UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIANA FLORENCIO MARQUES

Associação de polimorfismo microsatélite no gene GH em Tambaqui
(*Colossoma macropomum*) com características fenotípicas e expressão gênica

Pirassununga

2018

MARIANA FLORENCIO MARQUES

Associação de polimorfismo microssatélite no gene GH em Tambaqui
(*Colossoma macropomum*) com características fenotípicas e expressão gênica

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências do programa de Pós-Graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. José Bento Sterman Ferraz

Pirassununga

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F333a Florencio Marques, Mariana
 Associação de polimorfismo microssatélite no gene
 GH em Tambaqui (*Colossoma macropomum*) com
 características fenotípicas e expressão gênica /
 Mariana Florencio Marques ; orientador José Bento
 Sterman Ferraz ; coorientador Heidge Fukumasu. --
 Pirassununga, 2018.
 37 f.

 Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
 Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
 Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

 1. Expressão gênica. 2. Marcador molecular. 3.
 Tambaqui. 4. Hormônio do crescimento. 5. Versão
 Corrigida. I. Sterman Ferraz, José Bento , orient.
 II. Fukumasu, Heidge, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Associação de polimorfismo microsatélite no gene GH em Tambaqui (*Colossoma macropomum*) com características fenotípicas e expressão gênica", protocolada sob o CEUA nº 6310140317, sob a responsabilidade de **Mariana Florencio Marques e equipe; Heidge Fukumasu** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 16/08/2017.

We certify that the proposal "Association of microsatellite polymorphism in the GH gene in Tambaqui (*Colossoma macropomum*) with phenotypic characteristics and gene expression", utilizing 200 Fishes (males and females), protocol number CEUA 6310140317, under the responsibility of **Mariana Florencio Marques and team; Heidge Fukumasu** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 08/16/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **01/2015** a **04/2018** Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de doação espontânea**

Espécie: **Peixes** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **2 a 3 anos** N: **200**
Linagem: **Tambaqui** Peso: **1500 a 2200 g**

Resumo: Serão avaliadas neste estudo nove famílias de tambaquis de maneira que consigamos uma variação genética para análise de associação molecular com características de desempenho expressão gênica do Gh.

Local do experimento: O experimento foi realizado na Fazenda Biofish-Aquicultura em Porto Velho-RO. No final do experimento, após eutanásia dos animais, as amostras foram coletadas e trazidas para o Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da FZEA, onde está armazenado e as análises já estão acontecendo.

Pirassununga, 11 de maio de 2018

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

*À minha querida vó Nita e ao meu tio Dim lindão, que agora me olham lá do
céu, dedico esse trabalho...*

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós;
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”*

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP – Campus de Pirassununga, pela pós-graduação sólida e oportunidade de conhecer pessoas especiais.

Ao Professor Dr. José Bento Sterman Ferraz, pela orientação.

Ao professor Dr. Heidge Fukumasu, pela coorientação.

Ao Projeto Pró-Amazônia e a CAPES pela oportunidade de realização do estudo e pela bolsa de doutorado concedida.

À Fazenda Biofish-Aquicultura por terem aberto suas portas e permitido a realização do experimento e por toda ajuda prestada.

Ao pessoal da UMC e do LAAGOA pela colaboração, apoio e carinho.

Ao pessoal do Oceanográfico/USP pelo auxílio e aprendizado.

Aos Professores e Doutores, pela participação na banca examinadora e contribuição para este trabalho.

Aos funcionários e professores da FZEA pelo apoio e auxílio.

Aos técnicos dos laboratórios, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao pessoal do LOCT e do GMABT, pela ajuda prestada.

Aos amigos que aqui fiz com os quais muito aprendi.

Principalmente a Deus, pela força, fé e oportunidades que sempre me proporcionou, além da família maravilhosa que me permitiu nascer, sem a qual nada seria.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

Agradeço de coração!

RESUMO

MARQUES, M. F. **Associação de polimorfismo microssatélite no gene GH em Tambaqui (*Colossoma macropomum*) com características fenotípicas e expressão gênica.** 2018. 41 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

