

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

POLIMORFISMO NO GENE GH, CRESCIMENTO
MUSCULAR, EXPRESSÃO DE mRNA GHR, IGF-I E HSP70
ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO EM
TILÁPIA DO NILO

Autor (a): Fernanda Tanamati
Orientador (a): Prof. ^aDr^a. Eliane Gasparino

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

POLIMORFISMO NO GENE GH, CRESCIMENTO
MUSCULAR, EXPRESSÃO DE mRNA GHR, IGF-I E HSP70
ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO EM
TILÁPIA DO NILO

Autor (a): Fernanda Tanamati
Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Eliane Gasparino

“Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal”.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro - 2014

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

T161p Tanamati, Fernanda
Polimorfismo no Gene GH, crescimento muscular, expressão de mRNA GHR, IGF-I e HSP70 associados a características de produção em Tilápia do Nilo / Fernanda Tanamati. -- Maringá, 2014.
44 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Produção Animal, 2014.

1. Crescimento muscular. 2. Expressão gênica. 3. Genótipo. 4. Jejum alimentar. 5. Tilápias. 6. Polimorfismo. I. Gasparino, Eliane, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Produção Animal. III. Título.

CDD 21.ed. 639.3



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**POLIMORFISMO DO GENE GH, CRESCIMENTO
MUSCULAR E EXPRESSÃO DE mRNA GHR, IG-I E
HSP70 ASSOCIADOS A CARACTERÍSTICAS DE
PRODUÇÃO EM TILÁPIA DO NILO**

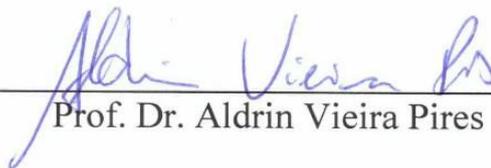
Autora: Fernanda Tanamati
Orientadora: Profª Drª Eliane Gasparino

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 21 de fevereiro de 2014.



Profª Drª Fernanda Losi
Alves de Almeida



Prof. Dr. Aldrin Vieira Pires



Profª Drª Eliane Gasparino
(Orientadora)

“A vida é uma peça de teatro que não nos permite ensaios.
Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente,
antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos”.

Charles Chaplin

Aos

Meus pais
Luiz Tanamati e Ana Emico Tanamati,
pelo amor, carinho, incentivo, compreensão e confiança.

À

Minha avó Maria, exemplo de vida, força e fé
pelo amor e inspiração

Ao

Meu irmão Elton e sua noiva Ana Paula,
pela amizade, companheirismo, carinho e motivação

Á

Todos os meus tios, tias, primos e primas,
sei que posso contar com vocês sempre!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida maravilhosa.

À Universidade Estadual de Maringá, em especial ao Departamento de Zootecnia e Programa de Pós Graduação em Zootecnia.

À professora e orientadora Eliane Gasparino, pelo ser humano maravilhoso que é, também pela oportunidade, pelo aprendizado, pela paciência, pelo carinho, pela dedicação e confiança.

À professora Fernanda e professora Maria Raquel, do Departamento de Ciências Morfológicas.

Às técnicas, Maria Eurides e Maria dos Anjos, e acadêmicos do Laboratório de Histotécnica Animal da Universidade Estadual de Maringá.

A minha querida amiga Stefânia Caroline Claudino da Silva, pela maravilhosa e abençoada amizade! Lembrar-me-ei das conversas, dos conselhos, das risadas, dos sorvetes e tortas, da viagem, dos dias de trabalho...sentirei muita saudade Stefs!

Aos queridos amigos André e Guilherme, por toda ajuda e companheirismo.

Às queridas amigas Grazy Yoshida, Erica Machado, Maria Del Pilar Rodriguez Rodriguez, Ana Paula Del Vesco, Natalia Mora, pelos momentos de alegria, pelo companheirismo e pela paciência.

A todos os meus familiares, mãe, pai, irmão, tios (as), primos (as), pelo incentivo, conselhos, compreensão e amor incondicional.

À CAPES, pela bolsa a mim concedida.

E, finalmente, agradeço a todos que não foram citados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

FERNANDA TANAMATI, filha de Ana Emico Tanamati e Luiz Tanamati, nasceu em Maringá, Estado do Paraná, no dia 16 de julho de 1987.

Iniciou o curso de Graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá, no ano de 2007 e concluiu-o em 2011.

Em março de 2012, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, em nível de mestrado, área de concentração “Produção Animal”, sob orientação da Professora Dr.^a Eliane Gasparino.

No dia 21 de fevereiro de 2014, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
I - INTRODUÇÃO	1
1. Polimorfismo nos genes GH, IGF-I e GHR.....	2
2. Genes relacionados ao crescimento e proteína do choque térmico HSP70	3
LITERATURA CITADA	7
II - OBJETIVOS GERAIS.....	11
III - POLIMORFISMO NO GENE GH, EXPRESSÃO DOS GENES GHR E IGF-I ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO EM TILÁPIA DO NILO	
Resumo.....	12
Abstract	12
Introdução	13
Material e métodos.....	14
Resultados	18
Discussão	22
Conclusões	25
Referências	25
IV - EXPRESSÃO DO mRNA GHR/IGF-I E CRESCIMENTO MUSCULAR SOBRE CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DE TILÁPIAS DO NILO, SUBMETIDAS AO JEJUM	
Resumo.....	29
Abstract	29
Introdução	30
Material e métodos.....	31
Resultados	35
Discussão	38
Conclusões	41
Referências	41
V – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
VI - NORMAS DA REVISTA AQUACULTURE	45

LISTA DE TABELAS

	Página
III – POLIMORFISMO NO GENE GH, EXPRESSÃO DOS GENES GHR E IGF-I ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO EM TILÁPIA DO NILO.....	12
Tabela 1. Peso corporal (PC), peso vazio (PV), peso de vísceras (PVISC), peso do filé (PF), relação filé/carcaça vazia (FCV), rendimento de filé (RF), comprimento (COMP) e largura (LARG) de animais cruzados, GIFT x Tailandesa, dos genótipos GH banda simples (GHbs) e GH banda dupla (bd) e categorias distintas	20
Tabela 2. Expressão do mRNA do receptor do hormônio de crescimento (GHR), fator de crescimento semelhante à insulina - I (IGF-I) no fígado de tilápias considerando os genótipos GHbs e GHbd e as categorias de peso 20-35g e 40-70g	21
Tabela 3. Expressão do mRNA do receptor do hormônio de crescimento (GHR) e fator de crescimento semelhante à insulina - I (IGF-I) no músculo de tilápias considerando os genótipos GHbs e GHbd e as categorias de peso 20-35g e 40-70g	22
IV – EXPRESSÃO DO mRNA GHR/IGF-I E CRESCIMENTO MUSCULAR SOBRE CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DE TILÁPIAS DO NILO, SUBMETIDAS AO JEJUM	29
Tabela 1. Peso inicial (PI), peso final (PF) e ganho de peso (GP) dos grupos experimentais	35
Tabela 2. Distribuição da frequência de fibras musculares (%) em três diferentes classes dos dias C0 e J5, J10, J15 de jejum	36

LISTA DE FIGURAS

	Página
I - INTRODUÇÃO	1
Figura 1. Rotas de sinalização do GH (Fonte: Adaptado de Herrington e Carter-Su, 2001). GH – hormônio do crescimento, GHR – receptor do hormônio de crescimento, JAK2 – Janus kinase 2, STATs – transdutores do sinal e ativadores de transcrição, MAPK – proteína kinase ativadora de mitose, IRS – substratos de receptores de insulina, PI3’K – fosfatidilinositol – 3 kinase	4
III – POLIMORFISMO NO GENE GH, EXPRESSÃO DOS GENES GHR E IGF-I ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO EM TILÁPIA DO NILO.....	12
Figura 1. GH banda simples (GHbs) com um fragmento de 652 pb e GH banda dupla (GHbd) com dois fragmentos de 652 e 700 pb. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo a 0,5µg/ml	18
Figura 2. Expressão de mRNA HSP70 no fígado de tilápias considerando duas categorias de peso, 20-35g e 40-70g. Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente pelo Teste F (P<0,05). Os resultados são mostrados como médias e erros-padrão	22
IV – EXPRESSÃO DO mRNA GHR/IGF-I E CRESCIMENTO MUSCULAR SOBRE CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DE TILÁPIAS DO NILO, SUBMETIDAS AO JEJUM.....	29
Figura 1. Peso corporal (PC), peso de carcaça vazia (PCV), largura (LARG) e comprimento total (COMP) de tilápias. Letras minúsculas representam diferença estatística entre animais de mesma idade em grupos experimentais diferentes (jejum e controle). Letras maiúsculas representam diferença entre os animais dos grupos em jejum nos dias 5, 10 e 15. Asteriscos representam diferença estatística entre o tratamento controle - C0 e os demais tratamentos (5, 10 e 15 dias controle e jejum). Os resultados são mostrados como médias e seus erros-padrão.	35

Figura 2. Expressão do gene do receptor do hormônio de crescimento – GHR (A e B) e fator de crescimento semelhante à insulina I - IGF-I (C e D) no fígado de tilápias submetidas a diferentes períodos de jejum. Letras minúsculas representam diferença estatística entre animais de mesma idade em grupos experimentais diferentes (jejum e controle). Asteriscos representam diferença entre o tratamento C0 e os demais tratamentos (5, 10 e 15 dias do controle e jejum). Os resultados são mostrados como médias e seus erros-padrão 37

Figura 3. Expressão do gene do receptor do hormônio de crescimento – GHR (A e B) e fator de crescimento semelhante à insulina I - IGF-I (C e D) no músculo de tilápias submetidas a diferentes períodos de jejum. Letras minúsculas representam diferença estatística entre animais de mesma idade em grupos experimentais diferentes (jejum e controle). Letras maiúsculas representam diferença entre os animais dos grupos em jejum nos dias 5, 10 e 15. Asteriscos representam diferença estatística entre o tratamento controle- C0 e os demais tratamentos (5, 10 e 15 dias controle e jejum). Os resultados são mostrados como médias e seus erros-padrão 38

RESUMO

O crescimento corporal é uma das características mais importantes na produção de peixes. É uma resposta complexa que envolve fatores nutricionais, ambientais, genéticos e endócrinos. Deste modo, foram realizados dois experimentos no qual o objetivo do experimento I foi verificar em tilápias do cruzamento GIFT x Tailandesa, se o polimorfismo no hormônio do crescimento (GH) está associado a características de desempenho e à expressão dos genes do receptor do hormônio de crescimento (GHR) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I), e também verificar se o tamanho dos peixes pode alterar a expressão da proteína do choque térmico HSP70. O objetivo do experimento II foi avaliar em tilápias cruzadas GIFT x Tailandesa, o efeito do jejum sobre o nível de expressão de GHR e IGF-I e analisar se o mesmo altera características de desempenho e o crescimento muscular. No experimento I, os animais foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, dois genótipos: GH banda simples (GHbs) e GH banda dupla (GHbd), e duas categorias de peso: 20-35g e 40-70g. Características de desempenho foram avaliadas: peso corporal, peso vazio, peso de vísceras, peso do filé, comprimento, largura, rendimento de filé e relação filé/carcaça vazia. Fragmentos de nadadeira caudal foram coletados para a genotipagem e amostras de fígado e músculo branco foram coletadas para análise da expressão gênica. Observou-se que as características peso corporal, peso vazio, peso de vísceras, peso do filé e comprimento apresentaram maiores médias para o genótipo GHbd; animais menores, categoria de peso 20-35g, apresentaram maior expressão de mRNA HSP70 e nenhuma relação entre expressão de mRNA GHR e IGF-I e GHbs e GHbd foi verificada. Assim, a variação do GH pode estar associada a características de desempenho, e a expressão do gene da HSP70 pode ser influenciada pelo tamanho dos peixes. No experimento II, os peixes foram

submetidos a um período de jejum de 15 dias, tendo sido avaliados nos dias 0 (C0), 5 (C5 e J5), 10 (C10 e J10) e 15 (C15 e J15). C0, C5, C10 e C15: animais que continuaram recebendo alimento. J5, J10 e J15: animais em jejum. Foram realizadas as seguintes mensurações: peso corporal, peso de carcaça vazia, comprimento e largura. Amostras de fígado e músculo branco foram coletadas para análise da expressão de mRNA GHR e IGF-I, e amostras de músculo branco foram coletadas para avaliação do crescimento muscular, com determinação do menor diâmetro agrupados em diferentes classes. A restrição alimentar reduziu as médias de todas as características de desempenho avaliadas, e analisando tilápias em jejum e tilápias que continuaram recebendo alimentação, observou-se que o jejum causou aumento da expressão de GHR hepático aos 5 e 10 dias, diminuição da expressão de IGF-I hepático e aumento da expressão de GHR e IGF-I no músculo branco aos 5, 10 e 15 dias. Não foi verificada modificação do crescimento muscular quando animais em jejum foram comparados com animais alimentados. Dessa forma, a expressão dos genes GHR e IGF-I no fígado e no músculo branco, assim como o desempenho, sofreram influência do jejum.

