment showed that individuals GHbs of Thai tilapia, are homozygous for the number of repeats of the microsatellite (6 or 7). Individuals GHbd show that the 650 bp fragment makes reference to the GH gene and the fragment of 700 pb it does not show homology to GH genes is similar in all varieties analyzed. When observed GHbd individuals in polyacrylamide gel there are two possible fragments of heterozygous with respect to the number of microsatellites present in GH1 and GH2. It was also found that 100 % of heterozygous individuals (GHbd) present two additional bands, probably product of genetic rearrangements that occur in heterozygous individuals. The frequencies are the following percentages : Thai variety and cross GIFT x Thai 50% of GHbs and GHbd respectively, 90% of GHbsto GIFT and for cross GIFT x Bouake (GXB) 100% of individuals GHbd. We can conclude that there are more than two polymorphisms for the region study of GH genes, so the GH1 and GH2 copies may present in homozygous (6:6 and 7:7) or heterozygous (6:7 or 7:6 microsatellite repeats

(CTGT) and that these polymorphisms are found at different frequencies in varieties of tilapia , may be useful for the definition and characterization of varieties of Nile tilapia .

**Index terms:** heterozygous, homozygous, polymorphisms, sequencing, *Oreochromis niloticus*.

## Introdução

Em animais de interesse zootécnico, existem várias pesquisas envolvendo o gene do hormônio de crescimento (GH) como gene candidato para características quantitativas (Kuhnlein et al., 1997; Malveiro et al., 2001, Dybus, 2002; Jung-Ha et al., 2002; Kansaku, et al., 2003; Tambasco et al., 2003; Pereira, 2005; de Faria et al., 2006; Blank et al., 2009).

Em mamíferos, observa-se que o gene do GH é bastante conservado com uma estrutura composta por nove éxons (Maj et al., 2004). Porém, nos peixes encontra-se uma grande variação estrutural e numérica. Em algumas espécies de peixes, encontram-se dois genes GH, geralmente denominados GH1 e GH2. Evidências sugerem que os genes surgiram de um evento de duplicação, cujo ancestral comum, tanto da tilápia como dos salmonídeos, foi tetraplóide (Ber & Daniel, 1992).

Estudos em dourada (*Sparus aurata*) mostram que os dois genes GH são expressos (Saera-Vila et al., 2005). No entanto, em tilápia do Nilo, pesquisas sobre o padrão de expressão de mRNA do GH1 e GH2 são escassas, mas se sabe-se que os dois genes, são muito similares com relação aos seus transcritos e que têm uma alta homologia >99%, encontrando-se mutações pontuais nos éxon IV, V e VI (Ber & Daniel, 1992).

Nos bancos de dados genômicos, é possível encontrar a sequência do gene GH para diferentes espécies como: bovinos *Bos taurus* (M57764.1), ovinos *Ovis aries* (M37310.1), frangos *Gallus gallus* (D10484.1), suínos *Sus scrofa* (M17704.1) e para algumas espécies de peixes como salmão do Atlântico *Salmo salar* (M21573.1), truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (DQ294400.1), carpa comum *Cyprinus carpio*

(M27000.1) e tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (M84774.1), isso revela a importância desse gene, independente da finalidade dos estudos.

O gene GH apresenta sequências microssatélites, mutações pontuais e variações nas sequências que servem como marcadores naturais úteis para a classificação e estudos filogenéticos de teleósteos (Kocour & Kohlmann, 2011; Rezaei & Akhshabi, 2011; Rezaei, 2012). Os microssatélites são unidades de repetição de um a quatro nucleotídeos e que se encontram distribuídos amplamente nos genomas (Chistiakov et al., 2006), são bastante utilizados devido a que possuem altas taxas de mutação e alto grau de polimorfismo, sendo amplamente utilizados na aquicultura (Chistiakov et al., 2006).

As tilápias representam um dos peixes mais produzidos a nível mundial (FAO, 2012), sendo a tilápia do Nilo e suas variedades as mais cultivadas no Brasil (Kubitza, 2005) devido a possuir características como: resistência a doenças, rápido crescimento, tolerância a baixos teores de oxigênio dissolvido (Nogueira, 2007) e suporta cultivos intensivos (Oliveira, 2013). A tilápia é bem aceita no mercado consumidor por ter carne branca, textura firme e ausência de espinhos em forma de "Y" o que facilita a filetagem (Nogueira, 2007; Silva et al., 2009).

O objetivo desta pesquisa foi sequenciar os polimorfismos GHbs e GHbd encontrados numa região comum para o genes do hormônio do crescimento (GH1 e GH2) em diferentes variedades de tilápia do Nilo como: tilápia Tailandesa, tilápia GIFT, tilápia Bouaké e alguns dos seus cruzamentos e calcular as frequências destes polimorfismos.

## Material e Métodos

### Amostras

Para as genotipagens, foram coletadas um total de 800 amostras de nadadeira caudal, sendo 200 amostras de cada variedade. Os grupos genéticos avaliados foram: variedades de tilápia GIFT (quinta geração do programa de melhoramento DZO/UEM), variedade Tailandesa, cruzamentos GIFT x Tailandesa e GIFT x Bouaké.

### Extração, amplificação e sequenciamento do DNA.

A extração do DNA foi realizada conforme protocolo de extração alcalina, descrito por (Rudbeck & Dissing, 1998), com adaptações. Para a amplificação do DNA foram utilizados um par de *primers* específicos *Forward*= (5'-CAGCGGTGTGTTTTTCATGT-3'), *Reverse*= (5'-CGGTTCCCTTGACATCAAAT-3') descritos por Blanck et al., (2009), flanqueando os éxons 1 e 2 (Figura 1), conforme as sequências depositadas no GenBank (número de acesso M97766.1 e M97765). O DNA foi amplificado em volume de reação final de 15 µL, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por quatro minutos, 35 ciclos de 30 s a 95°C, dois minutos de anelamento a 68°C e 1 minuto e 30 s de extensão a 72°C. Uma extensão final de 72°C por 4 min (Blanck et al., 2009).

Os produtos da amplificação foram avaliados em gel de agarose a 2,0%, revelada com 0,5 µg/mL de brometo de etídio, e comparados ao padrão de peso molecular de 100 pb.



T2) genótipo gene GHbs e (T3 e T4) genótipo gene GHbd e por ultimo a variedade Bouaké (B1 e B2)genótipo GHbd.

Os fragmentos de DNA adequadamente amplificados foram purificados (Kit PureLink Invitrogen), quantificados e sequenciados em sequenciador automático (MegaBACE 1000 Amersham life Science – USA), usando o Kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare, USA), pela técnica de terminação em cadeia (Sanger et al., 1977). As seqüências geradas foram pareadas e analisadas comparativamente, usando o programa Clustal W, sendo o gene GH1 e GH2 de tilápia (M97766.1 e M97765 respectivamente), a fonte de referência.

Uma vez verificados polimorfismos com pouca diferença de pares de bases (pb) pela técnica de sequenciamento, foram feitos géis de poliacrilamida 10% denaturante com concentração Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1) com um tempo de corrida de 24H por 100v, sendo corados com nitrato de prata para visualização dos fragmentos. O marcador DNA ladder 100 pb foi utilizado como padrão de peso molecular.

## Resultados

O par de primer selecionado para esse trabalho foi desenhado visando amplificar uma região altamente conservada do GH em diferentes espécies de tilápia. Uma vez que em tilápia existem dois genes do GH, GH1 e GH2, para ter certeza de qual dos dois genes se estava amplificando, uma diferença de 4 pares de bases (CTGT) era esperada nos amplicons. Entretanto, verificamos que a diferença em tamanho dos amplificados foi muito maior aproximadamente 50pb (Figura 2).

Os dois padrões de amplificação (GHbs e GHbd) foram visualizados em géis de agarose 2%, encontrando-se em frequências distintas entre as variedades e seus cruzamentos. Na variedade GIFT, foi observado 90% de peixes GHbs e, na variedade Tailandesa, 50% de GHbs e 50% de GHbd. Nos cruzamentos, GIFT x Bouake (GxB), foi verificado 100% de indivíduos GHbd e no GIFT x Tailandesa (GxT) foi observada uma relação 50% GHbs e GHbd. Diante dessa observação, foram selecionados dois indivíduos de cada variedade com o padrão de amplificação GHbs e GHbd para serem sequenciados (Figura 2).