O objetivo do trabalho foi verificar se existe associação dos polimorfismos de locus microssatélites com o desempenho e expressão gênica. Após genotipagem, os alelos 122 e 130 foram observados, com frequência de 0,94 e 0,06. A frequência gênica foi de 0,88 para animais 130/130 e de 0,12 para indivíduos 122/130. Não houve diferença para os dados fenotípicos entre animais de genótipos diferentes, embora o grupo de animais heterozigoto tenha apresentado uma leve superioridade. A taxa de expressão do Gh não é estatisticamente diferente entre os genótipos observados, porém o grupo homozigoto teve uma taxa de expressão de mRNA maior e mesmo assim menores valores de peso e comprimento, sugerindo uma correlação. O par de iniciadores desenhado amplificou e genotipou com eficiência o locus STR nos animais estudados. A falta de qualidade da água e o manejo inadequado dos animais podem ser os causadores das alterações histopatológicas encontradas no fígado dos animais estudados. Os peixes podem ser via de contaminação humana, devido ao seu consumo como alimento, portanto, medidas de controle devem ser iniciadas para minimizar esse processo. Estudos mais aprofundados com maior controle ambiental, maior variabilidade alélica, maior número amostral e análise de outros genes de interesse associados, seriam interessantes para complementar e enriquecer o presente trabalho.

Palavras-chave: Expressão gênica; Marcador molecular; Tambaqui; Hormônio do crescimento.

ABSTRACT

MARQUES, M. F. **Association of microsatellite polymorphism in the GH gene in Tambaqui (*Colossoma macropomum*) with phenotypic characteristics and gene expression.** 2018. 41 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

The objective of this study was to verify if there is association of polymorphisms of microsatellite loci with the performance and gene expression. After genotyping, alleles 122 and 130 were observed, with a frequency of 0,94 and 0,06. The gene frequency was 0,88 for 130/130 animals and 0,12 for 122/130 individuals. There was no difference for phenotypic data among animals of different genotypes, although the group of heterozygous animals presented a slight superiority. The expression rate of GH is not statistically different among the observed genotypes, but the homozygote group had a higher mRNA expression rate and even lower values of weight and length, suggesting a correlation. The pair of primers designed amplified and efficiently genotyped the STR locus in the animals studied. The lack of water quality and inadequate management of the animals may be the cause of the histopathological changes found in the liver of the animals studied. Fish can be a way of human contamination, due to their consumption as food, therefore, control measures must be initiated to minimize this process. Further studies with greater environmental control, greater allelic variability, greater sample size and analysis of other associated genes of interest, would be interesting to complement and enrich the present work.

Keywords: Gene expression; Molecular marker; Tambaqui; Growing hormone.

• SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. TAMBQUI (<i>COLOSSOMA MACROPOMUM</i>)	11
2.2. FUNÇÃO, POLIMORFISMO E ASSOCIAÇÃO ÀS CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO.....	12
2.3. MICROSSATÉLITES COMO MARCADORES MOLECULARES.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. ANÁLISE E ASSOCIAÇÃO DO MICROSSÁLITE NO PROMOTOR DO GENE DO GH COM CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E EXPRESSÃO GENICA.....	16
3.1.1. LOCALIZAÇÃO E PERÍODO EXPERIMENTAL	16
3.1.2. ANIMAIS.....	17
3.1.3. AMOSTRAGEM.....	18
3.1.4 HISTOPATOLOGIA DO FIGADO DOS TAMBAQUIS.....	19
3.1.5. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	19
3.1.6. AMPLIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DO LOCUS STR	20
3.1.7. EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA E QRT-PCR.....	21
3.2. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. HISTOPATOLOGIA DE FIGADO	24
4.2. EXPRESSÃO GÊNICA E CRESCIMENTO.....	26
5. CONCLUSÃO.....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de organismos aquáticos configura-se como a mais intensa atividade dentro do agronegócio em termos de exploração comercial. Porém, a aquicultura ainda não se beneficia dos 30% de ganho em produtividade que o melhoramento genético e a nutrição podem contribuir.

Praticamente todas as áreas agricultáveis da Terra já estão ocupadas, pela agricultura ou pela pecuária, bem como já usufruem dos ganhos de produtividade proporcionados pelo melhoramento genético e nutrição. Com uma população mundial crescente, as proteínas de origem aquática assumem uma importância primordial, já que a exploração dos recursos hídricos existentes ainda esta longe de atingir a capacidade de suporte.

Em 2016, a produção total da piscicultura brasileira foi de 507,12 mil toneladas, representando um aumento de 4,4% em relação ao ano anterior (IBGE, 2016).

A produção de peixes redondos em cultivo tem crescido expressivamente no Brasil nos últimos anos, e chegou a se igualar à produção de tilápia no biênio 2013/2014. Esse aumento deve-se principalmente ao tambaqui (*Colossoma macropomum*), que é a principal espécie nativa cultivada no país e cuja produção, em 2016, chegou a 136,99 mil toneladas, sendo Rondônia o estado que mais produz, contribuindo com 27,0% do total da despesca do país. A criação da espécie é maior no Norte do País, e representou 79,8% do total nacional. O Estado de Rondônia é o principal produtor da espécie e respondeu por 50,8% do total da produção nacional e 63,7% da produção regional no ano (IBGE, 2016).