Palavras-chave: crescimento, expressão gênica, genótipo, jejum, tilápias, polimorfismo

ABSTRACT

The body growth is one of the most important characteristics in the production of fish. It is a complex response involving nutritional, environmental, genetic and endocrine factors. Thus, two experiments were conducted in which the aim of the experiment I was to check in crossed tilapia GIFT x Thai if the polymorphism in the growth hormone (GH) is associated with performance characteristics and gene expression of the growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor - I (IGF-I), and also to check if the size of the fish can alter the expression of heat shock protein HSP70. The aim of the experiment II was to evaluate in crossed tilapia GIFT x Thai, the effect of fasting on the expression level of GHR and IGF-I and to examine whether it changes the performance characteristics and muscle growth. In experiment I, the animals were distributed in a completely randomized design in a factorial arrangement, two genotypes: GH single band (GHbs) and GH dual band (GHbd), and two weight categories: 20-35g and 40-70g. Performance characteristics were evaluated: body weight, empty weight, weight of viscera, fillet weight, length, width, fillet yield and fillet/empty carcass ratio. Fragments of caudal fin were collected for genotyping and liver and white muscle samples were collected for analysis of gene expression. It was observed that the characteristics body weight, empty weight, weight of viscera, fillet weight and length showed higher for genotype GHbd; smaller animals, weight category 20-35g, showed higher expression of HSP70 mRNA expression and no relation between GHR mRNA and IGF-I and GHbs and GHbd was observed. Thus, the change of GH may be associated with performance characteristics and the expression of the HSP70 gene may be influenced by the size of the fish. In the experiment II, fish were subjected to a fasting period of 15 days and they were evaluated on days 0 (C0), 5 (C5 and F5), 10 (C10 and F10) and 15 (C15 and F15). C0, C5, C10 and C15: animals that continued to receive food. J5, J10 and J15: fasted

animals. The following measurements were obtained: body weight, empty carcass weight, length and width. Samples of liver and white muscle were collected for analysis of mRNA expression of GHR and IGF-I, and white muscle samples were collected for assessment of muscle growth with determining the smallest diameter grouped into different classes. Feed restriction reduced the average of all performance traits, and analyzing fasted tilapia and tilapia that continued receiving food, it was observed that fasting caused increased expression of the GHR hepatic at days 5 and 10, it decreased expression of IGF-I hepatic and increased expression of GHR and IGF -I in white muscle at days 5, 10 and 15. There wasn't modification of muscle growth when fasted animals were compared with animals that were fed. Thus, the expression of GHR and IGF-I genes in the liver and in white muscle, as well as in the performance, were influenced by fasting.

Keywords: growth, gene expression, genotype, fasting, tilapias, polymorphism

I - INTRODUÇÃO

A produção de peixes tem potencial de se tornar uma das maiores fontes de proteína no Brasil e no mundo, aliando melhorias nutricionais, ambientais e o melhoramento genético animal. Tendo em vista que melhoria na produção resulta em maior produção de carne, características de importância econômica, como o crescimento (Blanck et al., 2009) são amplamente estudadas.

O crescimento ocorre em função de diversos fatores, entre eles a síntese e degradação dos tecidos e perdas do corpo na forma de energia, nitrogênio e minerais, devido à excreção (Hornick et al., 2000). É uma resposta complexa, que envolve fatores nutricionais e ambientais, genéticos e endócrinos (Kim, 2010).

Hormônios responsáveis em promover o crescimento, como hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina - I (IGF-I), são candidatos naturais a estudos para verificar seus efeitos sobre o crescimento em peixes (Kang et al., 2002). Além disso, o GH também pode estar associado ao sexo (Forbes et al., 1994), à regulação osmótica (Sakamoto e McCormick, 2006), comportamento (Jönsson e Björnsson, 2002), metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos, crescimento do tecido ósseo, reprodução e função imune (Reinecke et al., 2005). O IGF-I pode estar relacionado aos processos de crescimento celular (Mommsen, 2001), síntese de proteínas (Duan, 1998), regulação de lipídios e carboidratos e metabolismo mineral das células (Moriyama et al., 2000).

Pesquisas abrangendo o IGF-I e o receptor do hormônio de crescimento (GHR) têm demonstrado que o estado nutricional ou animais mantidos em restrição alimentar, podem afetar a expressão de mRNA desses genes (Uchida et al., 2003, Fox et al., 2006, Fox et al., 2010). Além disso, pesquisas referentes à duplicação do gene GH para

determinadas espécies de peixes e o estudo de polimorfismo do GH, GHR e IGF-I associados ou não a características de desempenho, têm sido amplamente desenvolvidos.

1. Polimorfismos no GH, IGF-I e GHR

Estudos envolvendo o polimorfismo na produção animal são de grande importância, pois variações na sequência alélica de um gene podem alterar a estrutura e a atividade da proteína resultante, ou ainda, alterar a regulação dos níveis de transcrição do mRNA (De-Santis e Jerry, 2007). Além disso, polimorfismos podem ser usados como marcadores genéticos.

Para os animais de produção, o efeito dos genes que regulam o crescimento está focado principalmente no GH, GHR e IGF-I. Dessa forma, associações de polimorfismo no GH, GHR e IGF-I e características de crescimento são pesquisados para a maioria dos animais: caprinos (Silva et al., 2012), bovinos (Curi et al., 2006, Silva et al., 2006), suínos (Cheng et al., 2000) e frangos (Nie et al., 2005). Além das características de crescimento, o polimorfismo também podem estar associado às características reprodutivas (Hax et al., 2011), produção de ovos (Kuhnlein, et al., 1997) e leite (Hax et al., 2013).

Em peixes como a tilápia, a truta e o salmão, a presença do gene que codifica o hormônio de crescimento de forma duplicada tem sido relatada. Os Salmonídeos, família em que se encontram as trutas e os salmões, apresentam o genoma tetraploide decorrente de um ancestral comum que dobrou seu genoma cerca de 25-50 milhões de anos atrás (Allendorf e Thorgaard, 1984), enquanto a tilápia apresenta o genoma diploide. Visto que ambos possuem genes do GH provenientes de um ancestral comum, Ber e Daniel (1993) supõem que a duplicação do segundo GH de tilápia deve ter ocorrido após a separação evolutiva dos Salmonídeos.

Mesmo sabendo da duplicação do GH em tilápias, pouco se sabe sobre seus efeitos e funcionamento. Vários trabalhos de associação de polimorfismos no GH da tilápia a características de crescimento são encontrados (Blanck et al., 2009; Kang et al., 2002; Gross e Nilson, 1999), no entanto a maioria dos estudos não deixa claro em qual dos dois genes do GH a mutação está localizada.

Além disso, o GH das tilápias contém seis éxons e cinco íntrons com estrutura aparentemente similar a outros peixes, mas diferindo dos mamíferos pela presença de um íntron adicional. Neste contexto, polimorfismos associados ao crescimento no gene GH de peixes, geralmente são encontrados em íntrons (Gross e Nilsson, 1999, Kang et al., 2002, Forbes et al., 1994), que é a região do gene não transcrita, mas que tem a capacidade de influenciar a regulação gênica (De-Santis e Jerry, 2007).

O polimorfismo no gene IGF-I e seu efeito sobre o crescimento foi estudado por Tao e Boulding (2003). Entretanto, não foi possível observar associação significativa entre polimorfismo no IGF-I e taxa de crescimento.

2. Genes relacionados ao crescimento e proteína do choque térmico HSP70

O hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) são amplamente estudados quanto a sua ação sobre o crescimento em peixes.

O hipotálamo produz o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) e o hormônio inibidor do hormônio de crescimento ou somatostatina (SRIF). O hormônio do crescimento é um hormônio polipeptídico de 20-22 kDa, de cadeia simples com aproximadamente 190-209 aminoácidos (Pérez-Sánchez et al., 2002), sintetizado e secretado principalmente pelas células somatotrópicas da hipófise anterior (Mommssen et al., 2001), e regulado pelos hormônios hipotalâmicos.

No tecido alvo o GH liga-se a receptores transmembranas específicos (GHR), afetando vários aspectos do metabolismo, além de desencadear a produção e liberação de IGF-I no fígado e na maioria dos tecidos periféricos (Fox et al., 2006). O receptor do hormônio de crescimento, pertencente à família de receptores de citocinas tipo I, apresenta um domínio extracelular de ligação ao GH, um domínio transmembrana e um domínio intracelular que está relacionado à sinalização (Pierce et al., 2007).

O hormônio do crescimento se liga a dois de seus receptores transmembranas (GHRs), formando um complexo GH-GHR₂, aumentando a afinidade de cada GHR à proteína JAK2 (Janus kinase). Após a ligação GH-GHR, ocorre uma alteração conformacional do GHR, ativando duas moléculas de JAK2, que já se encontram ligadas ao complexo. JAK2 ativado induz sua autofosforilação, a fosforilação da outra molécula JAK2 e de vários resíduos de tirosina em GHR. GH-GHR-JAK2 ativado,

também fosforila e ativa várias vias e moléculas de sinalização, incluindo as STATs – transdutores do sinal e ativadores da transcrição (Lanning e Carter-Su, 2006). Os fatores de transcrição STAT 1, 3 e 5a e 5b são fosforiladas por JAK2, seguida de dimerização e translocação para o núcleo no qual participam na transcrição de importantes genes regulados pelo GH (Lanning e Carter-Su, 2006), como o do IGF-I (Herrington e Carter-Su, 2001).

Além das STATs, outras moléculas de sinalização como MAPKs (Proteína quinase ativadora de mitose), IRS1 (Receptor de insulina substrato-1), PI3K (Fosfatidilinositol - 3 cinase), DAG (diacilglicerol), PKC (Proteína Kinase - C), Ca^{2+} (cálcio intracelular), estão envolvidas nas alterações induzidas pelo GH na atividade enzimática, função de transporte, e expressão de genes que, finalmente, levam a alterações no crescimento e metabolismo (Figura 1).

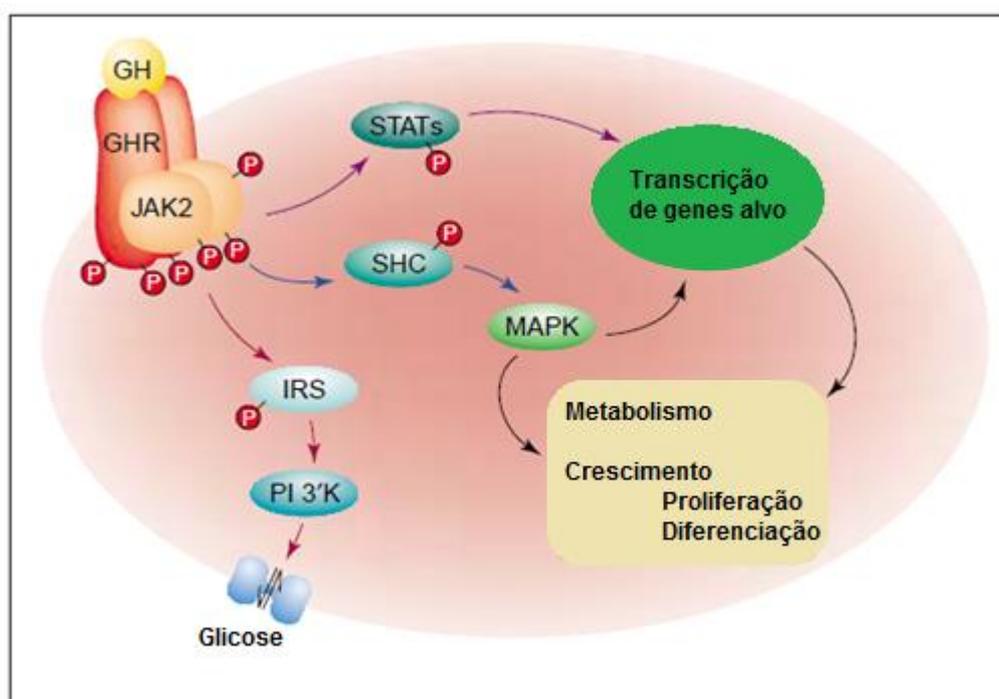


Figura 1. Rotas de sinalização do GH (Fonte: Adaptado de Herrington e Carter-Su, 2001). GH – hormônio do crescimento, GHR – receptor do hormônio de crescimento, JAK2 – Janus kinase 2, STATs – transdutores do sinal e ativadores de transcrição, MAPK – proteína quinase ativadora de mitose, IRS – substratos de receptores de insulina, PI3'K – fosfatidilinositol – 3 cinase.

O hormônio do crescimento tem sido identificado como um forte regulador dos níveis de IGF-I em peixes (Imsland et al., 2008). A insulina pode reagir com receptores de IGF-I e também otimizar a produção de IGF-I, podendo ser considerada dessa forma promotora do crescimento (Oba et al., 2009).

Transcritos de mRNA de IGF-I estão presentes em muitos tecidos de peixes, porém, o fígado possui os níveis mais altos (Duan, 1998), assim, maior produção de IGF-I ocorre no fígado, embora outros tecidos também o produzam.

O IGF-I circula no sangue ligado a proteínas de ligação específicas (IGFBPs – proteínas de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina), que atuam como transportadoras de IGF-I, também prolongam sua meia-vida e modulam sua interação com seus receptores. As ações biológicas do IGF-I são mediadas pelo seu receptor, que é expresso em diversos tipos de células (Moriyama et al., 2000).

O eixo GH/IGF-I em peixes pode ser afetado pelo estado nutricional. Em tilápias, duas semanas de restrição alimentar causaram a redução do peso corporal, da taxa de crescimento específico, do fator de condição e do índice hepatossomático, além de reduzir o nível de IGF-I plasmático e sua expressão hepática de mRNA (Uchida et al., 2003). Para Pierce et al. (2007) e Fox et al. (2010), em quatro semanas de jejum, a taxa de crescimento foi negativa e ocorreu a redução no IGF-I plasmático em tilápias. Fox et al. (2010) ainda observaram alteração no peso corporal e no fator de condição, redução na expressão de mRNA IGF-I no fígado e no músculo, e aumento na expressão de mRNA GHR no fígado. Em “chinook salmon”, sete semanas de jejum alteraram o peso corporal, o fator de condição e peso do fígado. IGF-I e IGFBP plasmáticos foram menores para os animais em jejum enquanto GH aumentou, ainda, a expressão de IGF-I no fígado foi significativamente menor (Pierce et al., 2005).