Figura 2. Indivíduos escolhidos para sequenciamento, gel de agarose 2%. Variedade GIFT (G) - indivíduos GHbs = G1 e G2, cruzamentos GIFT x Bouaké (GxB) indivíduos GHbd = GxB1 e GxB2, GIFT x Tailandesa (GxT) indivíduos GHbs= GxT1 e GxT2, indivíduos GHbd= GxT3 e GxT4, variedade Tailandesa (T) GHbs indivíduos= T1 e T2 e GHbd indivíduos = T3 e T4 e variedade Bouaké GHbd indivíduos= B1 e B2. Marcador Ladder de 100 pb.



```

GH2      GACCACTGCTTTATGATATTTAACAAAGTCTGAAACTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTC---AGTC
          *****↑*****
          280      290      300      310      320      330      340
GH1      GTCCCTCCTGCTGTCGGTTGTGTGTTGGGGCGTCTCCTCTCAGCAGATCACAGACAGCCAGCGTTTGT
GHbs T1  GTCCCTCCTGCTGTCGGTTGTGTGTTGGGGCGTCTCCTCTCAGCAGATCACAGACAGCCAGCGTTTGT
GHbs G   GTCCCTCCTGCTGTCGGTTGTGTGTTGGGGCGTCTCCTCTCAGCAGATCACAGACAGCCAGCGTTTGT
GHbs GxT GTCCCTCCTGCTGTCGGTTGTGTGTTGGGGCGTCTCCTCTCAGCAGATCACAGACAGCCAGCGTTTGT
GHbs T2  GTCCCTCCTGCTGTCGGTTGTGTGTTGGGGCGTCTCCTCTCAGCAGATCACAGACAGCCAGCGTTTGT
GH2      GTCCCTCCTGCTGTCGGTTGTGTGTTGGGGCGTCTCCTCTCAGCAGATCACAGACAGCCAGCGTTTGT
          *****↑*****
          350      360      370      380      390      400      41
GH1      CTCCATTGCAGTCAACAGAGTCACGCACCTGCACCTGCTCGCCAGAGACTCTTCTCGGACTTTGTAA
GHbs T1  CTCCATTGCAGTCAACAGAGTCACGCACCTGCACCTGCTCGCCAGAGACTCTTCTCGGACTTTGTAA
GHbs G   CTCCATTGCAGTCAACAGAGTCACGCACCTGCACCTGCTCGCCAGAGACTCTTCTCGGACTTTGTAA
GHbs GxT CTCCATTGCAGTCAACAGAGTCACGCACCTGCACCTGCTCGCCAGAGACTCTTCTCGGACTTTGTAA
GHbs T2  CTCCATTGCAGTCAACAGAGTCACGCACCTGCACCTGCTCGCCAGAGACTCTTCTCGGACTTTGTAA
GH2      CTCCATTGCAGTCAACAGAGTCACGCACCTGCACCTGCTCGCCAGAGACTCTTCTCGGACTTTGTAA
          *****↑*****
          0      420      430      440      450      460      470
GH1      GCCTGCAGCAGCTCAACAATCTTTCTTTCTTTCTGAAAAAGACCAAATGTTACCTAAATCAAAGCTAAT
GHbs T1  GCCTGCAGCAGCTCAACAATCTTTCTTTCTTTCTGAAAAAGACCAAATGTTACCTAAATCAAAGCTAAT
GHbs G   GCCTGCAGCAGCTCAACAATCTTTCTTTCTTTCTGAAAAAGACCAAATGTTACCTAAATCAAAGCTAAT
GHbs GxT GCCTGCAGCAGCTCAACAATCTTTCTTTCTTTCTGAAAAAGACCAAATGTTACCTAAATCAAAGCTAAT
GHbs T2  GCCTGCAGCAGCTCAACAATCTTTCTTTCTTTCTGAAAAAGACCAAATGTTACCTAAATCAAAGCTAAT
GH2      GCCTGCAGCAGCTCAACAATCTTTCTTTCTTTCTGAAAAAGACCAAATGTTACCTAAATCAAAGCTAAT
          *****↑*****
          480      490      500      510      520      530      540
GH1      GCACAGGACAGAACTAGGTTCAAATAACGTTCAACAAAATGTTCTGGATATTCAGTGTGTGCAGTG
GHbs T1  GCACAGGACAGAACTAGGTTCAAATAACGTTCAACAAAATGTTCTGGATATTCAGTGTGTGCAGTG
GHbs G   GCACAGGACAGAACTAGGTTCAAATAACGTTCAACAAAATGTTCTGGATATTCAGTGTGTGCAGTG
GHbs GxT GCACAGGACAGAACTAGGTTCAAATAACGTTCAACAAAATGTTCTGGATATTCAGTGTGTGCAGTG
GHbs T2  GCACAGGACAGAACTAGGTTCAAATAACGTTCAACAAAATGTTCTGGATATTCAGTGTGTGCAGTG
GH2      GCACAGGACAGAACTAGGTTCAAATAACGTTCAACAAAATGTTCTGGATATTCAGTGTGTGCAGTG
          *****↑*****
          550      560      570      580      590
GH1      AGTTTAGATGCACACAGACATATGGACACATTTACATTTGATGTCAAGGGAACCGA
GHbs T1  AGTTTAGATGCACACAGACATATGGACACATTTACATTTGAT-----
GHbs G   AGTTTAGATGCACACAGACATATGGACACATTTACATTTGT-----
GHbs GxT AGTTTAGATGCACACAGACATATGGACACATTTACATTTGATGTCAAGGGAACCGG
GHbs T2  AGTTTAGATGCACACAGACATATGGACACATTTACATTTGAT-----
GH2      AGTTTCGATGCACACAGACATATGGACACATTTACATTTGATGTCAAGGGAACCGA
          *****↑*****

```

Figura 3. Alinhamentos das seqüências das GH banda simples (GHbs) para as linhagens GIFT (G) Tailandesa (T1 e T2), cruzamento entre GIFT x Tailandesa (GxT) e seqüências GH1 (M97766.1) e GH2 (M97765). Programa utilizado: CLUSTAL 2.1 - multiple sequence alignment. Em vermelho éxon 1 e 2, as setas (↑) indicam onde teve algum tipo de mutação ao igual que as letras em azul e os traços (-) onde foram apresentadas deleções.

O sequenciamento para o padrão de banda gene GHbd que é composto por dois fragmentos (650 e 700 pb) apenas foram consideradas as regiões que no resultado apresentaram picos razoavelmente bem definidos, boas linhas de base e distância entre picos anterior e posterior constantes, portanto as seqüências foram de tamanho menor que o sequenciamento de gene GHbs.

O alinhamento das sequências de 700pb com os genes GH1 e GH2 exibiram uma baixa similaridade. Porém, quando comparadas entre as linhagens Bouake, Tailandesa e cruzamento GIFT x Bouake (Figura 4) mostrar-se similaridade.

Evidenciam-se deleções nos nucleotídeos 13 e 20 tanto para variedade Tailandesa e cruzamento GxB. Apresentam-se transversões nos nucleotídeos 10, 12, 127, 129, 130 no cruzamento GxB e no nucleotídeo 74 para a variedade Tailandesa. Uma transição é observada no nucleotídeo 111 do cruzamento GxB.

```

          1      10      20      30      40      50      60
GHbd  B  ATGTCTGTGTGCATCTAACCTCACTGCACACACTGAATATCCAGAACATTTTGTGTAACGTATTTT
GHbd  T  ATGTCTGTGTGC-TCTAAC-TCACTGCACACACTGAATATCCAGAACATTTTGTGTAACGTATTTT
GHbd  GxB ATGTCTGTGAGA-TCTAAC-TCACTGCACACACTGAATATCCAGAACATTTTGTGTAACGTATTTT
          *****↑*↑-*****-*****
          70      80      90      100     110     120     130
GHbd  B  GAACCTAGTTTCTGTCTGTGCATTAGCTTTGATTTAGGTAACATTTGGTCTTTTTCAGAAAGAA
GHbd  T  GAACCTATTTTCTGTCTGTGCATTAGCTTTGATTTAGGTAACACTTTGGTCTTTTTCAGAAAGAA
GHbd  GxB GAACCTAGTTTCTGTCTGTGCATTAGCTTTGATTTAGGTAACATTTGGTCTTTTTCAGAACATCA
          *****↑*****↑*****↑*↑*↑*

```

Figura 4. Alinhamentos das sequências do gene GH banda dupla fragmento de 700 pb para as variedades de tilápia Bouaké (B), Tailandesa (T) e o cruzamento entre GIFT x Bouaké (GxB). As setas (↑) indicam onde teve algum tipo de mutação. Programa utilizado: CLUSTAL 2.1 - multiple sequence alignment.

Nas sequências do fragmento de 650 pb só os indivíduos Bouaké (**B1** e **B2**) apresentaram um melhor sequenciamento e quando alinhadas com GH1 e GH2 apresentam uma baixa similaridade, mas quando alinhadas com uma região GHbs da variedade GIFT, apresentaram maior similaridade, evidenciando-se somente uma transversão no nucleotídeo 112 (G→C) (Figura 5).

```

          1      10      20      30      40      50      60
GHbd-B B1 TCACTGCACACACTGAATATCCAGAACATTTTGTGTAACGTATTTGAACTAGTTTCTGTCTGTGC
GHbd-B B2 TCACTGCACACACTGAATATCCAGAACATTTTGTGTAACGTATTTGAACTAGTTTCTGTCTGTGC
GHbs G  TCACTGCACACACTGAATATCCAGAACATTTTGTGTAACGTATTTGAACTAGTTTCTGTCTGTGC
          *****↑*****↑*****↑*****↑*****↑*****↑*****↑*****↑*****
          70      80      90      100     110     120     130
GHbd-B B1 ATTAGCTTTGATTTAGGTAACATTTGGTCTTTTTCAGAAAGAACAAGATTGTTGAGCTGCTGCAGGC
GHbd-B B2 ATTAGCTTTGATTTAGGTAACATTTGGTCTTTTTCAGAAAGAACAAGATTGTTGAGCTGCTGCAGGC
GHbs G  ATTAGCTTTGATTTAGGTAACATTTGGTCTTTTTCAGAAAGAAGAAGATTGTTGAGCTGCTGCAGGC
          *****↑*****↑*****↑*****↑*****↑*****↑*****↑*****↑*****
          GHbd-B B1  TTACAAAGTCCGAGAAGAGTCTCTGGGCGAGCAGGTGCAGGTGCGTGACTCTGTTGACTGCAATGG
          GHbd-B B2  TTACAAAGTCCGAGAAGAGTCTCTGGGCGAGCAGGTGCAGGTGCGTGACTCTGTTGACTGCAATGG

```

GHbs G      TTACAAAGTCCGAGAAGAGTCTCTGGGCGAGCAGGTGCAGGTGCGTGACTCTGTTGACTGCAATGG  
 \*\*\*\*\*

Figura 5. Alinhamentos GH banda dupla – fragmento de 650 pb. Tilápias Bouaké (B1 e B2) comparadas com GH banda simples da variedade GIFT (G), as setas (↑) e nucleotídeos em azul indicam onde teve algum tipo de mutação. Programa utilizado: CLUSTAL 2.1 - multiple sequence alignment.