O expressivo crescimento da produção brasileira de tambaqui se deve às suas características zootécnicas e adaptabilidade da espécie, destacando-se a facilidade de obtenção de juvenis, bom potencial de crescimento, atingindo de 2 a 3 kg em um ano de cultivo quando bem manejados, alta rusticidade, seu hábito alimentar onívoro-filtrador e sua grande aceitação pelo mercado consumidor em função da consistência e do sabor de sua carne (INOUE e BOIJINK, 2011).

As características de crescimento são importantes na produção de peixes, e têm sido o foco principal do melhoramento genético, principalmente por apresentar maior relevância econômica (BLANCK et al., 2009). Para maximizar ganhos por geração, os programas de melhoramento têm utilizado marcadores moleculares para

selecionar progenitores de valor genético extremo. Dentre os marcadores mais informativos estão os microssatélites, tendo em vista sua expressão codominante e multiallelismo (O'CONNELL e WRIGHT, 1997). Estes marcadores são amplamente utilizados na identificação de estoques geneticamente divergentes, monitorar os níveis de endogamia nos plantéis e em estudos de associação com desempenho produtivo oferecendo, assim, perspectivas promissoras ao melhoramento genético, devido ao aumento da intensidade e acurácia de seleção (ROMANA-EGUIA et al., 2004; MELLO et al., 2008).

Hormônios responsáveis em promover o crescimento, como o hormônio do crescimento (*Growth Hormony*, GH), são candidatos naturais a estudos para verificar seus efeitos sobre o desenvolvimento em peixes (KANG et al., 2002). O gene do GH, direta ou indiretamente, é o principal regulador de crescimento somático pós-natal, estimulando processos anabólicos, tais como a divisão celular e o crescimento muscular (DE-SANTIS e JERRY, 2007). A sua relação 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).

Abordagens complementares de genética quantitativa e molecular são escassas em organismos aquáticos, principalmente em peixes nativos. Uma vez que não há estudos suficientes sobre a relação dos STR's e seus possíveis efeitos sobre a transcrição do gene que codifica o GH em peixes, o presente trabalho teve por objetivo verificar se os polimorfismos de locus microssatélite na região 5' proximal do promotor do gene do hormônio do crescimento em tambaquis está associado ao crescimento muscular e a expressão do gene.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Figura 1.), é uma espécie de peixe de água doce pertencente à ordem Characiformes e a família Serrasalminidae (FROESE e PAULY, 2017), e trata-se do segundo maior peixe de escamas da América do Sul (ISAAC e RUFFINO, 2000). Nativo das Bacias Solimões/Amazonas e Orinoco (MENDONÇA *et al.*, 2009) é uma espécie migratória, rústica, resistente a hipóxia prolongada (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998) que apresenta ampla tolerância térmica (BERNARDO e GOMES, 2013).

Figura 1. Exemplar de juvenil de Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Fonte: Arquivo Pessoal

É uma das espécies aquáticas mais consumidas como fonte de proteína na alimentação da população da região Norte do Brasil (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995). Com um bom padrão de crescimento e produtividade, fato que torna abundante a sua oferta no mercado consumidor, o tambaqui vem se tornando uma das principais espécies nativas para a piscicultura brasileira nas últimas décadas. Conta também com grande interesse de piscicultores de outros países da América do Sul, devido a sua rusticidade e qualidade de carne (GOUDING e CARVALHO, 1982).

Apesar de seu cultivo ser possível em todo o Brasil, o risco de alta mortalidade durante os meses de inverno tem desencorajado o cultivo nos estados das regiões Sul e Sudeste, particularmente, em locais onde as águas podem atingir temperaturas abaixo de 17°C (KUBITZA e KUBITZA, 2004); a temperatura ideal fica em torno dos 25°C a 30°C (SILVA e GURGEL, 1999). Desse modo, o cultivo do tambaqui tem concentrado nas regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste do país, onde além do clima favorável, a espécie desfruta de grande aceitação no mercado (KUBITZA e KUBITZA, 2004).

A média de idade na qual o tambaqui atinge a maturidade sexual é de 3 a 4 anos. Embora seja um peixe reofílico, ou seja, não desova naturalmente em cultivo pois esses precisam vencer as correntezas dos cursos d'água para maturar as suas gônadas (PROENÇA e BITTENCOURT, 1994), as técnicas de reprodução em laboratório existentes, funcionam muito bem para esses animais.