O estado nutricional, assim como variações na temperatura, a densidade, competição por alimento e a qualidade da água podem causar o estresse em peixes. O estresse por sua vez pode afetar o crescimento através da alteração dos níveis plasmáticos de tiroxina (T3) e triiodotironina (T4), que possuem efeitos na secreção de GH e na resposta celular ao IGF-I (Oba et al., 2009). O cortisol, que se eleva quando os animais estão estressados, também participa do processo.

As HSPs (proteínas do choque térmico), em particular a família 70 kDa (HSP70), são expressas em células em condições normais e funcionam como proteínas chaperonas assegurando a conformação apropriada das proteínas recém-sintetizadas (Tine et al., 2010). No entanto, quando o animal está sob o efeito de estresse, a HSP70, conhecida como proteína do choque térmico, é produzida pelo organismo protegendo-o contra danos celulares. Por isso, estudos têm abordado a HSP70 como um biomarcador do estresse em peixes: o estresse provocado pelo calor e o aumento dos níveis de

cortisol circulante sobre a HSP70 foi estudado por Basu et al. (2001) e o efeito da hipóxia sobre a proteína do choque HSP70 foi pesquisado por Lückstädt et al. (2004).

Assim, pesquisas com tilápia do Nilo sobre a expressão do gene HSP70 são importantes pelas alterações provocadas pelo estresse no desempenho dos animais. Além disso, mudanças no padrão alimentar podem causar modificações na expressão de genes do eixo somatotrófico, IGF-I, GHR e GH e também afetar o desempenho. A relação do GH com a regulação do crescimento e diversas funções metabólicas faz do gene do GH um alvo potencial para estudos da variação genética e sua associação com características de crescimento em peixes (Gross e Nilsson, 1999).

LITERATURA CITADA

- Allendorf, F.W., Thorgaard, G.H., 1984. Tetraploidy and the evolution of Salmonid fishes, in: Turner, B.J. (Ed.), *Evolutionary genetics of fishes*. Plenum, New York, pp.1-53.
- Basu, N., Nakano, T., Grau, E.G., Iwamas, G.K. 2001. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 124, 97-105.
- Ber, R., Daniel, V., 1993. Sequence analysis suggests a recent duplication of the growth hormone-encoding gene in *Tilapia nilotica*. *Gene*, 125, 143-150.
- Blanck, D.V. Gasparino, E. Ribeiro, R.P., Marques, D.S., 2009. Polimorfismo no gene GH1-PstI associado a características corporais de linhagens de tilápia do Nilo. *Pesq. Agropec. Bras.*, 44, 599-604.
- Cheng, W.T.K., Lee, C.H., Hung, C.M., Chang, T.J., Chen, C.M., 2000. Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and Tao-Yuan pigs. *Theriogenology*, 54, 1225–1237.
- Curi, R.A., Palmieri, D.A., Suguisawa, L., Ferraz, A.L.J., De Oliveira, H.N., Furlan, L.R., Silveira, A.C., Lopes, C.R., 2006. Effects of GHR gene polymorphisms on growth and carcass traits in Zebu and crossbred beef cattle. *Livestock Science*, 101, 94–100.
- De-Santis, C., Jerry, D.R., 2007. Candidate growth genes in finfish – where should we be looking?. *Aquaculture*, 272, 22-38.
- Duan, C. 1998. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. *The journal of nutrition*, 128, 306-314.
- Forbes, S.H., Knudsen, K.L., North T.W., Allendorf, F.W., 1994. One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. *Proc Natl Acad Sci*, 91, 1628-1631.
- Fox, B.K., Riley, L.G., Hirano, T., Grau, E.G., 2006. Effects of fasting on growth hormone, growth hormone receptor, and insulin-like growth factor-I axis in seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148, 340–347.
- Fox, B.K., Breves, J.P., Davis, L.K., Pierce, A.L., H, T., Grau, E.G., 2010. Tissue-specific regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during fasting and re-feeding: Importance of muscle expression of IGF-I and IGF-II mRNA in the tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 166, 573-580.

- Gross, R., Nilsson, J., 1999. 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*, 173, 73-80.
- Imstrand, A.K., Foss, A., Roth, B., Stefansson, S.O., Vikingstad, E., Pedersen, S., Sandvik, T., Norberg, B., 2008. Plasma insulin-like growth factor-I concentrations and growth in juvenile halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Effects of photoperiods and feeding regimes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 151, 66-70.
- Hax, L.T., Shneider, A., Corrêa, M.N., 2011. Efeito de polimorfismo nos genes GHR e IGF-I no desempenho produtivo e reprodutivo de bovinos, in XIII ENPOS, Brasil.
- Hax, L.T., Schneider, A., Bespalhok, C.J, Mattei, P., Silva, T.C., Corrêa, M.N., 2013. Efeito do polimorfismo GHR ALU I na incidência de mastite em vacas da raça holandes, in: XV ENFOS, Brasil.
- Herrington, J., Carter-Su, C., 2001. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends endocrinol. Metab.*, 12, 252-257.
- Hornick, J.L., Van Eenaeme, C., Gérard, O., Dufrasne, I., Istasse, L., 2000. Mechanisms of reduced and compensatory growth. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 19, 121-132.
- Jönsson, E., Björnsson, B.Th., 2002. Physiological functions of growth hormone in fish with special reference to its influence on behavior. *Fish. Sci.*, 68, 742-774.
- Kang, J.H.; Lee, S.J.; Park, S.R., Ryu, H.Y., 2002. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, 68, 494-498.
- Kim, J.W. 2010. The endocrine regulation of chicken growth. *J. Anim. Sci.*, 23, 1668-1676.
- Kuhnlein, U., Ni, L., Weigend, S., Gavora, J.S., Fairfull, W., Zadworny, D., 1997. DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. *Anim. Genet.*, 28, 116-123.
- Lanning, N.J., Carter-Su, C., 2006. Recent advances in growth hormone signaling. *Endocr. Metab. Disord.*, 7, 225-235.
- Lückstädt, C., Schill, R.O., Focken, U., Köhler, H.R., Becker, L. 2004. Stress protein Hsp70 response of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) to induced hypoxia and recovery, 4, 137-141.
- Mommsen, T.P., 2001. Paradigms of growth in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 129, 207-219.

- Moriyama, S., Ayson, F.G., Kawauchi, H., 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 8, 1553-1562.
- Nie, Q., Sun, B., Zhang, D., Luo, C., Ishag, N.A., Lei, M., Yang, G., Zhang, X. 2005. High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. *J. Hered.*, 96, 698–703.
- Oba, E.T.O., Mariano, W.S., Santos, L.R.B., 2009. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável, in: Tavares-Dias, M. (Ed.), *Manejo e sanidades de peixes em cultivo*. Embrapa, Amapá, pp,226-247.
- Pierce, A.L., Shimizu, M., Beckman, B.R., Baker, D.M., Dickhoff, W.W., 2005. Time course of the GH/IGF axis response to fasting and increased ration in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 140, 192-202.
- Pierce, A.L., Fox, B.K., Davis, L.K., Visitacion, N., Kitahashi, T., Hirano, T., Grau, E.G., 2007. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: Tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 154, 31-40.
- Reinecke, M., Björnsson, B.T., Dickhoff, W.W., McCormick, S.D., Navarro, I., Power, D.M., Gutiérrez, J., 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go. *Gen. and Comp. Endocrinol.*, 141, 20-24.
- Sakamoto, T., McCormick, S.D., 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *Gen. Comp. Endocrin.*, 147, 24–30.
- Silva, M.V.G.B., M., M.L., Machado, M.A., Nascimento, C.S., Campos, A.L., Guimarães, M.F.M., Azevedo, A.L.S., Miota, A.K.F., Lui, J.F., 2006. Genes do eixo somatotrófico e características de crescimento numa população F₂ de bovinos. *Pesq. agropec bras*, 41, 981-986.
- Silva, N.M.V., Ribeiro, M.N., Rocha, L.L., Gomes Filho, M.A., Lima A.P.S., 2012. Polimorfismo genético da leptina e do receptor do hormônio do crescimento em caprinos. *Arch. Zootec.*, 61, 187-195.
- Tao, W.J., Boulding, E.G., 2003. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*). *Heredity*, 91, 60-69.
- Tine, M., Bonhomme, F., McKenzie, D.J., Durand, J.D., 2010. Differential expression of the heat shock protein Hsp70 in natural populations of the tilapia, *Sarotherodon*

melanotheron, acclimatized to a range environmental salinities. BMC Ecology, 10.

Uchida, K., Kajimura, S., Riley, L.G., Hirano, T., Aida, K., Grau, E.G., 2003. Effects of fasting on growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Comp. Biochem. and Physiol. 134A, 429–439.

II - OBJETIVOS GERAIS

Avaliar se um polimorfismo encontrado no gene do hormônio do crescimento (GH) da tilápia poderia estar relacionado a características de desempenho e expressão dos genes do receptor do hormônio do crescimento (GHR) e fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) no fígado e músculo branco. Verificar o efeito do tamanho dos peixes sobre a expressão da proteína do choque térmico (HSP70) no fígado.

Avaliar características de desempenho e níveis de expressão dos genes do GHR e IGF-I no fígado e músculo branco, e avaliar o crescimento muscular em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidas a diferentes períodos de jejum.

III - POLIMORFISMO NO GENE GH, EXPRESSÃO DOS GENES GHR E IGF-I ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO EM TILÁPIA DO NILO

RESUMO

Objetivou-se com este estudo verificar em tilápias cruzadas GIFT x Tailandesa, se os genótipos GH banda simples (GHbs) e GH banda dupla (GHbd) estão associados às características de desempenho e expressão dos genes receptor do hormônio de crescimento (GHR) e fator de crescimento semelhante a insulina-I (IGF-I) no fígado e músculo branco; além de verificar se o tamanho das tilápias pode alterar a expressão da proteína do choque térmico HSP70 no fígado. O experimento foi realizado em esquema fatorial, duas categorias de peso: 20-35g e 40-70g, e dois genótipos: GHbs e GHbd. Características de desempenho como: peso corporal, peso vazio, peso de vísceras, peso do filé, relação filé carcaça vazia, rendimento de filé, comprimento e largura foram avaliados. Fragmentos de nadadeiras foram coletados para a genotipagem e amostras de fígado e músculo branco para análise da expressão gênica por qRT-PCR. Peso corporal, peso vazio, peso de vísceras, peso do filé, e comprimento apresentaram maiores médias para o genótipo GHbd, indicando que a variação do GH pode estar associada à característica de desempenho, enquanto nenhuma relação entre GHbs e GHbd e expressão de mRNA GHR e IGF-I pôde ser observada no fígado e no músculo branco. Animais da categoria de peso 20-35g apresentaram maior expressão de mRNA HSP70 no fígado, sugerindo que a mesma pode ser influenciada pelo tamanho dos peixes.

Palavras-chave: desempenho, expressão gênica, HSP70, polimorfismo, *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate in crossed tilapias GIFT x Thai, if GH simple band (GHbs) and GH dual band (GHbd) genotypes are associated with performance characteristics and expression of genes growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor - I (IGF-I) in the liver and white muscle; besides checking if the size of tilapias can alter the expression of heat shock protein (HSP70) in the liver. The experiment was conducted in factorial arrangement, two categories of weight: 20-35g and 40-70g, and two genotypes: GHbs and GHbd. Performance characteristics such as:

body weight, empty weight, weight of viscera, fillet weight, empty carcass ratio fillet, fillet yield, length and width were evaluated. Fragments of fins were collected for genotyping and samples of liver and white muscle for analysis of gene expression by qRT-PCR. Body weight, empty weight, weight of viscera, fillet weight and length showed higher averages for GHbd genotype, indicating that the variation of GH may be associated with performance characteristics, while no relationship between GHbs and GHbs and GHR mRNA expression and IGF-I could be observed in the liver and white muscle. Animal weight category 20-35g showed increased expression of HSP70 mRNA in the liver, it suggests that it is influenced by the size of the fish.

Keywords: performance, gene expression, HSP70, polymorphism, *Oreochromis niloticus*

1. Introdução

Avanços na biotecnologia aliados ao melhoramento genético têm causado diversas melhorias na piscicultura, principalmente quando relacionados às características de importância econômica, como o crescimento corporal (Blanck et al., 2009).

O crescimento animal pode ser caracterizado pelo aumento de peso, comprimento, altura e circunferência em função da idade (Filho et al., 2011), sendo considerado uma característica importante na produção de carne. Neste contexto, dentre os diversos genes relacionados com a regulação do crescimento que têm sido estudados, destacam-se os genes do hormônio do crescimento (GH), do receptor do hormônio do crescimento (GHR) e do fator de crescimento semelhante à insulina - I (IGF-I).

O GH é um hormônio polipeptídico de cadeia única, sintetizado nas células somatotrópicas da hipófise anterior. Quando se liga a seus receptores localizados na membrana da superfície celular do tecido alvo (GHR), formando o complexo GH-GHR, inicia suas ações biológicas, como a produção e liberação de IGF-I no fígado e na maioria dos tecidos periféricos (Moriyama et al., 2000). O IGF-I pode estar relacionado aos processos do crescimento celular (Mommsen, 2001), síntese de DNA e proteínas (Duan, 1998), regulação de lipídios e carboidratos e metabolismo mineral das células (Moriyama et al., 2000).