A visualização dos amplicons em géis de poliacrilamida revelou que o padrão GHbs era composto por um única banda, como esperado, porém, esta banda única se apresentou com dois diferentes tamanhos denominados (7:7) e (6:6) fazendo referência ao possível número de repetições do microsatélite em GH1 e GH2 respectivamente, mostrando que o gene hormônio de crescimento pode apresentar-se em homozigose tanto para 6 e 7 repetições (figura 6).

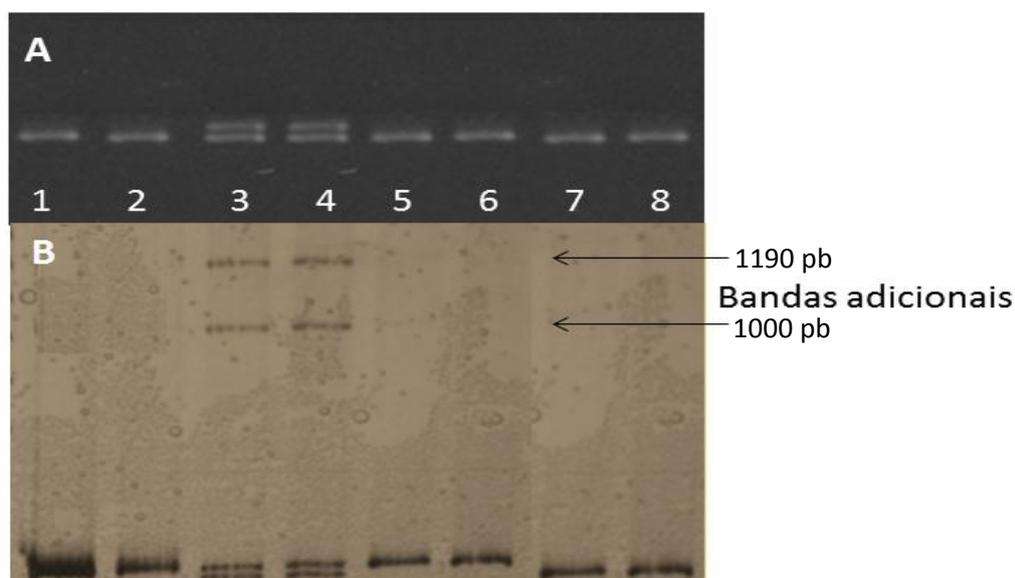


Figura 6. Comparação de amostras em gel de agarose e poliacrilamida. **A.** Gel de agarose 2%. Canaletas 3 e 4 são GHbd e canaletas 1, 2, 5, 6, 7 e 8 são GHbs. **B.** Amostras em gel de Poliacrilamida (29:1) 10% desnaturante. Amostra 1, 2, 5 e 6 apresentam gene hormônio de crescimento em homozigose (GHbs) com sete repetições do microsatélite CTGT e amostras 7 e 8, (GHbs) para seis repetições; amostras 3 e 4 indivíduos heterozigotos (GHbd) seis e sete repetições.

Indivíduos gene GHbd quando observados em gel de poliacrilamida apresentam os dois fragmentos correspondentes à diferença de 4pb do *motif* CTGT entre GH1 e



Várias hipóteses foram levantadas para tentar explicar o aparecimento do fragmento de 700 pb na amplificação do gene GHbd em tilápia visualizado em gel de agarosa, desde contaminações por outro organismo, ampliações inespecíficas e rearranjos genéticos. As duas primeiras hipóteses foram rejeitadas devido aos resultados obtidos no sequenciamento sendo que as variedades analisadas apresentaram a mesma sequência e acredita-se que a presença do fragmento de 700 pb, seja realmente devido à formação de rearranjos genéticos que por algum motivo ainda desconhecido aparecem quando os GHs se encontram em heterozigose.

Outro fato importante analisado é que em 100% das vezes em que o genótipo GHbd foi observado, se encontrou a presença de duas bandas adicionais quando as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (Figura 6). Observamos que isso ocorre todas as vezes que os genes GH se apresentam em heterozigose, com relação ao número de repetições microssatélite (6:7) em GH1 ou GH2, respectivamente.

Outra dúvida seria se apenas um dos genes GHs seriam polimórfico com relação aos alelos microssatélite como descritos nas sequências (M97766.1 e M97765), entretanto, felizmente, foram os dois indivíduos sequenciados da variedade Tailandesa que verificaram homozigose para 6 repetições (CTGT) e outro 7 repetições (CTGT), o que nos leva a crer que tanto o GH1 como o GH2 podem apresentar essas e outras variações nessa região (Figura 7). Outra evidência para esse fato é que observamos indivíduos homozigotos para 6 e para 7 repetições nos géis de poliacrilamida (Figura 6 e Figura 7).

A variação alélica observada nesse estudo em uma região de microssatélites é relativamente comum, sendo conhecidas por acumularem mutações genéticas e

geralmente localizadas em regiões não codificadoras do DNA (Yue et al., 2001; Yue et al., 2002; Chistiakov et al., 2006; Blank et al., 2009).

Microssatélites são considerados marcadores moleculares por permitirem identificar espécies, linhagens, cruzamentos entre outros, apresentando um potencial de utilização em programas de melhoramento animal (Almuly et al., 2005) para aumento da eficiência da seleção permitindo que novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração e também sendo associados a um fenótipo (Ferreira, 1998).

A localização do microssatélite encontrado neste estudo é de especial interesse por encontrar-se localizado a 3 pb do segundo éxon e podem ser atraentes na hora de identificar linhagens ou cruzamentos. Isto porque mesmo microssatélites considerados polimórficos por possuírem uma alta taxa de mutações, são conservativos em suas regiões flangeadoras sendo que podem ficar longos tempos sem modificações (Zardoya et al., 1996).

São importantes estudos que permitem revelar porque ocorre a formação de rearranjos genéticos, quando o indivíduo é heterozigoto e posteriormente verificar se existem mais alelos do microssatélite no GH1 e GH2, além dos observados aqui.

Outros estudos importantes seriam: calcular a distribuição das frequências e se estas apresentam uma herança mendeliana para conseguir rastrear estes polimorfismos em gerações subsequentes, confirmando sua natureza genética (Ferreira, 1998) e verificar a expressão gênica já que mutações intrônicas podem afetar o splicing e alterar os locais de união dos filamentos de DNA e, por conseguinte, alterar a estabilidade do mRNA, levando a produtos protéicos não funcionais, mesmo expressos ou a falta deles (Ibeagha-Awemu et al., 2008).

Nesse estudo, considerou-se apenas as duas variantes alélicas do microssatélite (6 e 7 repetições) que foram as sequenciadas e que apareceram com maior frequência. Entretanto, foi verificado a presença de animais com outras variante, com 9 ou 12 *motifes* aproximadamente. Estes animais representam um 15% do total de animais genótipados, porém não foram sequenciados.

Esses indivíduos foram encontrados apenas na variedade GIFT (Figura 7), talvez nessa população em virtude do processo de seleção e origem (Rodriguez-Rodriguez et al, 2013), esse genótipo tenha sido detectado, desta forma seria baixa a probabilidade de encontrar esse genótipo nos cruzamentos avaliados.

O polimorfismo encontrado no GH da tilápia do Nilo e apresentado neste trabalho concordam com o fato de que o gene do GH sofreu um processo de duplicação, como apresentado em 1993 por Ber & Daniel (GenBank: M84774.1). Esses autores sugeriram que a duplicação do GH ocorreu evolutivamente após a separação dos salmonídeos. De acordo com alguns estudos, (Gross & Nilsson, 1999; Rezaei & Akhshabi, 2011), a estrutura do gene do GH não é muito conservada entre os teleósteos. A possível utilização dos polimorfismos como marcadores de variedade ou seus cruzamentos em tilápia do Nilo ainda precisam ser mais estudados. No entanto, marcadores de genes candidatos podem ser usados de forma semelhante aos marcadores anônimos, onde variações podem ser detectadas no próprio gene ou próximo ao gene de função conhecida.

### Conclusões

Existe mais de dois polimorfismos na região estudada do gene hormônio do crescimento. Pode se verificar que GHbs são indivíduos com gene do GH em homozigose e GHbd indivíduos com gene do GH em heterozigose com relação ao número de repetições do microssatélite CTGT encontrados em GH1 e GH2.

Indivíduos GHbd apresentam uma banda adicional que pode ser devido à formação de rearranjos genéticos que ocorrem quando os indivíduos são heterozigotos em número de repetições do microssatélite CTGT em GH1 e GH2, que pode explicar a aparição do fragmento de 700pb observado em gel de agarose.

### Referências

- ALMULY, R.; POLEG-DANIN, Y.; GORSHKOV, S.; GORSHKOVA, V.; RAPOPORT, B.; SOLLER, M.; KASHI, Y.; FUNKENSTEIN, B. Characterization of the 5 flanking region of the growth hormone gene of the marine teleost, gilthead sea bream *Sparus aurata*: Analysis of a polymorphic microsatellite in the proximal promoter. **Fisheries science journal**, v.71, p.479-490, 2005.
- BER, D & DANIEL, V. Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica*. **Gene**, v.113, p.245-250, 1992.
- BER, R. & DANIEL, V. Sequence analysis suggests a recent duplication of the growth hormone encoding gene in *tilápia nilotica*. **Gene**, v.125, p.143-150, 1993.