2.2. Função, polimorfismo e associação às características de produção do hormônio do crescimento

A modulação do crescimento de vertebrados é feita principalmente por hormônios do crescimento, com destaque para a somatotrópica ou GH (*Growth hormone*) e as somatomedinas ou IGF (*Insulin growth factors*). O GH é uma proteína globular produzida na parte anterior da hipófise e regulado por hormônios hipotalâmicos. Trata-se de um hormônio pituitário fundamental para o crescimento somático normal, desenvolvimento e crescimento linear em vertebrados. Em teleósteos possui 191 aminoácidos com peso molecular variando de 21 a 22 Kda (BERNIER et al., 2009; TAKEI e LORETZ, 2006).

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-1 no fígado e na maioria dos tecidos periféricos (FOX et al., 2006).

O IGF-1 por sua vez atua na lipólise do tecido adiposo, auxilia no incremento da tomada de Ca^{2+} e nos mecanismos responsáveis pelo crescimento ósseo. Além disso impulsiona o crescimento das fibras musculares por meio de mecanismos responsáveis pela manutenção da síntese proteica (DUAN et al., 2010; OTTO e PATEL, 2010).

A maior expressão de IGF-1 está associada ao aumento da hipertrofia miofibrilar, ao incremento da síntese proteica e a proliferação de mioblastos. A sinalização através do receptor do IGF-1 induz a estimulação de diferentes cascatas de sinalização intracelular altamente interligados e fortemente regulamentados por vias que estimula a proliferação celular e a síntese proteica promovendo a hipertrofia muscular em peixes (OTTO e PATEL, 2010).

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-1. Dessa forma, associações de polimorfismo no GH, GHR e IGF-1 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).

A ocorrência de polimorfismos para o gene GH já foi descrita para muitas outras espécies de peixes como *Salmo trutta* (GROSS e NILSON, 1995), *Salmo solar* (PARK et al., 1995), *Oncorhynchus kisutch* (FORBES et al., 1994). A maioria destes polimorfismos ocorre na região não-codificadora do gene GH (FORBES et al., 1994; GROSS et al., 1996; GROSS e NILSON, 1999). Isso não significa, necessariamente, que esta variação seja neutra, uma vez que a ação de genes podem ser controlados por combinações de regiões de DNA distantes (MARQUES-RESENDE et al., 2011).

Em peixes, alguns estudos de associação de polimorfismos em genes do eixo GH com peso já tem sido relatados (DE-SANTIS; JERRY, 2007). O polimorfismo no gene IGF-1 e seu efeito sobre o crescimento foi estudado por Tao e Boulding (2003). Entretanto, não foi possível observar associação significativa entre polimorfismo no IGF-1 e taxa de crescimento. Em estudo realizado por Blanck et al. (2009), um polimorfismo foi identificado no intron I do gene GH1 por meio da técnica de PCR-RFLP. O estudo realizado com tilápias, demonstrou que este SNP pode ter associação direta com características morfométricas, pois maior porcentagem dos animais heterozigotos apresentaram maior comprimento total, comprimento padrão, altura e largura. Desse modo, observa-se a necessidade de mais estudos, com

outras espécies, para identificação de polimorfismos no gene GH de peixes com importância comercial.

2.3. Microssatélites como marcadores moleculares

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como uma isoenzima, ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1998).

O uso de marcadores moleculares permite que a seleção seja realizada antes da idade reprodutiva, o que aumenta, consideravelmente, a eficiência de um programa de melhoramento dado à redução no intervalo de gerações. Podem ser utilizados, em diferentes estudos de estimativas da estrutura populacional, estabelecimento de relações filogenéticas (identificação de espécies e híbridos), construção de mapas genéticos e definição de estratégias de melhoramento (FREGUSON et al., 1995).

Dentre os marcadores moleculares mais eficientes estão os microssatélites, também conhecidos como “*Short Tandem Repeats*” (STR). Os STRs são elementos repetitivos, formados por arranjos de repetições em sequência (*tandem*), de dois a seis nucleotídeos de comprimento e estão entre os locus mais polimórficos dos genomas (FERGUSON et al., 1995; MILACH, 1998). O polimorfismo desses marcadores baseia-se na variação do número de elementos repetidos, provavelmente devido a erros da DNA polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de DNA (STUDART, 2001). A repetição dinucleotídica [CA] n é uma das mais abundantes famílias de microssatélites nos genomas de vertebrados, ocorrendo a uma média de 15 a 30 kilobases. Os microssatélites predominantes em peixes compreendem, até agora, repetições de duas bases, usualmente (GT/AC) n ou (CT/CA) n (LEE e KOCHER, 1996). Os microssatélites apresentam uma série de vantagens para serem usados como marcadores genéticos, são abundantes, cobrem extensivamente o genoma, possuem natureza multialélica, necessitam de pequenas quantidades de DNA para análise, são de fácil detecção por reação em cadeia da polimerase (PCR), têm herança do tipo mendeliana e são expressos como alelos codominantes (LIMA, 1998; MOREIRA, 1999).