Em peixes, polimorfismo tem sido correlacionado as características de crescimento para o gene do IGF-I (Tao e Boulding, 2003), e principalmente para o gene

do GH (Gross e Nilson, 1999; Kang et al., 2002; Blanck et al., 2009). Entretanto, o GH também pode estar associado ao sexo (Forbes et al., 1994), à regulação osmótica (Sakamoto e McCormick, 2006), metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos, crescimento do tecido ósseo, reprodução e função imune (Reinecke et al., 2005). Além do GH, GHR e IGF-I, outros genes como o gene da proteína do choque térmico HSP70, também estão envolvidos direta ou indiretamente com o crescimento. A HSP70 é produzida quando o organismo está sob o efeito de estresse, podendo protegê-lo contra danos celulares. O estresse pode promover alteração nos níveis de GH e IGF-I.

Diversos trabalhos relatam a presença de duas cópias do GH (GH1 e GH2) em diversas espécies de peixes teleósteos. O salmão, a truta arco-íris e a tilápia nilótica são exemplos de ocorrência dessa duplicação, possuindo as duas primeiras espécies um volume considerável de trabalhos publicados (Agellon et al., 1988; Ber e Daniel, 1993; Forbes et al., 1994; Mori et al., 2001; Rezaei e Akhshabi, 2011). Os Salmonídeos, família em que se encontram as trutas e os salmões, apresentam o genoma tetraploide decorrente de um ancestral comum que dobrou seu genoma cerca de 25-50 milhões de anos atrás (Allendorf e Thorgaard, 1984), enquanto a tilápia apresenta o genoma diploide. Visto que ambos possuem genes do GH provenientes de um ancestral comum, Ber e Daniel (1993) supõem que a duplicação do segundo GH de tilápia deve ter ocorrido após a separação evolutiva dos Salmonídeos.

Recentemente nosso grupo de trabalho demonstrou que animais cruzados, GIFT x Tailandesa, apresentaram polimorfismo para o GH na sua região promotora. Em função da duplicação gênica da região amplificada, não podemos até o momento afirmar em qual gene GH1 ou GH2 o polimorfismo está localizado, desta forma o polimorfismo diferente encontrado foi denominado GH banda simples (GHbs) e GH banda dupla (GHbd). Em virtude dessa observação a hipótese desse trabalho é que a variação no gene do GH em tilápias pode estar relacionada às características de desempenho e expressão dos genes GHR e IGF-I no fígado e no músculo. No presente trabalho, verificamos também o efeito do tamanho dos peixes sobre a expressão da proteína do choque térmico HSP70 no fígado.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Foram utilizadas 95 tilápias revertidas do cruzamento de GIFT x tailandesa, provenientes da Piscicultura Piracema, Maringá-PR. Os animais foram alojados no

Laboratório de Aquicultura do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá em janeiro de 2013, pesando $5 \pm 0,5$ g. Após 60 dias, os mesmos animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, dois genótipos, GH banda simples (GHbs) e GH banda dupla (GHbd) e duas categorias de peso: 20-35g e 40-70g, em caixas de fibrocimento com volume útil unitário de $1,00 \text{ m}^3$, com sistema individual de renovação da água (5 %/dia) e aeração constante por meio de pedra porosa acoplada a um soprador central.

Os animais receberam ração comercial extrusada (40% de proteína bruta). A dieta diária total foi distribuída três vezes/dia, às 8, 12 e 18 horas, o arraçoamento foi manual e a ração fornecida até saciedade aparente. A temperatura de cada tanque foi aferida, e os tanques foram sifonados de manhã e à tarde para remoção de metabólitos e resíduos.

2.2. Amostragem

Os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, e no momento da coleta, foram capturados, transportados ao Laboratório e anestesiados. Posteriormente, o peso corporal (PC) do animal foi determinado, assim como: peso vazio (PV), peso de vísceras (PVISC), peso do filé (PF), comprimento (COMP) e largura (LARG). Calculou-se também o rendimento de filé (RF) e a relação filé/carcaça vazia (FCV).

Fragmentos da nadadeira caudal foram coletados, acondicionados em etanol 90% e armazenados em freezer a -20°C para posterior extração de DNA. Para a análise da expressão gênica o fígado e músculo branco foram coletados, acondicionados em “RNA holder” (BioAgency Biotecnologia Ltda., São Paulo, SP) e armazenados a -20°C até o momento da extração de RNA.

2.3. Genotipagem

A extração do DNA foi realizada conforme protocolo de extração alcalina, descrita por Rudbeck e Dissing (1998), adaptado por Tanamati et al., (2013). Amostras de nadadeiras foram cortadas, secas e transferidas para tubos de 1,5ml. Para a etapa de lise e homogeneização, foram adicionados a cada amostra 35 μL de NaOH 0,2M, e incubadas em banho-maria a 74°C por 20 minutos. Enquanto em banho-maria, homogeneizou-se a cada 5 minutos amostra por amostra. Para a etapa de neutralização acrescentou-se 70 μL de Tris HCl pH 8,0. Em seguida, as amostras foram estocadas em freezer a -20°C para posterior amplificação.

Os *primers* utilizados foram desenhados conforme sequência depositada no GenBank para os genes GH1 e GH2 (número de acesso M97766 e M97765), considerando a região mais conservada do gene em tilápias. Nesse fragmento os genes GH1 e GH2 possuem uma variação de sete e seis repetições do microsatélite CTGT, respectivamente. Apenas uma diferença de 4 pb dentro do íntron 2 é esperada para os *amplicons*.

O DNA genômico foi amplificado em um volume final de reação de 15,5 μL , constituído por 1 μL de DNA molde mais “mix” de reagentes contendo tampão 1,5 μl de Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mmol L⁻¹ pH 8,4 e KCl 50 mmol L⁻¹), 1,0 μl de MgCl₂, 0,60 μl de primer, 0,5 μl de dNTPs, 10,8 μl de água ultrapura e 0,1 unidade de Taq DNA Polimerase Platinum (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) por reação. As reações de PCR foram realizadas em termociclador (*AB Applied Biosystems*). Inicialmente o DNA foi desnaturado a 95°C por 4 min e em seguida foram realizados 35 ciclos, cada um consistindo de 30 s de desnaturação a 95°C, 45 s de anelamento a 60°C e 45 s de extensão a 72°C. Uma extensão final de 72°C por 7 min também foi realizada. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 2%, e a eletroforese foi conduzida a 150 volts por 2 horas em cuba horizontal, usando tampão TBE 0,5X (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico e 83 mM de EDTA). Para a revelação do gel utilizou-se banho de brometo de etídeo a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 20 minutos, e a imagem foi capturada por um sistema da L-pix (Loccus biotecnologia). Para a estimativa do tamanho dos fragmentos utilizou-se o DNA ladder (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) de 100 pares de base.

2.4. Extração de RNA, síntese de cDNA e qRT-PCR

O RNA total foi extraído com o reagente Trizol® (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1mL para cada 100 mg de tecido. Todos os materiais utilizados foram previamente tratados com inibidor de RNase - RNase AWAY® (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). O tecido foi triturado com homogeneizador Polytron (tecido + Trizol) até a completa dissociação. Em seguida, foi adicionado 250 μL de água pura livre de RNase, homogeneizado manualmente por 1 minuto e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado também 200 μL de clorofórmio e as amostras agitadas antes da incubação por mais 5 minutos na temperatura ambiente. O material foi centrifugado por 15 minutos a 10.600 rpm a 4°C, e a fase aquosa coletada, sendo transferida para um tubo

limpo e adicionado a mesma quantidade coletada de isopropanol em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas, incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 10.600 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas novamente a 10.600 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante descartado. O pelet foi seco por 20 minutos e ressuspendido em água ultrapura livre de RNase.

A concentração do RNA foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 a 280 nm, e sua integridade foi avaliada em gel de agarose 1%, visualizado em luz ultravioleta. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (*Life Technologies, Carlsbad, USA*), para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, de acordo com as recomendações do fabricante.

Para síntese do cDNA foi utilizado o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix* (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) de acordo com as normas do fabricante. Em tubo estéril e livre de RNA, foram adicionados 6 µL de RNA total, 1 µL de oligo (dT) (50µM oligo(dT)₂₀) e 1µL de tampão de anelamento (“annealing buffer”). A reação foi incubada por 5 minutos a 65°C, e colocada em gelo por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de solução 2x First-Strand Reaction Mix (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e 2 µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa *SuperScript III* e o inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50 minutos a 50°C. A reação foi incubada novamente por 5 minutos a 85°C, e imediatamente colocada em gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento das análises.

Para as reações de qRT-PCR foi utilizado o composto fluorescente SYBR Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*). As análises de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho ABI 7300 (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*). Os *primers* utilizados nas reações foram desenhados de acordo com as sequências dos genes HSP70, GHR e IGF-I (números de acesso: EU816596.1, AY973232.1 e EU2721149.1), expressos em tilápias e depositados no site www.ncbi.nlm.nih.gov. O gene da β-actina (número de acesso: L08165) foi utilizado como controle endógeno da reação. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 µL e em duplicatas.

2.5. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do SAS. O procedimento Univariate foi utilizado para verificar a normalidade dos resíduos da expressão dos genes em estudo (expressos com $2^{-\Delta C_t}$) e dos dados de produção. Pela não conformidade

com os pressupostos de normalidade, os dados de expressão passaram pela transformação logarítmica $[\ln(x + 1)]$ (Voge et al., 2004). Procedeu-se à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade para os dados de desempenho e expressão gênica.

3. Resultados

3.1. Genotipagem e desempenho

Com a utilização de apenas um par de *primers* foi possível verificar dois padrões distintos de *amplicons*, chamados aqui GHbs (fragmento de 652 pb) e GHbd (fragmento de 652 e 700 pb) (Figura 1).

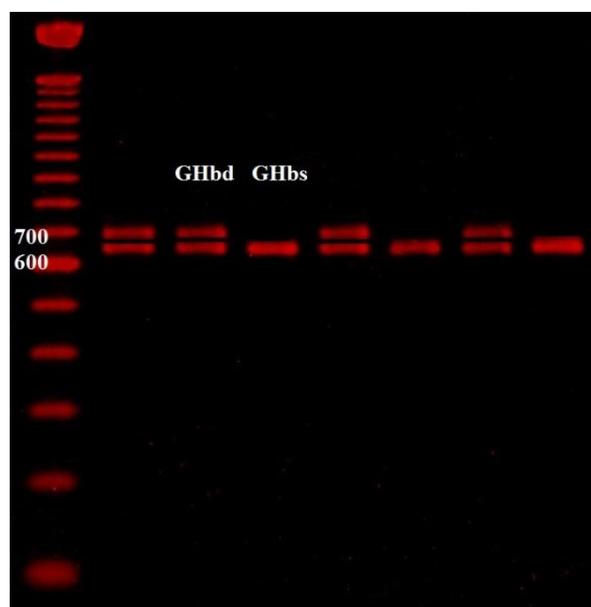


Figura 1. GH banda simples (GHbs) com um fragmento de 652 pb e GH banda dupla (GHbd) com dois fragmentos (652 e 700 pb). Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo a 0,5 μ g/ml.

Foram consideradas 30 tilápias para a categoria entre 20 a 35 g e 43 para a categoria entre 40 a 70 g. Dezesesseis animais com peso entre 20–35g apresentaram GHbs (53%) e catorze animais apresentaram GHbd (47%). Dezesete animais com peso entre 40–70g apresentaram GH com banda simples (39,5%) e vinte e seis apresentaram GH com banda dupla (60,5%).

Não houve interação entre genótipo (GHbs e GHbd) e categorias de peso (20 a 35g e 40 a 70g) para todas as características de desempenho estudadas. Entretanto, quando avaliado independentemente, o genótipo apresentou efeito significativo sobre as

variáveis PC, PV, PVISC, PF e COMP. Para a categoria de peso, foi verificado efeito significativo ($P < 0,05$) para todas as características (Tabela 1).

Tabela 1. Peso corporal (PC), peso vazio (PV), peso de vísceras (PVISC), peso do filé (PF), relação filé/carcaça vazia (FCV), rendimento de filé (RF), comprimento (COMP) e largura (LARG) de animais cruzados, GIFT x Tailandesa, dos genótipos GH banda simples (GHbs) e GH banda dupla (bd) e categorias distintas

	Categoria	PC (g)	PV(g)	PVISC (g)	PF (g)	FCV (%)	RF (%)	COMP (cm)	LARG (cm)
GHbs	20 – 35 g	27,51	22,36	5,15	3,66	32,50	52,86	113,07	13,50
	40 – 70 g	47,09	40,52	5,98	6,78	33,64	51,14	135,85	15,40
GHbd	20 – 35 g	27,51	22,28	5,24	3,57	31,56	57,86	114,01	13,43
	40 – 70 g	48,86	42,08	6,78	6,94	33,27	57,24	137,54	15,79
Efeito principal									
Genótipo	GHbs	37,60 ^B	31,72 ^B	5,57 ^B	5,27 ^B	33,09	55,44	124,81 ^B	14,48
	GHbd	41,39 ^A	35,15 ^A	6,24 ^A	5,76 ^A	32,67	55,12	129,31 ^A	14,96
Categoria	20 – 35 g	27,51 ^B	22,32 ^B	5,19 ^B	3,62 ^B	32,06 ^B	57,50 ^A	113,51 ^B	13,47 ^B
	40 – 70 g	48,16 ^A	41,46 ^A	6,46 ^A	6,88 ^A	33,42 ^A	52,06 ^B	136,88 ^A	15,63 ^A
Probabilidade	Genótipo	0,0005	0,0003	0,0317	0,0017	0,4737	0,7265	<0,0001	0,1042
	Categoria	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	0,0161	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Interação	0,4194	0,3810	0,2556	0,4314	0,6276	0,5652	0,7442	0,4560

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (P<0,05).