BLANCK, D.V.; GASPARINO, E.; RIBEIRO, R.P.; MARQUES, D.S. Polimorfismo no gene GH1-PstI associado a características corporais de variedades de tilápia-do-nilo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.44, p.599-604, 2009.

CHISTIYAKOV, DA; HELLEMANS, B E VOLCKAERT, .FA.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special references to fish genetics. **Aquaculture**, n.255, p. 1-29, 2006.

DE FARIA, D.A.; GUIMARAES, S.E.F.; LOPES, P.S.; PIRES, A.V.; PAIVA, S.R.; et al. Association between G316A growth hormone polymorphisms and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.634–640, 2006.

DYBUS, A. Associations of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black-and- White cattle. **Animal Science Papers and Reports**, v.20, p.203-212, 2002.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2012. FAO Fisheries and Aquaculture Department. food and agriculture organization of the united nations. Roma 2012. 207 p. <http://www.fao.org/icatalog/inter-e.htm>. p. 3- 207. Acesso em: Janeiro de 2014.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN)

GROSS, R. & NILSSON, J. Restriction fragment length polymorphism at the growth hormone 1 gene in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and its association with weight among the offspring of a hatchery stock. **Aquaculture**, v. 173, p. 73–80, 1999.

IBEAGHA-AWEMU, E. M.; KGWATALALA, P.; ZHAO, X. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. **Mammalian Genome**, v.19, p.591–617, 2008.

JUNG-HA, K.; SANG-JUN, L.; SUNG-REAL, P.; HO-YOUNG, R. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries Science**, v. 68, p. 494–498, 2002.

KANSAKU, N.; NAKADA, A.; OKABAYASHI, H.; GUEMENÉ, D.; KUHNLEIN, U.; ZADWORNÝ, D.; SHIMADA, K. DNA polymorphism in the chicken growth hormone gene: association with egg production. **Animal Science Journal**, v.74, p.243-244, 2003.

KOCOUR, M. & KOHLMANN, K. Growth hormone gene polymorphisms in tench, *Tinca tinca* L. **Aquaculture**. v.310, p. 298–304, 2011.

KUHNLEIN, U.; NI, L.; ZADWORNÝ, D. DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: Response selection for disease resistance and association with egg production. **Animal Genetics**, v.28, p.116-123, 1997.

MAJ, A.; KORCZAK, M.; OPRZĄDEK, J.; ZWIERZCHOWSKI, L.; DYMNIKI, E. TG-repeat length polymorphism in the 5'-noncoding region of the growth hormone receptor gene in cattle and its association with meat production traits. **Animal Science Papers and Reports**, v. 22, p. 297-305, 2004.

MALVEIRO, E.; MARQUES, P.X.; SANTOS, I.C.; BELO, C.; CRAVADOR, A. Association between SSCPs at Algarvia goat GH gene and milk traits. **Archivos de Zootecnia**, v.50, p.49–57, 2001.

NOGUEIRA, A. C. Criação de tilápias em tanques rede. Salvador: SEBRAE, p.23, 2007.

OLIVEIRA, A.M.S. **CURVAS DE CRESCIMENTO DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) LINHAGEM GIFT** 2013. 50p. Tese (Mestrado) UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL. UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA. Aquidauana- MT.

PEREIRA, A.P.; DE ALENCAR M.M.; DE OLIVEIRA H.N.; ALMEIDA D.R. Association of GH and IG-1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, p. 230–236, 2005.

REZAEI, A. & AKHSHABI, S. Sequencing and Sequence Analysis of Growth Hormone Type 1 (GH1) Gene Analogue in the *Salmo Trutta Caspius*. **International Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.3, p. 422-428, 2011.

REZAEI, A. Variation in growth hormone (GH) of gene in exon sequence in three *salmon* types. **Egypt. Academic. Journal. Biology. Science**. v.4, n.1. p:43-53, 2012.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.DEL.P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.D.; ALBUQUERQUE, D.M.; GOES, E.S. R.; O.P.P.; RIBEIRO, R.P. Caracterização genética de gerações de tilápia Gift por meio de marcadores microsatélites. **Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília**, v.48, n.10, p.1385-1393, 2013.

RUDBECK, L. & DISSING, J.; Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. **Biotechniques**. v.25, p:588–592, 1998.

SAERA-VILA, A.; CALDUCH-GINER, J.P.; PEREZ- SANCHEZ, J. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Genetic Comparative Endocrinology**, v.142, p.193-203, 2005.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, p. 5463-5467, 1977.

SILVA, F. V.; SARMENTO, N. L. A. F.; VIERIA, J. S.; TESSITORE, A. J. A.; OLIVEIRA, L. L. S.; SARAIVA E. P. Características morfométricas, rendimentos. de carcaça, filé, vísceras e resíduos em tilápias do Nilo em diferentes faixas de peso. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 38, n. 8, p.1407-1412, 2009.

TAMBASCO, D.D.; PAZ, C.C.P.; TAMBASCO-STUDART, M.; PEREIRA, A.P.; ALENCAR, M.M. Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses *Bos taurus* x *Bos indicus*. **Journal Animal Breeding and Genetics**, v.120, p.51–54, 2003.

YUE, G.; LI, Y.; ORBAN, L. Characterization of microsatellites in the IGF-2 and GH genes of Asian seabass (*Lates calcarifer*). **Marine Biotechnology**, v.3, p. 1-3. 2001.

YUE, G.; LI, Y.; ORBAN, L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p. 99-100, 2002.

ZARDOYA, R.; AROUHEIF, E.; MEYER, A. Evolution and orthology of hedgehog genes, **Elsevier Science**, v.12 n.12, p. 496-497, 1996.

### **III. Polimorfismos no gene do hormônio do crescimento associado a características de desempenho e histologia muscular de tilápia do Nilo**

**Resumo** – Avaliou-se a associação do desempenho e comportamento morfométrico das fibras musculares brancas de dois polimorfismos do gene do hormônio do crescimento (GH), denominados GH em homozigose (GH/Ho) fragmento de 650pb e GH banda em heterozigose (GH/He) com fragmentos de 650pb e 700pb. Foram analisados 276 peixes provenientes do cruzamento GIFT x Tailandesa e avaliado seu desempenho em 150 dias. Para as análises histológicas foi coletado músculo branco do lado lateral direito acima da linha lateral, em quatro idades diferentes (30, 60, 90 e 120 dias). O peso final, ganho em peso, comprimento total, comprimento de cabeça, peso de cabeça, peso do peixe eviscerado, peso de pele, peso do filé apresentaram diferenças significativas entre os genótipos, sendo o genótipo GH/He quem apresentou os maiores valores, sendo essas variáveis reflexas do maior peso e comprimento total deste genótipo no final do experimento. Rendimentos e razões entre as medidas corpóreas não apresentaram diferenças significativas. O crescimento das fibras musculares brancas para a maioria das idades nos genótipos analisados, não apresentaram diferenças significativas nas frequências. Conclui-se que mesmo que GHbd apresente diferenças significativas para algumas características de desempenho, não se pode afirmar que estas, estejam associadas sob o efeito direto desse polimorfismo, uma vez que não foi avaliada a alteração em aminoácidos ou se existe mutação nas regiões regulatórias do gene GH.

**Termos para indexação:** GH/He, GH/Ho, microsatélite, *Oreochromis niloticus*.

**Polymorphisms in growth hormone gene associated with performance characteristics and muscle histology in Nile Tilapia**

**Abstract** - We evaluated the association of performance and behavior of morphometric white muscle fibers of two polymorphisms of the growth hormone (GH) gene, called homozygous GH (GH/Ho) with GH fragment of 650pb and GH band in heterozygous (GH / He) with fragments of 650pb and 700pb . 276 fish from crosses GIFT x Thai were analyzed and evaluated its performance in 150 days. For histological analyzes were collected the white muscle of the right hand side above the lateral line, in four different ages (30, 60, 90 and 120 days). The final weight, weight gain, total length, head length, head weight, weight of gutted fish, weight, skin, fillet weight showed significant differences among genotypes , with the GH/He genotype the one that had the highest values, and being these variables reflecting the greater weight and total length of this genotype at the end of the experiment. Yields and ratios between body measurements showed no significant differences. The growth of white muscle fibers for most ages in genotypes analyzed, had no significant differences in the frequencies. We conclude that even if GHbd present significant differences for some performance characteristics, can't be affirmed that these are connected under the direct effect of this polymorphism, since an alteration was not assessed in amino acids or if exists mutation exists in the regulatory regions of GH gene.

**Index terms:** GH/He, GH/Ho, microsatellites, *Oreochromis niloticus*

## Introdução

O gene hormônio do crescimento (GH) é secretado pela glândula pituitária e participa em processos fisiológicos, como o crescimento linear em vertebrados, crescimento somático e desenvolvimento celular (Forsyth & Wallis, 2002). Na aqüicultura, os efeitos deste gene têm sido estudados na reprodução, osmorregulação, comportamento, crescimento e sua estrutura genética podem ser usados em análises de filogenia (Acosta et al., 2008).