O genótipo GHbd apresentou média superior para todas as características, com exceção do RF, FCV e LARG. Comportamento semelhante foi verificado para a categoria de peso de 40-70g, que como esperado, apresentou as maiores médias em relação à categoria 20-35g, exceto para RF.

3.2. Expressão gênica no fígado e no músculo branco

Tilápias da categoria 20-35g e genótipos GHbs (n=4) e GHbd (n=4), e categoria 40-70g GHbs (n=4) e GHbd (n=4), foram avaliados com relação à expressão dos mRNAs do GHR e IGF-I no fígado e músculo branco. Não foi verificado efeito significativo da interação entre genótipo e categoria de peso para o IGF-I (P=0,0510) no fígado, entretanto para o GHR observou-se efeito significativo (P=0,0135), sendo a menor média de expressão observada entre a combinação de genótipo GHbd e a categoria de peso 40-70g (0,0401) no fígado das tilápias (Tabela 2).

Tabela 2. Expressão do mRNA do receptor do hormônio de crescimento (GHR) e fator de crescimento semelhante à insulina - I (IGF-I) no fígado de tilápias considerando os genótipos GHbs e GHbd e as categorias de peso 20-35g e 40-70g.

	Categoria	GHR	IGF-I
GHbs	20 – 35 g	0,0718 ^A	1,0151
	40 – 70 g	0,0685 ^A	1,2458
GHbd	20 – 35 g	0,0770 ^A	1,1717
	40 – 70 g	0,0401 ^B	1,0065
Efeito principal			
Genótipo	GHbs	0,1403	2,2609
	GHbd	0,1171	2,1782
Categoria	20 – 35 g	0,1488	2,2868
	40 – 70 g	0,1086	2,2523
Probabilidade	Genótipo	0,0762	0,5127
	Categoria	0,0042	0,5147
	Interação	0,0135	0,0510

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo Teste Tukey (P<0,05).

No músculo branco, também foi observado efeito significativo da interação entre genótipo e categoria de peso (P=0,0146) para a expressão do mRNA GHR, em que foi verificado a inversão no padrão de expressão para as duas categorias de peso dentro de cada genótipo. Não houve efeito de genótipo e categoria para expressão do mRNA IGF-I no músculo (Tabela 3).

Tabela 3. Expressão do mRNA do receptor do hormônio de crescimento (GHR) e fator de crescimento semelhante à insulina - I (IGF-I) no músculo de tilápias considerando os genótipos GHbs e GHbd e as categorias de peso 20-35g e 40-70g.

	Categoria	GHR	IGF-I
GHbs	20 – 35 g	0,1071 ^B	0,1065
	40 – 70 g	0,1352 ^{AB}	0,1241
GHbd	20 – 35 g	0,1499 ^A	0,0956
	40 – 70 g	0,1199 ^{AB}	0,1112
Efeito principal			
Genótipo	GHbs	0,2423	0,2307
	GHbd	0,2706	0,2069
Categoria	20 – 35 g	0,2578	0,2022
	40 – 70 g	0,2552	0,2354
Probabilidade	Genótipo	0,2351	0,1957
	Categoria	0,8746	0,0859
	Interação	0,0146	0,9226

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo Teste Tukey ($P < 0,05$).

A expressão do mRNA HSP70 no fígado foi analisada considerando apenas a variável categoria de peso. A maior média de expressão desse gene foi verificada nos peixes da categoria 20-35g, um aumento de aproximadamente 1400 % em relação à categoria 40-70g (Figura 2).

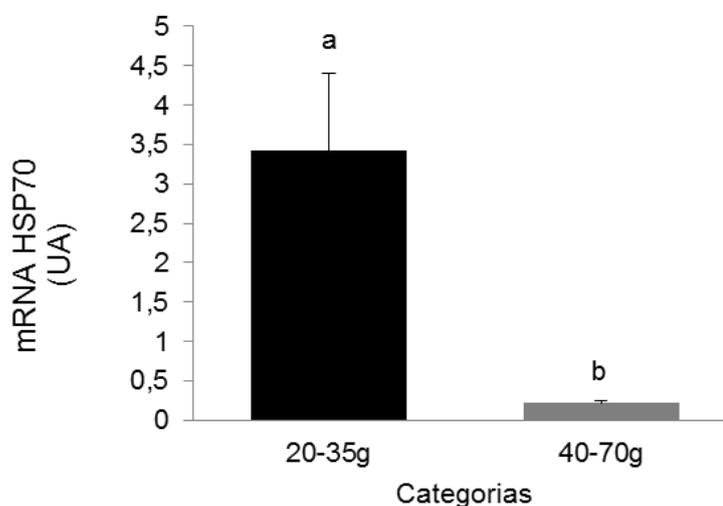


Figura 2. Expressão de mRNA HSP70 no fígado de tilápias, considerando duas categorias de peso, 20-35g e 40-70g. Letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente pelo Teste F ($P < 0,05$). Os resultados são mostrados como médias e erros-padrão.

4. Discussão

Os *primers* propostos para a realização desse experimento foram desenhados com intuito de diferenciar a amplificação do gene GH1 e GH2 em tilápias resultantes do

cruzamento GIFT x Tailandesa, de acordo com as sequências depositadas nos GenBank para a tilápia (número de acesso M97766 e M97765). A região alvo de amplificação é altamente conservada variando apenas pela presença de 4 pb, entretanto essa variação corresponde a um motif de um microsatélite localizado no intron 2 dos GHs. Até o momento, na literatura não foi encontrado nenhum relato da presença de alelos para esse microsatélite em tilápias. O GH das tilápias contém seis éxons e cinco íntrons com estrutura aparentemente similar a de outros peixes, mas diferindo dos mamíferos pela presença de um íntron adicional. Análises dos transcritos primários revelaram que o GH2 apresenta 1662 nucleotídeos e o GH1 1666, essa diferença de comprimento foi atribuída a presença do motif CTGT no íntron 2 (Ber e Daniel, 1992).

Neste trabalho observamos um padrão de amplificação diferente do esperado, com o aparecimento de uma banda adicional visualizada em gel de agarose, correspondendo ao fragmento de aproximadamente 700pb. A análise de sequenciamento dessa banda revelou se tratar do GH, descartada a possibilidade de amplificação inespecífica ou artefatos de PCR (resultados não apresentados). Desta forma, foi realizada análise de associação e expressão gênica com o polimorfismo encontrado.

De maneira geral, para as características de desempenho foram observadas médias superiores para as tilápias que apresentaram GHbd, com exceção apenas das características FCV, RF e LARG, nas quais as médias foram estatisticamente iguais. Embora, ainda não estejam estabelecidas as causas para o polimorfismo estudado, o fato de estar correlacionado a algumas das características quantitativas pode ser um indício de que essa variação esteja associada a expressão do GH em tilápias. Na literatura existem vários trabalhos de associação de polimorfismos no GH de tilápia a características de crescimento (Blanck et al., 2009; Kang et al., 2002; Gross e Nilson, 1999), entretanto a maioria dos estudos não deixa claro em qual dos dois genes do GH a mutação está localizada. Talvez isso ocorra pela grande homologia observada entre os dois transcritos do GH (99%), e por ele codificar um polipeptídeo 100% idêntico.

No presente trabalho, esperava-se que a região amplificada do GH1 e GH2 diferisse entre si pela presença de 4 nucleotídeos localizada no intron 2, entretanto observamos que essa variação foi maior, e algumas hipóteses podem ser propostas, uma delas seria a inserção de nucleotídeos em um dos dois genes, talvez o gene não transcrito. Essa hipótese pode ser possível visto que não está estabelecido até o momento se em tilápia os dois genes são alvos de transcrição. Ber e Daniel (1992)

caracterizaram o cDNA do GH em tilápia e esse correspondeu ao transcrito do GH1, mas não determinaram se o GH2 também estava expresso. Em Goldfish, dois tipos de GH também foram identificados (Law et al., 1996) sendo que esses podem ter funções fisiológicas diferentes. O GH tem sido relacionado direta ou indiretamente ao crescimento somático e como estimulador de processos metabólicos, assim como a divisão celular, crescimento esquelético, síntese proteica, funções reprodutivas e eficiência alimentar, entretanto em tilápia não encontramos relatos mostrando se existe diferença no mecanismo de ação dos dois GHs. Em Salmonídeos, cujo genoma é tetraploide, e o GH se encontra duplicado, foi observado a expressão dos dois GHs, sendo o mRNA GH1 mais expresso que o GH2 (Mori et al., 2001).

A maioria dos estudos tem concentrado esforços em buscar associação de polimorfismos a expressão diferencial no mRNA do GH, entretanto, resultados controversos quanto ao aumento do GH na estimulação do crescimento são encontrados. O aumento do GH no plasma e na expressão de mRNA GH na pituitária em oposição a diminuição do peso corporal e da taxa específica de crescimento quando os animais em jejum foi observado por Fox et al. (2006). Na realidade o crescimento envolve a expressão de vários genes e de seus receptores. Variação na estrutura genética do receptor do GH (GHR) tem sido associado com a resposta à terapia com GH em humanos (Dos Santos et al., 2004). Esse fato sugere que não somente os níveis séricos afetam a ação do GH sobre o crescimento, mas também a forma com que o GH interage com seu receptor se tornando mais ou menos eficiente no desencadeamento dos processos bioquímicos dentro da célula.

O GHR medeia à ação do GH sobre a célula alvo estimulando subsequentemente a transcrição de muitos genes incluindo o IGF-I (Kobayashi et al., 1999).

Nesse estudo, não foi verificada diferença na expressão do mRNA do IGF-I no fígado e músculo em função do genótipo e da categoria de peso, verificamos que somente para o GHR foi observado efeito de interação nos dois tecidos, sendo a combinação GHbd e 40-70g o que apresentou menor valor de expressão no fígado (0,0401 UA). De maneira geral foi observado que a expressão do GHR no fígado foi acompanhada pela expressão do IGF-I e que animais menores apresentaram maior expressão dos dois genes estudados. Esse comportamento pode ter sido observado porque os peixes da categoria 20-35g, embora da mesma idade, podem apresentar taxa de crescimento relativo maior, desde que tenham potencial genético para isso. No músculo, os níveis de IGF-I não sofreram grande variação se comparados ao fígado,

entretanto, foi verificado que os animais de genótipo GHbs e da categoria de peso 40-70g, em termos numéricos apresentaram maior expressão do IGF-I, diferente dos demais tratamentos.

A expressão do mRNA da proteína do estresse HSP70 no fígado, também foi avaliada considerando somente a categoria de peso das tilápias. A hipótese testada nesse caso foi a de que tilápias menores apresentam maior expressão desse gene. Nossos resultados sugerem que isso realmente ocorre, tilápias da categoria de peso 20-35g apresentam expressão do mRNA HSP70 aproximadamente 1400% maior que as da categoria 40-70g. Essa expressão alterada pode ser porque as tilápias menores estão mais sujeitas a perseguições e competição por alimentos em relação às maiores, uma vez que esses animais são muito territorialistas. O estresse pode interferir no metabolismo animal e conseqüentemente afetar o crescimento. Após a exposição ao agente estressor os peixes geralmente param de comer, iniciando uma série de respostas endócrinas, dentre elas o aumento do cortisol circulante. Esse hormônio tem como tecidos alvos as brânquias, intestino e fígado, esses órgãos refletem a ação do cortisol apresentando alterações no balanço hidromineral e metabolismo energético, provocando redução no crescimento e a supressão dos sistemas reprodutivos e imune (Castro e Fernandes, 2009).

5. Conclusões

Embora alguns resultados de associação tenham sido correlacionados aos genótipos, não podemos afirmar que seja efeito direto do polimorfismo estudado. Entretanto, podemos sugerir novos estudos para revelar a natureza genética desse polimorfismo e posteriormente verificar se um novo trabalho de associação seria viável.

Tilápias pertencentes à categoria 20-35g apresentaram maior expressão de mRNA HSP70 no fígado, demonstrando que o tamanho dos peixes influencia na expressão da HSP70.

Referências

Agellon, L.B., Davies, S.L., Lin, C.M., Chen, T.T., Powers, D.A., 1988. Rainbow trout has two genes for growth hormone. *Mol. Reprod. Dev.* 1, 11-17.

- Allendorf, F.W., Thorgaard, G.H., 1984. Tetraploidy and the evolution of Salmonid fishes, in: Turner, B.J. (Ed.), Evolutionary genetics of fishes. Plenum, New York, pp.1-53.
- Ber, R., Daniel, V., 1992. Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica*. *Gene* 113, 245-250.
- Ber, R., Daniel, V., 1993. Sequence analysis suggests a recente duplication of the growth hormone-encoding gene in *Tilapia nilotica*. *Gene* 125, 143-150.
- Blanck, D.V., Gasparino, E., Ribeiro, R.P., Marques, D.S., 2009. Polimorfismo no gene GH1-PstI associado a características corporais de linhagens de tilápia do Nilo. *Pesquisa agropecuária brasileira* 44, 599-604.
- Castro, F.J., Fernandes, M.N., 2009. Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixes cultivados, in: Tavares-Dias, M. (Ed.), Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Embrapa Amapá, Macapá, pp. 361-388.
- Dos Santos, C., Essioux, L., Teinturier, C., Tauber, M., Goffin, V., Bougnères, P., 2004. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increase responsiveness to growth hormone. *Nat. Genet.* 36, 720-724.
- Duan, C., 1998. Nutritional and Developmental Regulation of Insulin-like Growth Factors in Fish. *J. Nutr.* 128, 306S-314S.
- Filho, M.R., Zangeronimo, M.G., Lopes, L.S., Ladeira, M.M., Andrade, I., 2011. Fisiologia do crescimento e desenvolvimento do tecido muscular e sua relação com a qualidade da carne de bovinos. *Nutritime* 8, 1431-1443.
- Forbes, S.H., Knudsen, K.L., North T.W., Allendorf, F.W., 1994. One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1628-1631.
- Fox, B.K., Riley, L.G.; Hirano, T., Grau, E.G., 2006. Effects of fasting on growth hormone, growth hormone receptor, and insulin-like growth factor-I axis in seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol* 148, 340-347.
- Gross, R., Nilsson, J., 1999. 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* 173, 73-80.

- Kang, J.H., Lee, S.J., Park, S.R., Ryu, H.Y., 2002. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.* 68, 494-498.
- Kobayashi, Y., Vandehaar, M.J., Tucker, H.A., Sharma, B.K., Lucy, M.C., 1999. Expression of growth hormone receptor 1A messenger ribonucleic acid in liver of dairy cows during lactation and after administration of recombinant bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.* 82, 1910–1916
- Law, M.S., Cheng, K.W., Fung, T.K., Chan, Y.H., Yu, K.L., Chan, K.M., 1996. Isolation and characterization of two distinct growth hormone cDNAs from the Goldfish, *Carassius auratus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 330, 19-23.
- Mommsen, T.P., 2001. Paradigms of growth in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 207-219.
- Mori, T., Deguchi, F., Ueno, K., 2001. Differential expression of GH1 and GH2 genes by competitive RT-PCR in *Rainbow trout* pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 123, 137-143.
- Moriyama, S., Ayson, F.G., Kawauchi, H., 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 8, 1553-1562.
- Reinecke, M., Björnsson, B.T., Dickhoff, W.W., McCormick, S.D., Navarro, I., Power, D.M., Gutiérrez, J., 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go. *Gen. Comp. Endocrinol.* 141, 20-24.
- Rudbeck, L., Dissing, J., 1998. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *BioTechniques* 25, 588–92.
- Rezaei, A., Akhshabi S., 2011. Sequencing and sequence analysis of growth hormone type 1 (GH1) gene analogue in the *Salmo trutta caspius*. *International Journal of Animal and Veterinary advances* 3, 422-428.
- Sakamoto, T., McCormick, S.D., 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 24–30.
- Tanamati, F., Silva, S.C.C., Voltolini, D.M., Garcia, A.L.S.G., Ribeiro, R.P., Gasparino, E., 2013. Uso da extração alcalina em tecidos de tilápia do Nilo, in: *Zootec 2013, Brasil*.
- Tao, W.J., Boulding, E.G., 2003. Associations between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in Arctic charr (*Salvelinus alpinus L.*). *Heredity*, 91, 60-69.

Voge, J.L., Santiago, C.A.T., Aad, P.Y., Goad, D.W., Malayer, J.R. Spicer, L.J., 2004. Quantification of insulin-like growth factor binding protein mRNA using real-time PCR in bovine granulosa and theca cells: effect of estradiol, insulin, and gonadotropins. *Domest. Anim. Endocrinol.* 26, 241-258.

IV - EXPRESSÃO DO mRNA GHR/IGF-I E CRESCIMENTO MUSCULAR SOBRE CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO DE TILÁPIAS DO NILO, SUBMETIDAS AO JEJUM

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar em animais cruzados GIFT x Tailandesa, os efeitos do jejum sobre as características de desempenho, expressão do gene do receptor do hormônio do crescimento (GHR) e fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), e a morfometria das fibras musculares brancas. Os peixes foram submetidos ao período de jejum de 15 dias e foram avaliados nos dias 0 (C0), 5 (C5 e J5), 10 (C10 e J10) e 15 (C15 e J15), em que C0, C5, C10 e C15 são animais que continuaram recebendo alimento (controle); e J5, J10 e J15 animais em restrição alimentar. Foram realizadas as seguintes mensurações: peso corporal, peso de carcaça vazia, comprimento e largura. Amostras de fígado e músculo branco foram coletadas para avaliar a expressão de mRNA GHR e IGF-I por qRT-PCR, e amostras de músculo branco foram coletadas para avaliação morfométrica com determinação do menor diâmetro agrupados em diferentes classes. A restrição alimentar reduziu as médias de todas as características de desempenho avaliadas e, comparando animais em jejum com animais que continuaram recebendo alimento, observou-se que o jejum causou aumento da expressão de GHR hepático aos 5 e 10 dias, diminuição da expressão de IGF-I hepático e aumento da expressão de GHR e IGF-I no músculo aos 5, 10 e 15 dias. O crescimento muscular não foi modificado quando se compararam os animais em jejum com os animais do controle. Estes resultados indicam alterações no desempenho e expressão dos genes GHR e IGF-I no fígado e músculo esquelético de tilápias submetidas a diferentes períodos de jejum.

Palavras-chave: desempenho, jejum, expressão de mRNA, músculo estriado esquelético, *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate in crossbred GIFT x Thai, the effects of fasting on the performance characteristics, the gene expression of the growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor I (IGF-I), and morphometry of white muscle fibers. The fish were subjected to a fasting period of 15 days and they were

evaluated on days 0 (C0), 5 (C5 and F5), 10 (C10 and F10) and 15 (C15 and F15), where C0, C5, C10 and C15 - animals that continued to receive food; and J5, J10 and J15 - animals on feed restriction. The following measurements were obtained: body weight, empty carcass weight, length, and width. Samples of liver and white muscle were collected for mRNA expression GHR and IGF -I by qRT-PCR, and white muscle samples were collected for morphometric analysis with determining the smallest diameter grouped into different classes. Feed restriction reduced the average of all performance characteristics evaluated and comparing fasted animals to animals that continued to receive food, it was observed that fasting caused increased hepatic expression of GHR at days 5 and 10, reduced expression of IGF-I and increased hepatic expression of GHR and IGF-I on muscle at days 5, 10 and 15. These results indicate changes in performance and gene expression of GHR and IGF-I in liver and skeletal muscle subjected to different periods of fasting.

Keywords: performance, fasting, mRNA expression, striated muscle, *Oreochromis niloticus*

1. Introdução

A piscicultura de água doce tem se mostrado promissora no Brasil, país que além de possuir condições climáticas que favorecem a implantação de cultivos de peixes possui um vasto território de lâmina d'água. Dentre os peixes de água doce, destaca-se a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) uma das espécies mais cultivadas na produção aquícola brasileira (MPA, 2012) e a segunda espécie mais cultivada do mundo (FAO, 2012).

As características de crescimento são importantes na produção de tilápias, e têm sido o foco principal do melhoramento genético, principalmente por apresentar maior relevância econômica (Blanck et al., 2009).

A maior parte da massa corporal dos peixes é formada pelo músculo branco (Greer-Walker e Pull, 1975). O crescimento muscular ocorre pelos mecanismos de hiperplasia e hipertrofia a partir das células satélites (Mauro, 1961; Koumans e Akster, 1995). Na hiperplasia, a fusão entre células satélites ativadas resulta na formação de novas fibras musculares, enquanto na hipertrofia, as células satélites ativadas se fundem com fibras musculares existentes, aumentando o número de núcleos para maior síntese de miofibrilas, levando ao aumento na área da fibra muscular (Koumans e Akster, 1995; Johnston, 1999; Rowleron e Veggetti, 2001).

Sabendo-se que o crescimento muscular é determinado pelo balanço entre síntese e degradação proteica, hormônios responsáveis em promover o aumento da síntese proteica, como hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina - I (IGF-I), são candidatos naturais a estudos para verificar seus efeitos sobre o crescimento em peixes (Kang et al., 2002). Estudos têm mostrado que o estado metabólico, além de influenciar o crescimento muscular (Johansen e Overturf, 2006), pode alterar as concentrações ou expressão gênica de hormônios importantes como IGF-I e GH, e também influenciar a utilização dos nutrientes e o metabolismo basal, podendo alterar o gasto energético corporal e consequentemente influenciar o incremento calórico dos animais (Bottje e Carstens, 2009).

Os níveis de IGF-I plasmáticos, assim como o mRNA do IGF-I estão diretamente associados a condição alimentar dos animais. Peixes submetidos ao jejum apresentam redução de IGF-I no plasma e redução na expressão do mRNA IGF-I no fígado, essas alterações podem ser acompanhadas ou não, por elevação dos níveis de GH no sangue (Uchida et al., 2003).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o crescimento muscular, o desempenho e os níveis de expressão dos genes do hormônio de crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) no músculo e fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), submetidos ao jejum.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá-PR, durante o período de janeiro a março de 2013.

Foram utilizadas 300 tilápias revertidas do cruzamento de GIFT x tailandesa, provenientes da Piscicultura Piracema, Maringá-PR. Os animais com peso médio de 5g \pm 0,5 foram distribuídos em caixas de fibrocimento com volume útil unitário de 1,00 m³, com sistema individual de renovação da água (5 %/dia) e aeração constante por meio de pedra porosa acoplada a um soprador central.

Os animais receberam ração comercial extrusada (40% de proteína bruta). A dieta diária total foi distribuída três vezes/dia, às 8, 12, e 18 horas, o arraçoamento foi manual e a ração fornecida até saciedade aparente. A temperatura de cada tanque foi

aferida, e os tanques foram sifonados de manhã e à tarde para remoção de metabólitos e resíduos.

2.2. *Jejum*

Cento e vinte animais com pesos semelhantes (15,8g) foram separados em dois grupos experimentais, um mantido sob regime de alimentação (denominado como controle – C) e o outro em jejum (J). Após a divisão dos grupos todos os animais passaram por um período de 10 dias de adaptação. Todos os peixes foram pesados ao final de cada período experimental, sendo possível a obtenção do ganho em peso.

No dia 0 (início do período experimental) cinco peixes do tratamento controle foram abatidos. Após 5, 10 e 15 dias de experimento três peixes do tratamento controle e cinco peixes do tratamento jejum foram abatidos para avaliação. O grupo de animais controle abatido no dia 0 do experimento foi denominado C0, e os animais que continuaram a receber alimentação nos dias 5, 10 e 15 foram denominados C5, C10 e C15, respectivamente. Enquanto, o grupo de animais que permaneceu em jejum por 5, 10 e 15 dias, foi denominado J5, J10 e J15, respectivamente.

2.3. *Amostragem*

Antes de cada abate, para coleta de tecidos e mensurações, os animais permaneceram em jejum por 24 horas. No momento da coleta, os animais foram capturados, transportados ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Maringá e anestesiados para determinação do peso corporal (PC), o peso da carcaça vazia (PCV), o comprimento (COMP) e a largura (LARG). Amostras de fígado e de músculo branco dorsal foram coletados, acondicionados em “RNA holder” (BioAgency Biotecnologia Ltda., São Paulo, SP) e armazenadas a -20°C até o momento da extração de RNA. Para a avaliação morfométrica foram coletadas amostras da musculatura branca dorsal do animal.

2.4. *Análise morfométrica das fibras musculares brancas*

As análises foram realizadas no Laboratório de Histotécnica Animal, do Departamento de Morfologia, da Universidade Estadual de Maringá.

Os fragmentos da musculatura branca dorsal, de quatro peixes de cada tratamento, foram dissecados, fixados em solução de formol 10% tamponado, desidratados em séries crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em

parafina. Cortes transversais semis-seriados (6 μm), obtidos em micrótomo, foram submetidos à coloração Hematoxilina-eosina para avaliação da morfometria das fibras musculares brancas. Utilizando um sistema de análise de imagens (Image Pro-Plus versão 4.5), em campos aleatórios da lâmina histológica, foi determinado o menor diâmetro de, aproximadamente, 250 fibras musculares, por animal, que foram agrupadas em classes de diâmetros (< 20, 20-30, 30-50 e > 50 μm) para avaliar a contribuição da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular (Nebo et al., 2013) em cada tratamento. A frequência de fibras foi expressa pelo número de fibras em cada classe de diâmetro em relação ao número total de fibras medidas.

2.5. Extração de RNA, síntese de cDNA e qRT-PCR

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal, do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Viçosa-UFV, em junho de 2013.

O RNA total foi extraído com uso do reagente Trizol® (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) de acordo com as normas do fabricante, na proporção de 1mL para cada 100 mg de tecido. Todos os materiais utilizados foram previamente tratados com inibidor de RNase - RNase AWAY® (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). O tecido foi triturado com homogeneizador Polytron (tecido + Trizol) até a completa dissociação. Em seguida, foi adicionado 250 μL de água pura livre de RNase, homogeneizado manualmente por 1 minuto e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado também 200 μL de clorofórmio e as amostras agitadas antes da incubação por mais 5 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado por 15 minutos a 10.600 rpm a 4°C, e a fase aquosa coletada, sendo transferida para um tubo limpo e adicionada a mesma quantidade coletada de isopropanol em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas, incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 10.600 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas novamente a 10.600 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante descartado. O pelet foi seco por 20 minutos e ressuspenso em água ultrapura livre de RNase.