Em alguns peixes teleósteos, diferente de mamíferos, as pesquisas têm relatado que, este gene contém uma cópia dupla chamada GH1 e GH2 mencionada por vários autores (Almuly et al., 2005; Rezaei & Akhshabi, 2011). A estrutura genômica dos genes GH varia entre as espécies, como por exemplo, em carpas. Estes consistem em cinco éxons e quatro íntrons, como é observado em mamíferos e aves (Tanaka et. al, 1995), enquanto que os genes de GH de tilápias do Nilo é composto por seis éxons e cinco íntrons, igual ao GH de *Oncorhynchus mykiss* (Agellon et al., 1988), *Salmo salar* (Johansen et al., 1989; Male et al., 1992) *Oncorhynchus tshawytscha* (Du et al., 1993) e *Sparus aurata* (Sánchez-Ramos et al., 2004), entre outros.

Estudos em salmonídeos mostraram que tanto o gene GH1 quanto GH2 são ativamente transcritos e diferentemente expressos, podendo existir um tipo de especificidade tecidual (Saera-Vila et al., 2005). Já outros autores como Ma et al., (2007) e Fukamachi & Meyer (2007) afirmam que os genes GH1 e GH2 possuem características diferentes, tanto na sua sinalização, quanto em sua estrutura, isto pode supor ligações diferentes e específicas para as funções do GH que ainda precisam ser estudadas (Acosta et al., 2008).

Polimorfismos no gene do GH são associados a características de produção em animais de interesse zootécnico, como suínos (Faria et al., 2006), touros (Schams, et al., 1994), touros Brangus (Thomas et al., 2007), truta (Tao & Boulding, 2003), codornas (Marques, 2009). Estes polimorfismos de DNA podem estar localizados ao longo do genoma em regiões codificantes ou não codificantes, dentro de um gene ou entre genes. Regiões exônicas de genes têm sido o alvo da maioria dos estudos, mas existem evidências crescentes de que as regiões não codificadoras também explicam diferentes fenótipos de características de produção (Ibeagha-awemu et al., 2008)

O crescimento muscular dos peixes está sob influência de fatores de crescimento e hormônios, dentre eles o gene do GH, encontrando-se associados à ativação, proliferação e diferenciação de células satélites no músculo apresentando desenvolvimento indeterminado, que é dado pelo crescimento hiperplásico e hipertrófico do músculo (Mareco, 2012). O aporte da hiperplasia e hipertrofia no crescimento muscular pode variar dependendo da espécie, fase de crescimento e tipo de músculo (Dal Pai-Silva et al., 2003; Aguiar et al., 2005).

A tilápia destaca-se como o segundo grupo de peixes mais produzido em nível mundial, depois das carpas (FAO, 2012). Estudos anteriores mostraram que a porcentagem de polimorfismos no GH, GH/He e GH/Ho se encontram numa frequência 1:1 no cruzamento GIFT x Tailandesa, por tanto, o objetivo da pesquisa foi avaliar o efeito dos polimorfismos (GH/He e GH/Ho) do gene GH sobre as características morfométricas, desempenho e desenvolvimento das fibras musculares em quatro idades diferentes (30, 60, 90 e 120 dias) em tilápias do Nilo, variedade GIFT x Tailandesa.

## Material e Métodos

O trabalho foi realizado no laboratório de Aquicultura do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá, sendo utilizadas tilápias do Nilo revertidas sexualmente para macho, geradas do cruzamento das variedades GIFT x Tailandesa, cruzamento escolhido por apresentar os polimorfismos GH/He e GH/Ho em umas relações 1:1 (dados ainda não publicados), foram adquiridas de um produtor comercial localizado na região norte do Paraná. Para avaliação do desempenho, os peixes foram cultivados durante o período de novembro 2012 a março de 2013 totalizando 120 dias. Inicialmente os peixes tinham um peso vivo médio de  $19,00 \pm 4,00$ g para ambos genótipos GH/He e GH/Ho, sendo que o genótipo foi avaliado após o abate.

As tilápias foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (GH/He e GH/Ho) e quatro repetições, constituída por caixas de água de 1000L sendo 870L área de água útil com 85 peixes cada tendo fluxo de água constante.

Para a alimentação utilizou-se ração comercial farelada 40% de proteína bruta (PB) na proporção de 10% do peso vivo, nos períodos de 1 a 30 dias de experimento, já entre os dias 31 aos 120 o arraçoamento foi realizado à vontade e utilizada ração comercial na forma extruzada com 32% PB. Ao final do experimento, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas e, após, abatidos para analisar o genótipo e as seguintes características:

**Variáveis morfométricas**

CT: comprimento Total, compreendido entre a extremidade anterior da cabeça até o final da nadadeira caudal;

CP: comprimento padrão, compreendido entre a extremidade anterior da cabeça e a inserção da nadadeira caudal;

LC: largura do corpo,

ACA: Altura da cabeça, entre a extremidade posterior do processo occipital e o istmo

LCA: largura da cabeça,

CCA: comprimento da cabeça, compreendido entre a extremidade anterior da cabeça e a borda caudal do opérculo;

R1: relação comprimento do tronco/comprimento padrão

R2: relação comprimento da cabeça/comprimento padrão

R3: relação altura da cabeça/comprimento da cabeça

**Variáveis de desempenho**

PF: Peso final na hora do abate.

GP: Ganho em peso.

PCA: Peso da cabeça

PPevis: Peso peixe eviscerado.

PPele: Peso da pele

PFilé: Peso do filé sem pele

PFig: Peso do Fígado

RCAR: Rendimento de Carça,  $(\text{peso do peixe eviscerado} / \text{peso vivo}) \times 100$ ;

RCAB: Rendimento de cabeça  $(\text{peso da cabeça} / \text{peso vivo}) \times 100$ ;

RFILE: rendimento de filé;  $(\text{peso de filé sem pele e costela} / \text{peso vivo}) \times 100$ ;

RPELE: Rendimento de Pele (peso da pele /peso ao abate) x 100;

### **Extração e amplificação do DNA**

Para extração do DNA, foi utilizado protocolo proposto por Rudbeck & Dissing, (1998) adaptado por Tanamati et al., (2013). Tubos devidamente identificados, contendo 35  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,2M e um fragmento de nadadeira caudal de aproximadamente 4 mm, foram levadas ao banho Maria a 74°C por 20 minutos, com agitação a cada 5 minutos. Em seguida, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente e acrescidas de 70  $\mu\text{L}$  de Tris HCl pH 8,0, seguidas de homogeneização.

Para amplificação do DNA, foi utilizado um par de *primers* com sequência *Forward*= (5'-CAGCGGTGTGTTTTTCATGT-3'), *Reverse*= ( 5'-CGGTTCCCTTGACATCAAAT-3') descritos por Blanck et al., (2009), que amplificam uma região conservada entre as sequências depositadas no GenBank para os genes GH1 e GH2 sequências M97766.1 e M97765 respectivamente, onde a única diferença entre os genes é a falta de uma repetição do microsatélite CTGT, sendo que GH1 tem sete repetições e GH2 seis. No entanto, uma pesquisa (dados ainda não publicados) onde foi sequenciada esta região em diferentes variedades de tilápia mostrou que tanto GH1 como GH2 podem apresentar-se 6:6 ou 7:7 com relação ao número repetições do GH1:GH2 sendo em estes casos homozigotos (GH/Ho) ou heterozigotos (GH/He) se apresentarem diferenças no número de repetições do microsatélite entre GH1:GH2.

O DNA genômico foi amplificado em volume de reação de 15,5  $\mu\text{L}$ , em que 14,5  $\mu\text{L}$  eram de solução “mix” e 1  $\mu\text{L}$  de DNA molde. Assim, o “mix” foi constituído por: tampão 1,5 $\mu\text{l}$  de Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mmol L-1 pH 8,4 e KCl 50 mmol L-1), 1,5  $\mu\text{l}$  de MgCl<sub>2</sub>, 0,30  $\mu\text{l}$  de cada primer, 0,5  $\mu\text{l}$  de dNTPs e 0,1 unidade de Taq DNA

Polimerase Platinum por reação. As PCR foram realizadas no termociclador Eppendorf Mastercicle Gradient, programado para 35 ciclos, com passo inicial de desnaturação a 95°C por 4 min e passo final de extensão a 72°C por 7 min. Cada ciclo foi constituído por 30s a 95°C, 45 s a 60°C e 45 s a 72°C.

O produto da amplificação foi avaliado em gel de agarose 2 % devido a que o GH/Ho apresenta um fragmento a 650pb e o GH/He apresenta dois fragmentos um a 650pb e outro a 700pb aproximadamente (Figura 1). O gel foi revelado com 0,5 µg mL<sup>-1</sup> de brometo de etídeo e visualizado em transluminador com luz ultravioleta, foi utilizado o marcador ladder de 100 pb (Invitrogen™).

### **Análises histológicas**

As coletas de músculo foram realizadas em quatro idades diferentes aos 40, 60, 90 e 120 dias com pesos médios de (3,98g; 16,92g; 48,00g e 77,54g), respectivamente. As tilápias foram submetidas à secção da medula espinal e o músculo branco do lado lateral direito acima da linha lateral, foi coletado e fixado em formol tamponado *overnight*. Os fragmentos de músculo branco foram incluídos em parafina e feitos cortes transversais semi-seriados a 10µm de espessura, sendo submetidos à coloração hematoxilina-eosina, para ser observada a organização geral das fibras musculares, foram analisadas 200 fibras por indivíduo num total de 38 indivíduos e 7600 fibras das quais 5000 foram genótipo GH/He e 2600 genótipo GH/Ho. As lamínas foram fotomicrografadas com o microscópio marca Olympus BX-41e câmara Olympus U-TV0.5XC-3 e o diâmetro das fibras foi calculado no programa “Image Pro Plus versão 4.5.0.29”.

Após a mensuração, foram calculadas as frequências das fibras musculares e distribuídas em duas classes (crescimento por hiperplasia e crescimento por hipertrofia), e dentro de cada classe dividida em dois grupos, crescimento por hiperplasia diâmetros ( $>20\mu\text{m}$  e entre  $20\mu\text{m} - 30\mu\text{m}$ ) crescimento por hipertrofia diâmetros (entre  $30\mu\text{m} - 50\mu\text{m}$  e  $<50$ ) conforme a metodologia descrita no trabalho de Carani (2008) com algumas adaptações.

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do SAS, considerando o delineamento inteiramente em esquema fatorial 2 x 4 (dois genótipos e 4 idades). O procedimento Univariate foi utilizado para verificar a normalidade dos resíduos dos dados histológicos e de desempenho. Procedeu-se à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### **Resultados**

Foram genótipados 276 peixes, sendo que 126 indivíduos apresentaram o padrão GH/Ho, com um único fragmento com tamanho aproximado de 650pb e 150 indivíduos com padrão GH/He, apresentando dois fragmentos, um de 650pb e outro de 700pb (Figura 1). As frequências observadas para os dois padrões de amplificação foram respectivamente, 46% para GHbs e 54% GHbd.

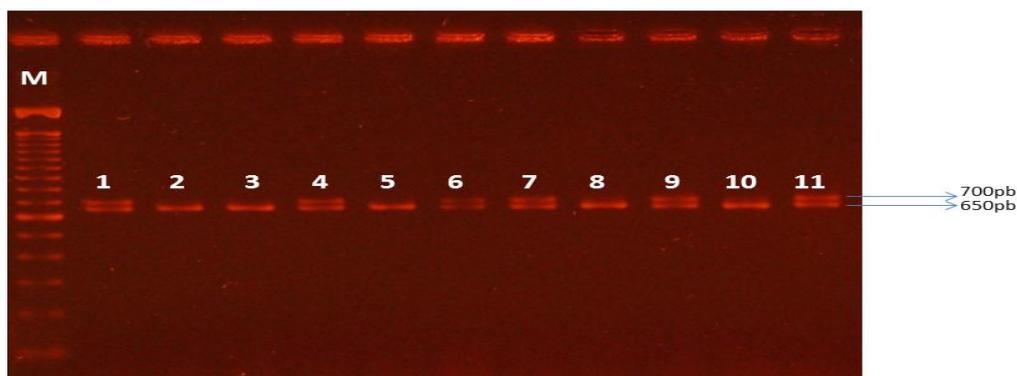


Figura 1. Gel de agarose 2%. Marcador molecular ladder 100pb (M), genótipos GH/Ho canaletas (2, 3, 5, 8, 10) e genótipo GH/He canaletas (1, 4, 6, 7, 9, 11).

Para as características morfométricas e de desempenho zootécnico, foi observado efeito significativo do padrão de amplificação GH/He para peso final (PF), ganho em peso (GP), comprimento total (CT), comprimento de cabeça (CCAB), peso de cabeça (PCAB), peso de peixe eviscerado (PPEvis) e Peso do filé sem pele (PFilé) ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1). Para todas as características em que a diferença estatística foi encontrada, o padrão GH/He se apresentou superior, sendo PF e GP as que apresentaram maiores diferenças, ultrapassando os 5% para PF.

**Tabela 1.** Características morfométricas e de desempenho dos genótipos GH/Ho (n=116) e GH/He (n=151) do gene hormônio do crescimento, em tilápia do Nilo provenientes do cruzamento GIFT x Tailandesa.

	PF (g)	GP (g)	CT (cm)	CP (cm)	LC (cm)	ACA (cm)	LCA (cm)
GH/Ho	94,76 <sup>B</sup> ±11,84	76,14 <sup>B</sup> ±9,99	18,07 <sup>B</sup> ±0,74	15,22±0,63	2,32±0,19	3,95±0,44	2,14±0,24
GH/He	99,79 <sup>A</sup> ±14,44	80,44 <sup>A</sup> ±12,3	18,28 <sup>A</sup> ±0,90	15,36±0,86	2,34±0,19	4,06±0,37	2,18±0,23
CV	13,55	14,4	4,39	4,79	8,06	10,11	10,71
	CCA (cm)	PCA (g)	PPEvis (g)	PPEle (g)	PFilé (g)	PFig (g)	
GH/Ho	4,39 <sup>B</sup> ±0,38	28,43 <sup>B</sup> ±4,19	83,47 <sup>B</sup> ±11,04	5,28±1,45	35,65 <sup>B</sup> ±4,60	1,94±0,50	
GH/He	4,48 <sup>A</sup> ±0,33	29,81 <sup>A</sup> ±4,96	88,03 <sup>A</sup> ±13,67	5,37±1,52	37,21 <sup>A</sup> ±5,78	2,03±0,54	
CV	7,88	15,54	14,26	27,65	14,2	26,38	

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). PF: Peso final na hora do abate; GP: Ganho de peso; CT: comprimento Total; CP: comprimento padrão; LC: largura do corpo; ACA: Altura da cabeça; LCA: largura da cabeça; CCA: comprimento da cabeça; PCA: Peso da cabeça; PPEvis: Peso peixe eviscerado; PPEle: Peso da pele; PFilé: Peso do filé sem pele; PFig: Peso do fígado.

Para os dados de rendimento de carcaça (RCAR), rendimento de cabeça (RCAB), rendimento de Filé (RFILÉ) e rendimento de pele (RPELE), assim, como a

relação entre as medidas corporais não se verificou diferença entre os genótipos ( $P>0,05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Rendimentos corporais e relações entre as características morfométricas dos genótipos GH/Ho (n=116) e GH/He (n=151) em tilápia do Nilo provenientes do cruzamento GIFT x Tailandesa.

	RCAR (%)	RCAB(%)	RFILE(%)	RPELE(%)	R1(%)	R2(%)	R3(%)
GH/Ho	87,99±3,25	30,04±2,74	37,33±2,98	5,58±1,38	0,71±0,01	0,28±0,01	0,89±0,09
GH/He	88,12±3,40	29,89±2,67	37,72±2,81	5,38±1,31	0,70±0,01	0,29±0,01	0,90±0,08
CV (%)	3,56	8,99	7,58	23,63	2,37	5,78	10,19

RCAR: Rendimento de Carcaça; RCAB: Rendimento de cabeça; RFILE: rendimento de filé; RPELE: Rendimento de Pele; R1: relação comprimento do tronco/comprimento padrão; R2: relação comprimento da cabeça/comprimento padrão; R3: relação altura da cabeça/comprimento da cabeça.

Quanto aos parâmetros histológicos, considerando-se as quatro coletas a os 30, 60, 90 e 120 dias de idade aproximadamente, as fibras da musculatura estriada da tilápia do Nilo apresentaram células poligonais ou arredondadas, com vários núcleos periféricos e fibras em crescimento hipertrófico e hiperplásico (Figura 2).

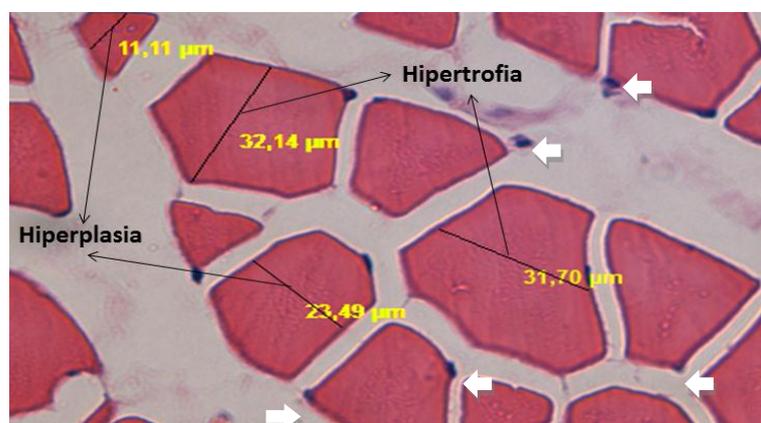


Figura 2. Corte transversal do músculo branco de tilápia do Nilo. Aumento 40x. Fibras em hiperplasia  $>30$  e hipertrofia  $<30$ . As setas brancas indicam os núcleos periféricos.

Na Tabela 3, encontram-se os valores das frequências medias das células do músculo branco. Nas células hiperplásicas com diâmetro  $<20$   $\mu\text{m}$ , observou-se efeito da interação genótipo x idade, sendo que o GH/Ho mostrou valores similares nas idades 30, 60 e 90 dias, com diferenças comparadas com a idade de 120 dias. As frequências foram reduzidas à medida que a idade aumentava.

Nas células com diâmetro de 20-30  $\mu\text{m}$  para os dois genótipos, foi verificado redução de número de células hiperplásicas com relação à idade, embora não tenham sido encontradas diferenças estatísticas para interação entre genótipo x idade ( $P=0,0827$ ). Portanto, considerando as variáveis como fator independente, foi possível constatar diferenças ( $P=0,0256$ ) entre os genótipos, sendo o genótipo GH/He o que apresentou a maior médio (3,67). Considerando o efeito da idade ( $P=0,0175$ ), foi observada redução gradual na frequência das fibras de 20-30  $\mu\text{m}$  com o avanço da idade.

**Tabela 3.** Frequências médias das fibras musculares com crescimento hiperplásico e hipertrófico para o gene GH em Homozigose (GH/Ho) e GH em Heterozigose (GH/He) em diferentes coletas com idades aproximadas 30,60,90 e 120 dias de tilápia do Nilo e sua interação.