A concentração do RNA foi mensurada via espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 e 280 nm, e sua integridade foi avaliada em gel de agarose 1%, visualizado em luz ultravioleta. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (*Life*

Technologies, Carlsbad, CA, USA), para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, de acordo com as recomendações do fabricante.

Para síntese do cDNA foi utilizado o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix* (*Life Technologies, CA, Carlsbad, USA*) de acordo com as normas do fabricante. Em tubo estéril e livre de RNA, foram adicionados 6 µL de RNA total, 1 µL de oligo (dT) (50uM oligo(dT)₂₀) e 1 µL de tampão de anelamento (“annealing buffer”). A reação foi incubada por 5 minutos a 65°C, e colocada em gelo por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 10 µL de solução 2x *First-Strand Reaction Mix* (*Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e 2 µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa *SuperScript III* e o inibidor de RNase. A solução foi incubada por 50 minutos a 50°C. A reação foi incubada novamente por 5 minutos a 85°C, e imediatamente colocada em gelo. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento das análises.

Para as reações de qRT-PCR foi utilizado o composto fluorescente *SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*). As análises foram realizadas no aparelho ABI 7300 (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*). Os *primers* utilizados nas reações foram desenhados de acordo com as sequências dos genes GHR e IGF-I (AY973232.1 e EU2721149.1), expressos em tilápia, e depositados no site www.ncbi.nlm.nih.gov. O gene da β-actina (número de acesso: L08165) foi utilizado como controle endógeno da reação. Todas as análises foram realizadas em um volume de 25 µL e em duplicatas.

2.6. Análise estatística

Os dados de desempenho, expressão gênica e análise histológica foram analisados pelo procedimento GLM do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC), sendo o procedimento Univariate utilizado para verificar a normalidade dos dados. O método $2^{-\Delta Ct}$ foi utilizado para análise da expressão dos genes em estudo. Devido a não conformidade com os pressupostos de normalidade, os dados de expressão passaram pela transformação logarítmica [$\ln(x + 1)$] (Voge et al., 2004). Para as análises morfométricas, realizou-se à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para os dados de desempenho e de expressão gênica as médias foram comparadas por meio de contrastes.

3. Resultados

3.1. Desempenho

Os animais dos grupos controle, ou seja, os animais que receberam alimentação durante todo experimento, apresentaram maior peso final (PF) e ganho em peso (GP) (Tabela 1).

Tabela 1. Peso inicial (PI), peso final (PF) e ganho de peso (GP) dos grupos experimentais

	Grupos experimentais	
	Controle	Jejum
PI (g)	15,80 ^a	15,82 ^a
PF (g)	30,75 ^a	21,48 ^b
GP	14,95 ^a	5,66 ^b

Letras diferentes nas linhas diferem pelo teste de F ($P < 0,05$).

Animais do tratamento controle, C5, C10 e C15, apresentaram maior peso corporal (PC), peso de carcaça vazia (PCV), largura (LARG) e comprimento total (COMP) quando comparados com animais da mesma idade expostos ao jejum (J5, J10 e J15) (Figura 1).

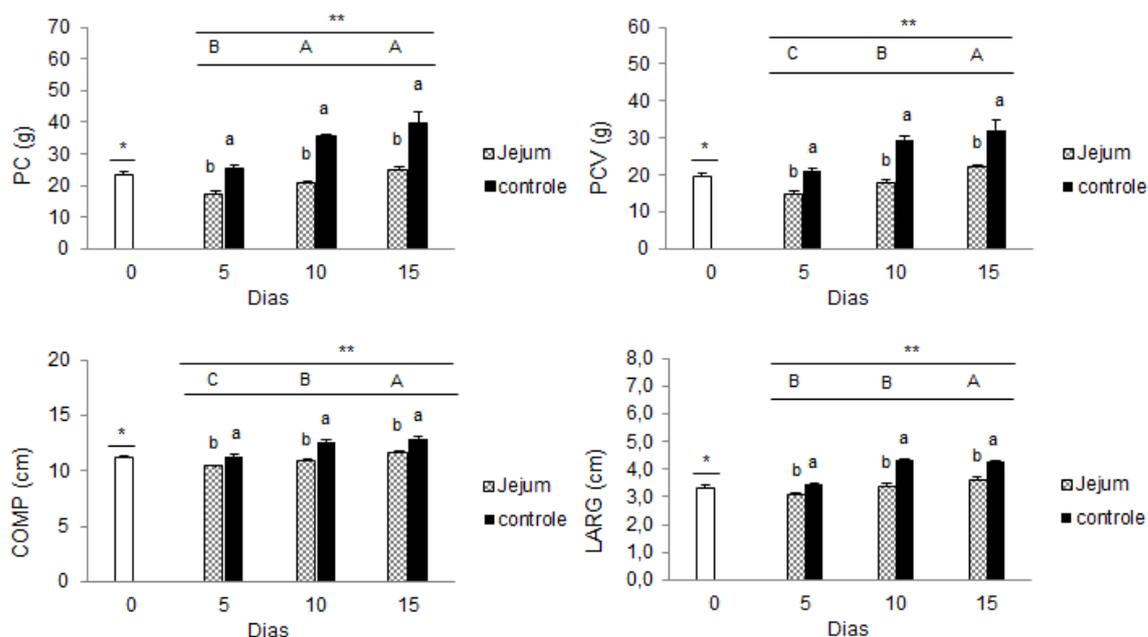


Figura 1. Peso corporal (PC), peso de carcaça vazia (PCV), largura (LARG) e comprimento total (COMP) de tilápias. Letras minúsculas representam diferença estatística entre animais de mesma idade em grupos experimentais diferentes (jejum e controle). Letras maiúsculas representam diferença entre os animais dos grupos em jejum nos dias 5, 10 e 15. Asteriscos representam diferença estatística entre o

tratamento controle - C0 e os demais tratamentos (5, 10 e 15 dias controle e jejum). Os resultados são mostrados como médias e seus erros-padrão.

A média dos animais do tratamento C0 diferiu dos demais tratamentos: controle e jejum aos 5 dias (C5 e J5), 10 dias (C10 e J10) e 15 dias (C15 e J15), para todas as características avaliadas.

Para PC, PCV, LARG e COMP, observou-se um aumento progressivo nas médias de ambos os grupos experimentais no decorrer dos dias, em que animais aos 15 dias de experimento apresentaram maiores valores que animais aos 5 dias.

3.2. Análise morfométrica das fibras musculares

Nenhum dos tratamentos apresentou fibras na classe $> 50 \mu\text{m}$. Portanto, as análises estatísticas foram realizadas considerando apenas três classes.

Não foi verificado o efeito de interação entre os tratamentos e as categorias. No entanto, observou-se efeito significativo para as classes de diâmetro, com a maior frequência de fibras na classe $< 20 \mu\text{m}$ seguida por uma diminuição da frequência nas classes 20-30 μm e 30-40 μm (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição da frequência de fibras musculares (%) em três diferentes classes dos dias C0 e J5, J10, J15 de jejum

Jejum (dias)	Classes		
	$< 20 \mu\text{m}$	20-30 μm	30-40 μm
C0	66,37	29,55	4,09
J5	61,11	34,61	4,28
J10	54,70	38,88	6,42
J15	60,68	36,67	2,65
Efeito principal			
Classes	$< 20 \mu\text{m}$		60,72a
	20 - 30 μm		34,93b
	20 – 50 μm		4,36c
Probabilidade	Jejum		NS
	Categoria		<0,0001
	Interação		0,1025

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.3. Expressão gênica no fígado e músculo branco

No fígado, a expressão de mRNA GHR não diferiu entre o grupo controle (C0, C5, C10 e C15) e o grupo em jejum (J5, J10 e J15) (Figura 2A), enquanto a expressão de mRNA IGF-I fígado foi maior para grupo controle (Figura 2C).

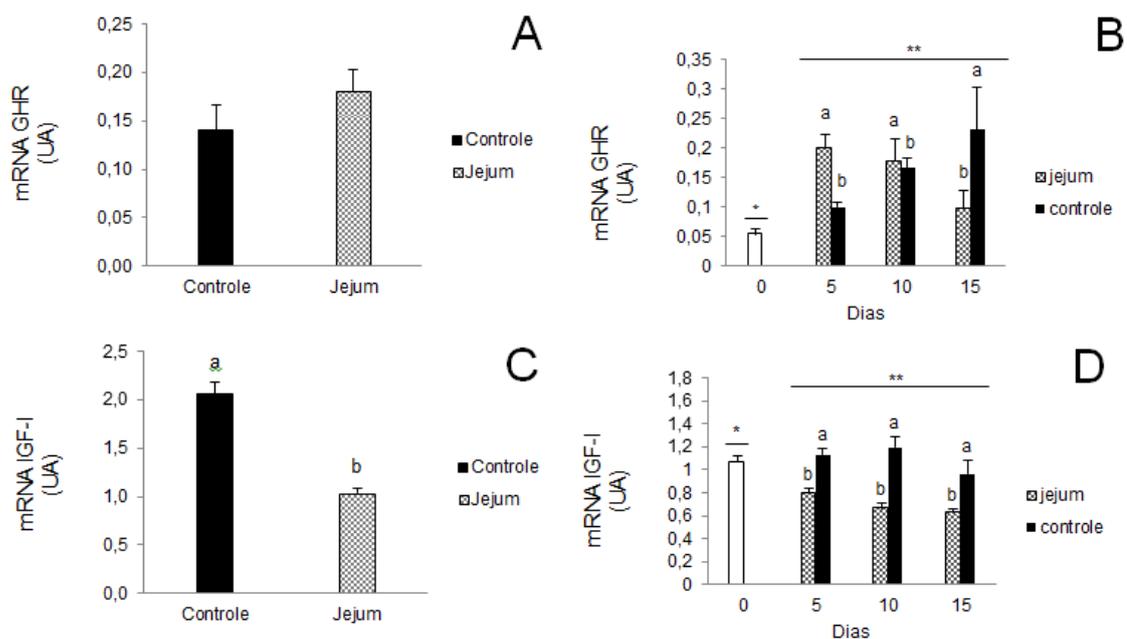


Figura 2. Expressão do gene do receptor do hormônio de crescimento – GHR (A e B) e fator de crescimento semelhante à insulina I - IGF-I (C e D) no fígado de tilápias submetidas a diferentes períodos de jejum. Letras minúsculas representam diferença estatística entre animais de mesma idade em grupos experimentais diferentes (jejum e controle). Asteriscos representam diferença entre o tratamento C0 e os demais tratamentos (5, 10 e 15 dias do controle e jejum). Os resultados são mostrados como médias e seus erros-padrão.

Diferenças foram observadas, considerando-se os valores de expressão de mRNA GHR e IGF-I hepático entre C0 e os demais tratamentos (Figura 2B e 2D). Em relação ao período de tratamento, observando o comportamento da expressão de mRNA GHR, verificou-se que esta diminuiu numericamente entre J5, J10 e J15, enquanto aumentou gradualmente para C5, C10 e C15. Comparando animais alimentados e animais em jejum nos dias 5, 10 e 15, maiores valores de expressão de mRNA GHR foram encontrados para animais do jejum, jejum e controle, respectivamente.

Maior expressão do mRNA IGF-I no fígado foi verificada nos peixes dos grupos C5, C10 e C15 comparada com peixes dos grupos J5, J10 e J15. Tilápias em jejum, J5, J10 e J15, apresentaram redução progressiva da expressão de IGF-I durante os períodos avaliados.

No músculo a expressão de mRNA GHR e IGF-I foi maior para os animais em jejum (J5, J10 e J15) em relação ao controle (C0, C5, C10 e C15) (Figura 3A e 3C).

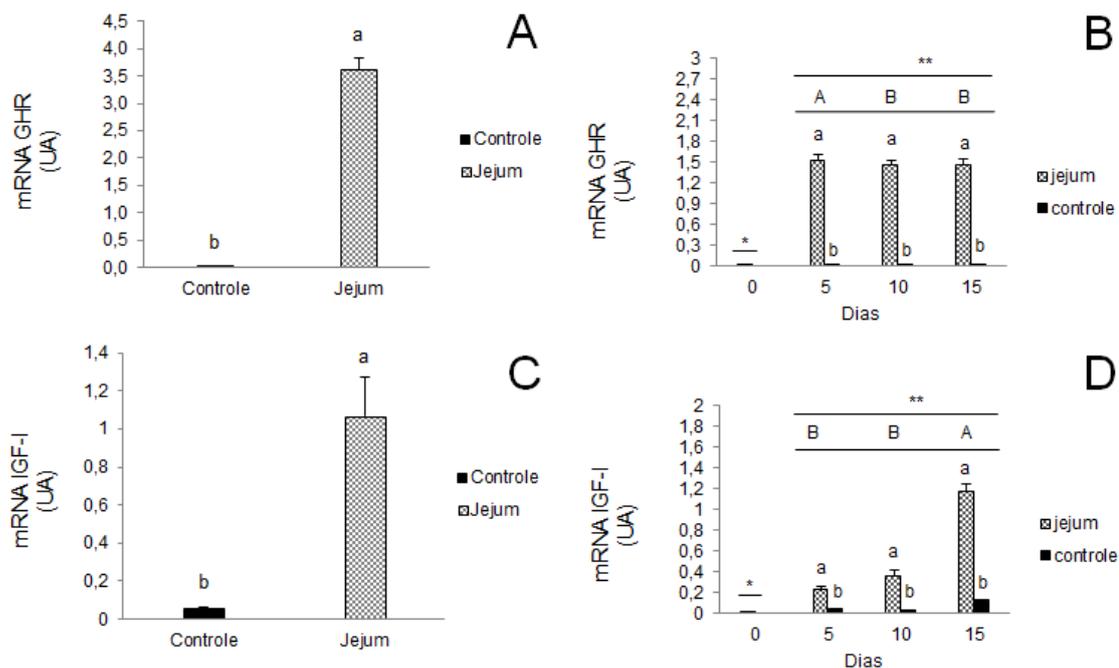


Figura 3. Expressão do gene do receptor do hormônio de crescimento – GHR (A e B) e fator de crescimento semelhante à insulina I - IGF-I (C e D) no músculo de tilápias submetidas a diferentes períodos de jejum. Letras minúsculas representam diferença estatística entre animais de mesma idade em grupos experimentais diferentes (jejum e controle). Letras maiúsculas representam diferença entre os animais dos grupos em jejum nos dias 5, 10 e 15. Asteriscos representam diferença estatística entre o tratamento controle- C0 e os demais tratamentos (5, 10 e 15 dias controle e jejum). Os resultados são mostrados como médias e seus erros-padrão.