Genótipo	IDADE	Hiperplasia		Hipertrofia	
		<20 $\mu\text{m}$	20-30 $\mu\text{m}$	30-50 $\mu\text{m}$	> 50 $\mu\text{m}$
GH/Ho	30 dias	2.803 A $\pm$ 0.01	3.790 $\pm$ 0.02	3.707AB $\pm$ 0.03	0.896 $\pm$ 0.20
	60 dias	2.404 A $\pm$ 0.40	3.975 $\pm$ 0.01	3.605B $\pm$ 0.11	0.346 $\pm$ 0.35
	90 dias	1.657 A $\pm$ 0.74	3.402 $\pm$ 0.36	4.043A $\pm$ 0.20	1.504 $\pm$ 1.00
	120 dias	0.728 B $\pm$ 0.28	3.121 $\pm$ 0.18	4.227A $\pm$ 0.07	1.593 $\pm$ 0.44
GH/He	30 dias	3.000A $\pm$ 0.34	3.844 $\pm$ 0.05	3.408A $\pm$ 0.18	0.549 $\pm$ 0.23
	60 dias	1.425C $\pm$ 0.16	3.689 $\pm$ 0.06	3.999A $\pm$ 0.06	1.192 $\pm$ 0.20
	90 dias	2.341AB $\pm$ 0.18	3.551 $\pm$ 0.07	3.954A $\pm$ 0.07	1.192 $\pm$ 0.27
	120 dias	2.261B $\pm$ 0.44	3.672 $\pm$ 0.23	3.817A $\pm$ 0.25	0.767 $\pm$ 0.46
Efeito Principal					
	GH/Ho	1,51 $\pm$ 0,31	3,42B $\pm$ 0,14	4,01 $\pm$ 0,089	1,25 $\pm$ 0,29
Genótipo	GH/He	2,15 $\pm$ 0,17	3,67A $\pm$ 0,05	3,85 $\pm$ 0,07	1,01 $\pm$ 0,14
Idade	30 dias	2,93 $\pm$ 0,22	3,83A $\pm$ 0,03	3,51 $\pm$ 0,13	0,66 $\pm$ 0,17
	60 dias	1,64 $\pm$ 0,21	3,75A $\pm$ 0,06	3,91 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,21
	90 dias	2,19 $\pm$ 0,21	3,52AB $\pm$ 0,08	3,97 $\pm$ 0,06	1,26 $\pm$ 0,03
	120 dias	1,24 $\pm$ 0,33	3,31B $\pm$ 0,16	4,09 $\pm$ 0,11	1,32 $\pm$ 0,34
Probabilidade	Genótipo	0,0070	0,0256	0,0805	0,3994
	Idade	0,0003	0,0175	0,0018	0,4569
	Interação	0,0062	0,0827	0,0301	0,2802

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P<0,05$ )

Para hipertrofia, as células entre 30-50  $\mu\text{m}$  apresentaram interação genótipo x idade, onde GH/Ho evidenciou um aumento das frequências significativamente nas idades 90 e 120 dias. Em GH/He, não se encontraram diferenças significativas nas frequências de células hipertróficas.

## Discussão

Neste estudo, encontramos frequências de 46% para GH/Ho e 54% para GH/He que comparados com estudos prévios (dados ainda não publicados), envolvendo diferentes linhagens de tilápia e diferentes gerações de seleção, observamos que o padrão de amplificação GH/Ho e GH/He parece estar associado à linhagem, podendo servir como um marcador para certificação das linhagens. Porém, somente após a realização de estudos de segregação, poderemos afirmar que os genótipos GH/Ho e GH/He estão ligados à linhagem ou se eles estão sendo favorecidos pelo processo de seleção artificial.

Ber & Daniel, (1992) postulam que a presença do GH1 e GH2 é um evento de duplicação que pode prover um marcador natural, excelente para estudos de evolução e classificação. Igualmente, Kocour & Kohlmann, (2011) avaliaram polimorfismos de GH em *Tinca tinca* L., e comentaram que estas variações podem servir como marcadores adequados para estudos populacionais e propósitos de conservação para esta espécie.

A duplicação do gene do GH observada nos peixes como salmonídeos e tilápias (Ber & Daniel, 1992), pode favorecer o acúmulo de mutações em uma das cópias do gene, podendo acontecer nessa cópia perda de função. Entretanto, alguns polimorfismos podem estar ligados a um alelo favorável do gene funcional, podendo ser selecionados.

Para as características peso final (PF), ganho em peso (GP), comprimento total (CT), comprimento de cabeça (CCAB), peso de cabeça (PCAB), peso de peixe eviscerado (PPEvis) e Peso do filé sem pele (PFilé), observamos efeito significativo favorável aos indivíduos gene GH/He ( $P < 0,05$ ). Sendo o peso final, comprimento total onde a GH/He foi 1,5% maior com relação à gene GH/Ho e ganho em peso onde

GH/He apresentou um ganho de 5,1% maior que a GH/Ho, as características mais relevantes para produção.

A taxa de crescimento dos peixes e utilização de medidas corporais é na maioria das vezes utilizada como critério de seleção (Huang & Liao, 1990), podendo ser o polimorfismo GH/He que apresente algumas características de interesse para programas de melhoramento genético.

Tanamati (2014) observou que características de indivíduos gene GHbd que neste trabalho é descrito como GH/He, apresentou maiores valores em algumas características de desempenho. No entanto, precisam ser feitos estudos em nível de campo simulando condições normais de cultivo, pois fatores externos podem interferir na expressão dos genes (Salam et al., 1999).

Na pesquisa realizada por Salam et al., (1999), onde testou as densidades de estocagem em fase juvenil de salmão, encontrou que altas densidades do peixe estão relacionadas com a redução da expressão do gene que codifica precursores de GH2, sendo que os níveis de GH1 foram constantes nos grupos avaliados.

Acredita-se que somente um dos genes seja alvo da transcrição, diferentemente do que ocorre com a truta, onde os dois genes são expressos (Mori et al., 2001), por outro lado, GH1 e GH2 em tilápia apresentam um 99% de homologia (Ber & Daniel, 1992) e sua expressão pode ser influenciada por fatores externos (Salam et al., 1999) podendo assim algum polimorfismo dos genes do GH estar influenciando em alguma característica fenotípica.

Possivelmente, o aparecimento de uma banda com tamanho de 700 pb maior do que o fragmento esperado (650 pb) esteja relacionado com rearranjos que ocorrem nos indivíduos heterozigotos (dados ainda não publicados) podendo afetar a expressão do gene e assim, podendo interferir nas características fenotípicas.

Porém, Tanamati (2014) encontrou que os polimorfismo GHbs e GHbd que neste trabalho fazem referência a GH/Ho e GH/He respectivamente, não apresentam diferenças na expressão do GHR e IGF-I em amostras de fígado e músculo branco. Entretanto, estudos em salmonídeos mostram que tanto GH1 e GH2 podem ser diferentemente expressos e existir um tipo de especificidade tecidual (Saera -Vila et al., 2005).

Para algumas características como: comprimento padrão, largura do corpo, altura e largura da cabeça, peso da pele, relações entre as medidas morfométricas e rendimentos, não apresentaram diferença significativa. Mas pode ser que algumas características não estejam sob influência dos polimorfismos do gene do GH ou que estas estejam relacionadas com a origem do cruzamento, sendo possível que algum polimorfismo esteja associado à linhagem.

Não se pode afirmar que a associação entre o padrão de amplificação GH/He e algumas características quantitativas observadas neste estudo, estejam sob o efeito direto desse polimorfismo, uma vez que não avaliamos se houve alteração em aminoácidos ou se existe mutação nas regiões regulatórias do gene GH.

O hormônio de crescimento e fatores de crescimento exercem influência sobre o crescimento muscular atuando na ativação, proliferação e diferenciação de células satélites no músculo apresentando permitindo nos peixes um desenvolvimento indeterminado que é dado pelo crescimento hiperplásico e hipertrófico (Mareco, 2012).

Nesta pesquisa, observou-se que células hiperplásicas com diâmetros  $<20 \mu\text{m}$  não apresentam diferenças entre os genótipos e nas idades de 90 e 120 dias diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) da idade de 60 dias. Diâmetros de 20-30  $\mu\text{m}$  apresentaram interação genótipo/idade sendo que o polimorfismo gene GH/He apresentou maiores frequências medias que GH/Ho. As frequências dos genótipos indicaram uma redução

das frequências médias à medida que aumentava a idade. Isto pode ser atribuído ao fato de que o crescimento hiperplásico é mais frequente em fases juvenis (Almeida et al., 2010).

As frequências médias de células em hipertrofia com diâmetros entre 30-50  $\mu\text{m}$  e  $>50 \mu\text{m}$  mostraram que os genótipos não apresentam interação. No entanto, as frequências médias em GH/He e GH/Ho foram menores para a idade de 120 dias, sendo que este último genótipo apresentou uma diferença ( $P < 0,05$ ) na idade de 90 a 120 dias, possivelmente atribuído ao aumento de hipertrofia à medida que aumenta a idade (Almeida et al., 2010).

Em geral, as frequências de fibras em hiperplasia, foram maiores nas primeiras idades e aumentando a hipertrofia à medida que aumentava a idade. Os crescimentos hiperplásicos e hipertróficos não apresentaram diferença nas frequências entre os genótipos para a maioria de subgrupos de diâmetros das fibras.

Tanamati, (2014) não encontrou diferença entre os genótipos GH/Ho e GH/He e o nível de expressão de GHR e IGF-I que estariam relacionados com o nível de GH no músculo. Porém, poderiam ser avaliados os níveis de receptores de GH1 e GH2, pois pesquisas evidenciam que o crescimento muscular tanto hipertrófico e hiperplásico pode estar regulado de forma independente, o mesmo em concorrência entre eles (Rowlerson et al., 1995).

Na espécie *Salvelinus alpinus*, um Salmonídeo de água fria, foi verificado que o GH1 e o GH2 ocorrem em desequilíbrio de ligação (Tao & Boulding, 2003), indicando que a seleção praticada em um determinado alelo do GH1 pode aumentar a frequência de outro alelo no GH2 em função da pequena probabilidade de ocorrência de crossing-over entre eles.

Avaliações, como a quantidade de colágeno encontrado na matriz extracelular, sendo relacionada ao diâmetro das fibras musculares, poderiam ajudar a confirmar se existe ou não, diferenças na hipertrofia e hiperplasia entre os genótipos. Outra análise seria a contagem de células satélites com diâmetros menores a  $<5 \mu\text{m}$  que podem contribuir tanto ao crescimento hipertrófico como hiperplásico.

### Conclusões

A associação estatística significativa ( $P < 0,05$ ) entre polimorfismos associado a características de interesse pode fornecer evidências de que o gene pode estar envolvido direta ou indiretamente com o controle da expressão da característica ou que se encontre próximo a um marcador fazendo com que os dois *loci* estejam em desequilíbrio de ligação.

Nas avaliações histológicas das fibras musculares brancas, os genótipos não apresentaram diferença significativa nas frequências médias das fibras para a maioria das idades analisadas, no entanto, sugerimos mais estudos que mostrem se alguns fatores que influem no balanço de mecanismos hipertróficos e hiperplásicos podem interferir no crescimento muscular dos genótipos avaliados.

### Referências

ALMULY, R.; POLEG-DANIN, Y.; GORSHKOV, S.; GORSHKOVA, V.; RAPOPORT, B.; SOLLER, M.; KASHI, Y.; FUNKENSTEIN, B. Characterization of the 5 flanking region of the growth hormone gene of the marine teleost, gilthead sea bream *Sparus aurata*: Analysis of a polymorphic microsatellite in the proximal promoter. **Fisheries science journal**, v.71, p.479-490, 2005.

ACOSTA, J.; CARPIO, Y.; BESADA, V.; MORALES, R.; SÁNCHEZ, A.; CURBELO, Y.; AYALA, J.; ESTRADA, M.P. Recombinant truncated tilapia growth hormone enhances growth and innate immunity in tilapia fry (*Oreochromis sp.*). **General and Comparative Endocrinology**, v.157, p.49–57, 2008.

AGELLON, L.B.; DAVIES, S.L.; LIN, C.M.; CHEN T.T.; POWERS, D.A. *Rainbow trout* has two genes for growth hormone. **Molecular Reproduction and Development**, v.1 p.11–17, 1988.

AGUIAR, D. H.; BARROS, M. M.; PADOVANI, C. R.; PEZZATO, L. E.; DAL PAI-SILVA, M. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. **Journal of Fish Biology**, v.675, p. 1287-1298. 2005.

ALMEIDA, F. L. A., PESSOTTI, N. S., PINHAL, D., PADOVANI, C. R., LEITÃO, N. J., CARVALHO, R. F., MARTINS, C. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. **Micron**. v. 41(8), p. 997–1004, 2010.

BER, D. & DANIEL, V. Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica*. **Gene**, v.113, p.245-250, 1992.

BLANCK, D.V.; GASPARINO, E.; RIBEIRO, R.P.; MARQUES, D.S. Polimorfismo no gene GH1-PstI associado a características corporais de variedades de tilápia-do-nilo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.44, p.599-604, 2009.

CARANI, F.R.; AGUIAR, D.H.; ALMEIDA, F.L.A.; GONÇALVES, H.S.; PADOVANI, C.R.; DAL PAI M.S. Morfologia e crescimento do músculo estriado

esquelético no pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier, 1817 (Teleostei, Arapaimidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. v. 30, n. 2, p. 205-211, 2008

DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R. F.; PELLIZZON, C. H.; PAI, V. DAL. Muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): histochemical, ultrastructural and morphometric study. **Tissue and Cell**, v.35 (3), p.179-187, 2003.

DU, S.J.; DEVLIN, R.H.; HEW, C.L. Genomic structure of growth hormone genes in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): presence of two functional genes, GH-I and GH-II, and a male specific pseudogene, GH-q **Journal DNA Cell Biology**, v.12, p. 739-751, 1993.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2012**. FAO Fisheries and Aquaculture Department. food and agriculture organization of the united nations. Roma 2012. 207 p. <http://www.fao.org/icalog/inter-e.htm>. p. 3- 207. Acesso em: Janeiro de 2014.

FARIA, D.A. de; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; PIRES, A.V.; PAIVA, S.R.; SOLLERO, B.P.; WENCESLAU, A.A. Association between G316A growth hormone polymorphism and economic traits in pigs. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.634-640, 2006.

FORSYTH, I.A. & WALLIS, M. Growth hormone and prolactin – molecular and functional evolution. **Journal of Mammary Gland Biology**. v.7: p: 291–312 2002.

FUKAMACHI, S. & MEYER, A. Evolution of receptors for growth hormone and somatolactin in fish and land vertebrates: lessons from the lungfish and sturgeon orthologues. **Journal Molecular Evolution**, v.65, p.359–372, 2007.

HUANG, C. M.; LIAO, J. C. Response to mass selection for growth rate in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 85, p. 199-205, 1990.

IBEAGHA-AWEMU, E. M.; KGWATALALA, P.; ZHAO, X. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. **Mammalian Genome**, v.19, p.591–617, 2008.

JOHANSEN, B.; JOHNSEN, O.C.; VALLA, S. The complete nucleotide sequence of the growth hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Gene**, v.77, p.317-324, 1989.

KOCOUR, M. & KOHLMANN, K. Growth hormone gene polymorphisms in tench, *Tinca tinca* L. **Aquaculture**. v. 310, p. 298–304, 2011.

MA, X.; LIU, X.; ZHANG, Y.; ZHU, P.; YE, W.; LIN, H. Two growth hormone receptors in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): molecular characterization, tissue distribution and expression profiles in the gonad during the reproductive cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v 147, p.325–339, 2007.

MALE, R.; NERLAND, A.H.; LORENS, J.B.; TELLE, W.; LOSSIUS, I.; TOTLAND, G.K. The complete nucleotide sequence of the Atlantic salmon growth hormone I gene. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1130, p.345-348, 1992.

MARECO, A.E. **Efeitos da temperatura na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem GIFT**. 2012. 63p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências de Botucatu. Botucatu– São Paulo.

MARQUES, D.S. **Polimorfismos no gene do hormônio do crescimento em linhagens de codorna (*coturnix japonica*) e sua associação com características de desempenho.** 2009. 73p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá. Maringá-Paraná.

MORI, T.; DEGUCHI, F.; UENO, K. Differential expression of GH1 and GH2 genes by competitive RT-PCR in *rainbow trout* pituitary. **General and Comparative Endocrinology**. v.123, p.137–143, 2001.

REZAEI, A. & AKHSHABI S.H. Sequencing and Sequence Analysis of Growth Hormone Type 1 (GH1) Gene Analogue in the *Salmo Trutta Caspius*. **International Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.3(6), p. 422-428, 2011.

ROWLERSON, A.; MASCARELLO, F.; RADAELLI, G.; VEGGETTI, A. Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L): II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v.16, p. 223-236, 1995.

SAERA-VILA, A.; CALDUCH-GINER, J.P.; PEREZ- SANCHEZ, J. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Genetic Comparative Endocrinology**, v.142 p.193-203, 2005.

SALAM, M.A.; OTA, Y.; ANDO, H.; FUKUWAKA, M.; KAERIYAMA, M.; URANO, A. High population density of juvenile chum salmon decreased the number and sizes of growth hormone cells in the pituitary. **Zoological Science**. v.16, p. 945–954. 1999.

SÁNCHEZ-RAMOS, I.; CROSS, I.; REBORDINOS, L. Determination of RFLP's in genes related to growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In: ADAMS, S.; OLAFSEN, J.A. (Ed.). *Biotechnologies for quality: extended abstracts and short communications*. Barcelona: **European Aquaculture Society**, p.713-714, 2004.

SCHAMS, D.; SCHLEE, P.; ROTTMANN, O.; GRAML, R.; PIRCHNER, F.; OLBRICH, B.A.;SCHALLEMBERGER, E.; et al. Growth hormone and insulin-like growth factor-1 concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.88 p.497–500, 1994.

TANAKA, M.; TOMA Y.; OHKUBO, T.; SUDO, S.; NAKASHIMA, K. Sequence of the flounder growth hormone encoding gene and its promoter region. **Gene**, v.165, p. 321–322, 1995.

TANAMATI, F. **Polimorfismo no gene GH, crescimento muscular, expressão de mRNA GHR, IGF-I e HSP70 associados a características de produção em tilápia do Nilo.2014**. 61p. Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá. Maringá–Paraná.

THOMAS, M.G.; ENNS, R.M.; SHIRLEY, K.L.; GARCIA, M.D.; GARRETT, A.J.; SILVER, G.A. Associations of DNA polymorphisms in growth hormone and its transcriptional regulators with growth and carcass traits in two populations of *Brangus* bulls. **Genetic Molecular Research**, v.6, p.222–237, 2007.

TAO, W.J. & BOULDING, E.G. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). **Heredity**, v.91, p. 60–69, 2003