Assim como no fígado, no músculo a expressão de mRNA de C0 também diferiu dos demais tratamentos (Figura 3B e 3D). No músculo, independente da idade de avaliação, a expressão de mRNA GHR e IGF-I foi maior em animais do jejum em comparação aos do controle. Em relação aos períodos, maior valor de expressão foi encontrado para J5 e menores valores para J10 e J15, que não diferiram. Para o IGF-I foi verificado aumento significativo da expressão, tendo J15 apresentado maior valor médio e J5 e J10 menores valores.

4. Discussão

É de conhecimento geral que para se ganhar peso há necessidade de se ingerir alimentos e que o jejum em peixes pode promover o atraso no crescimento ou mesmo redução na taxa de crescimento, dependendo do tempo de privação alimentar. A redução gradual de peso foi observada por Montserrat et al. (2007) e Fox et al. (2006), que mantiveram por quatro semanas de jejum, as espécies *Oncorhynchus mykiss* e

Oreochromis mossambicus, respectivamente. Neste trabalho os animais submetidos ao jejum, J5, J10 e J15, não apresentaram diminuição progressiva de peso quando em restrição alimentar por um período máximo de 15 dias, sendo possível observar através da avaliação do PC, PCV, LARG e COMP, um atraso no crescimento que pode ser resultado da capacidade de adaptação a diversas condições da tilápia. Como esta espécie é capaz de se alimentar por filtração (Loures et al., 2001), o que se pode sugerir é que durante o período de jejum as tilápias utilizaram tal mecanismo, se adaptando e crescendo continuamente, mesmo que as caixas tenham sido sifonadas de manhã e à tarde.

Outro indício da capacidade de adaptação das tilápias pode ser observado pelos resultados obtidos pela frequência das fibras musculares em classes de diâmetro. No presente trabalho, a frequência de fibras nas três classes foi semelhante comparando os animais em jejum (J5, J10 e J15) e o controle (C0). Portanto, para os animais cruzados GIFT x Tailandesa 5, 10 e 15 dias de jejum não promoveram alteração no crescimento muscular em relação ao controle.

As classes de diâmetro $< 20 \mu\text{m}$ e $20\text{-}30 \mu\text{m}$ indicam ocorrência de hiperplasia (Valente et al., 1999, Rowleron e Veggetti, 2001), enquanto a classe $30\text{-}40 \mu\text{m}$ indica início de diferenciação e hipertrofia (Nebo et al., 2013). Dessa forma, a maior frequência de fibras na classe $< 20 \mu\text{m}$ seguida por uma diminuição da frequência nas classes $20\text{-}30 \mu\text{m}$ e $30\text{-}40 \mu\text{m}$ indica que a hiperplasia foi o principal mecanismo de crescimento muscular em todos os tratamentos. A contribuição da hiperplasia e hipertrofia é variável de acordo com o período de crescimento, com a hiperplasia sendo mais intensa nas fases iniciais (Dal Pai-Silva et al., 2003, Almeida et al., 2008), de acordo com nossos resultados.

Diversos autores têm trabalhado o uso de diferentes estratégias alimentares em tilápias para obter informações quanto ao metabolismo e controle hormonal associados à restrição alimentar (Uchida et al., 2003; Fox et al., 2006; Montserrat et al., 2007; Imsland et al., 2008; Fox et al., 2010).

Dois importantes hormônios associados ao crescimento são GH e o IGF-I. O GH tem sido identificado como forte regulador dos níveis de IGF-I em peixes (Imsland et al., 2008). Quando se liga a seus receptores localizados na membrana da superfície celular do tecido alvo (GHR), formando o complexo GH-GHR, inicia suas ações biológicas, como a produção e liberação de IGF-I no fígado e na maioria dos tecidos periféricos (Moriyama et al., 2000).

A expressão hepática de GHR foi maior aos 5 e 10 dias para os animais em jejum, e aos 15 dias maior expressão foi verificada para os animais do tratamento controle. Observou-se a diminuição da expressão hepática de IGF-I em razão do jejum em todos os períodos. A privação de alimento para tilápias, mesmo por quatro semanas, não desempenhou nenhum efeito sobre a expressão de mRNA GHR hepático, entretanto, produziu a redução nos níveis de mRNA IGF-I (Fox et al., 2006). Resultado semelhante para o IGF-I foram descritos por Uchida et al. (2003) que restringiram a alimentação por duas semanas e observaram redução na expressão hepática de mRNA IGF-I em *Oreochromis mossambicus*. Semelhantemente, Montserrat et al. (2007) observaram após duas semanas de privação alimentar, redução na expressão de mRNA IGF-I de *Oncorhynchus mykiss*. A alteração na expressão de mRNA IGF-I de animais em jejum pode indicar dependência entre a produção hepática de IGF-I e o regime alimentar, ou ainda a redução na expressão de mRNA IGF-I pode ocorrer por causa da baixa expressão de mRNA GHR. Defeitos na sinalização de GHR e na síntese do IGF-I, conforme sugerido por Fox et al. (2006) também podem causar a diminuição de IGF-I.

Houve um aumento na expressão de GHR no músculo esquelético, causado pelo jejum. Resultados semelhantes foram observados por Fox et al. (2010) e Pierce et al. (2007), nos quais após quatro semanas de jejum a expressão de mRNA GHR de tilápias no músculo aumentou significativamente. Nesse estudo, a expressão do IGF-I no músculo esquelético foi maior no jejum, semelhante ao observado pelo GHR. Na musculatura, o complexo GH/GHR estimula a expressão do gene IGF-I, que está relacionado à síntese de proteínas (Duan, 1998). Assim, a elevada expressão de IGF-I no jejum pode indicar que o músculo esquelético estava tentando crescer o que não ocorreu pela falta de nutrientes, fato que justifica o não aparecimento de fibras na classe > 50 µm ou o crescimento por hipertrofia.

Diferentes respostas como as encontradas no fígado e no músculo esquelético, quanto à expressão de GHR e IGF-I, sugerem que cada um dos genes pode se expressar de forma distinta dependendo do tecido em questão, sendo influenciados por diversos fatores. A redução da expressão hepática de IGF-I em comparação com o aumento da sua expressão no músculo sugere que, quando o fígado expressa baixos níveis de mRNA IGF-I, os tecidos extra-hepáticos aumentam a sua expressão.

5. Conclusões

A restrição alimentar promove redução de todas as características de desempenho avaliadas e alterações na expressão de GHR e IGF-I no fígado e no músculo esquelético, sem causar modificações no crescimento muscular em relação ao controle.

Referências

- Blanck, D.V., Gasparino, E., Ribeiro, R.P., Marques, D.S., 2009. Polimorfismo no gene GH1-PstI associado a características corporais de linhagens de tilápia do Nilo. *Pesquisa agropecuária brasileira* 44, 599-604.
- Bottje, W.G., Carstens, E., 2009. Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. *J. Anim. Sci.* 87, E48-E63.
- Dal Pai-Silva, M., Carvalho, R.F., Pellizzon, C.H., Dal Pai, V., 2003. Muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Tissue Cell* 35, 179-187.
- Duan, C., 1998. Nutritional and Developmental Regulation of Insulin-like Growth Factors in Fish. *J. Nutr.* 128, 306S-314S.
- FAO - Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, Itália. 251p.
- Fox, B.K., Riley, L.G.; Hirano, T., Grau, E.G., 2006. Effects of fasting on growth hormone, growth hormone receptor, and insulin-like growth factor-I axis in seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol* 148, 340–347.
- Fox, B.K., Breves, J.P., Davis, L.K., Pierce, A.L., Grau, E.G., 2010. Tissue-specific regulation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during fasting and re-feeding: Importance of muscle expression of IGF-I and IGF-II mRNA in the tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 573-580.
- Greer-Walker, M., Pull, G.A., 1975. A survey of red and white muscle in marine fish. *J. Fish Biol.* 7, 295-300.
- Imslund, A.K., Foss, A., Roth, B., Stefansson, S.O., Vikingstad, E., Pedersen, S., Sandvik, T., NORBER, G., 2008. Plasma insulin-like growth factor-I concentrations and growth in juvenile halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Effects of photoperiods and feeding regimes. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 151, 66-70.

- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177, 99-115.
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2006. Alterations in expression of genes associated with muscle metabolism and growth during nutritional restriction and refeeding in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 144, 119-127.
- Kang, J.H., Lee, S.J., Park, S.R., Ryu, H.Y., 2002. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Sci.* 68, 494-498.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A. 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 110, 3-20.
- Loures, B.T.R.R., Ribeiro, R.P., Vargas, L., Moreira, H.L.M., Sussel, F.R., Povh, J.A., Cavichiolo, F., 2001. Manejo alimentar de alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), associado às variáveis físicas, químicas e biológicas do ambiente. *Acta Sci.*, 23, 877-883,
- Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493-494.
- Monserrat, N., Gabillard, J.C., Capilla, E., Navarro, M.I., Gutiérrez, J., 2007. Role of insulin, insulin-like growth factors, and muscle regulatory factors in the compensatory growth of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 150, 462-472.
- Moriyama, S., Ayson, F.G., Kawauchi, H., 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 8, 1553-1562.
- MPA - Ministério da pesca e aquicultura. 2012. Boletim estatístico da pesca e aquicultura. Brasília, Brasil. 129p.
- Nebo, C., Portella, M.C., Carani, F.R., Almeida, F.L.A., Padovani, C.R., Carvalho, R.F., Dal Pai-Silva, M., 2013. Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 164, 268-274.
- Pierce, A.L., Fox, B.K. Davis, L.K., Visitacion, N., Kitahashi, T., Hirano, T., Grau, E.G., 2007. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: Tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 154, 31-40.

- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle Development and Growth*. London: Academic Press, 103-139.
- Uchida, K., Kajimura, S., Riley, L.G., Hirano, T., Aida, K., Grau, E.G., 2003. Effects of fasting on growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 134A, 429-439.
- Valente, L. M. P., Rocha, E., Gomes, E. F. S., Silva, M. W., Oliveira, M. H., Monteiro, R. A. F., Fauconneau, B. 1999. Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of *Rainbow trout*. *J. Fish Biol.* 55, 675-691.
- Voge, J.L., Santiago, C.A.T., Aad, P.Y., Goad, D.W., Malayer, J.R. Spicer, L.J., 2004. Quantification of insulin-like growth factor binding protein mRNA using real-time PCR in bovine granulosa and theca cells: effect of estradiol, insulin, and gonadotropins. *Domest. Anim. Endocrinol.* 26, 241-258.

V - CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crescimento é uma característica importante na área de produção animal. Mesmo sendo o tema principal de diversos trabalhos, novos estudos estão surgindo buscando maiores informações quanto ao seu funcionamento e os fatores que podem alterá-lo.

A variação presente no GH de tilápias já foi pesquisada por alguns autores, entretanto, neste trabalho, pode-se observar que a maioria das características avaliadas obteve maiores valores para um dos genótipos considerados, GHbd. Entretanto, é necessário ressaltar, que novas pesquisas devem ser realizadas para comprovar tal associação. O mesmo não foi observado para a expressão de mRNA GHR e IGF-I.

Genes que afetam o crescimento também foram analisados quando os animais foram submetidos à privação alimentar por 15 dias. A expressão de tais genes sofreu alteração, assim como o desempenho. Não foi possível observar modificação no crescimento muscular comparando animais em jejum (J5, J10 e J15) com animais do tratamento controle (C0).

VI – NORMAS DA REVISTA

Aquaculture

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Numbering.** Manuscripts that are sequentially numbered (e.g., I, II, etc.) are no longer accepted.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with

country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

• *Present/permanent address.* If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be not longer than 400 words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 4-6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Highlights of the manuscript

As part of the submission process, authors are required to provide 3 or 4 highlights, each one sentence long. Beyond stating key discoveries, these highlights must explicitly establish why the work is novel and why it has an application to aquaculture. It is not sufficient to state that the species is one that is farmed.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the

International Code of Zoological Nomenclature. 2. All biota (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified. 4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. Note that in the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Example 1: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺ and not Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O. The repeated writing of

chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P₂O₅).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi. *Please do not:*

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. *For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.* Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article

and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style Text: All citations in the text should refer to: 1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication; 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown' List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. Examples: Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal Abbreviations Source

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot

be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. *Ensure that the following items are present:* One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.