Atualmente, os marcadores microssatélites estão sendo utilizados para determinação de coeficientes de endogamia e índices de diferenciação da população e vem apresentando eficácia e dando apoio a programas de gestão na aquicultura (TAVARES et al., 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Análise e Associação do microssálite no promotor do gene do Gh com características fenotípicas e expressão genica

O conhecimento sobre os marcadores moleculares tornou possível diversos estudos na genética quantitativa, sendo a herança quantitativa (QTL's – *Quantitative Trait Locus*) regulada por vários genes e o fenótipo definido por variantes. O propósito de mapear a herança quantitativa é inferir sobre seus genótipos, para através de associações estatísticas com STR's, estimar seus efeitos e sua localização (JANGARELLI e EUCLYDES, 2008). Conforme Chistiakov (2006) no campo da pesca e aquicultura, STR's são úteis para identificação do material genético e seleção de reprodutores que favoreçam a passagem de características de interesse.

Já foram relatados estudos de associações de polimorfismos com o gene GH em algumas espécies de peixes como o Salmão – do – Atlântico (*Salmo salar*), a Dourada (*Spaurus aurata*) e a Tilápia – do – Nilo (*Oreochromis niloticus*) (BLANCK *et al.*, 2009). O objetivo desse experimento é ver se isso também acontece com o tambaqui.

3.1.1. Localização e período experimental

O experimento foi conduzido na fazenda comercial Biofish – Aquicultura (Figura. 2), com sede em Porto Velho-RO. O município de Porto Velho está localizado a 85 m de altitude com uma posição geográfica de 8°45'43" de latitude sul e 63°54'14" de longitude oeste, e, de acordo com o sistema de classificação de Köppen, se enquadra no tipo Aw - Clima Tropical Chuvoso. A média anual da temperatura do ar é de 25,5°C, com uma pequena oscilação ao longo do ano, sendo setembro o mês mais quente e julho o mais frio, com máxima e mínima de 32°C e 21°C. Durante o ano, a umidade relativa média do ar é de aproximadamente 84% (SILVA *et al.*, 2004). O experimento foi realizado de janeiro de 2015 a outubro de 2016.

Figura 2. Vista aérea da Fazenda Biofish - Aquicultura

Fonte: Caio Augusto Perazza

3.1.2. Animais

Foram utilizados 200 juvenis de tambaquis originados do acasalamento entre 3 machos e 3 fêmeas, objetivando compor famílias de irmãos-completos e meio-irmãos, totalizando nove acasalamentos. Os animais foram mantidos separados por famílias, até atingirem em média 5,0 gramas de peso vivo, onde aproximadamente 50 peixes de cada família foram marcados com introdução de microchip em sua porção ventral (Figura 3.).

Os animais foram anestesiados, uma pequena incisão com auxílio de um bisturi foi realizada na região abdominal e introduzido o microchip manualmente. Os animais recuperaram-se da anestesia num recipiente com oxigenação e para evitar infecção por fungos e bactérias, no local da inserção do microchip, foi aplicado Azul de Metileno.

Figura 3. Leitor e tambaqui de 5,0g pronto para receber o microchip

Fonte: Caio Augusto Perazza

Após esse procedimento, os tambaquis foram transferidos para um viveiro escavado com aproximadamente 600 m² de lâmina d'água. Os animais foram alimentados três vezes ao dia com uma ração comercial extrusada e moída contendo 46% de Proteína Bruta, fornecida à base de 18% da biomassa até atingirem 10g de peso vivo. Após esse período, na fase de crescimento e engorda, os peixes passaram a receber ração extrusada contendo 30% de Proteína Bruta à base de 8% da biomassa.

3.1.3. Amostragem

Realizou-se a primeira pesagem e avaliação morfométrica quando os animais foram manejados para a introdução dos microchips. Para abate, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, e no momento da coleta, foram capturados com rede de arrasto, transportados para caixas d'água e anestesiados. Posteriormente, o peso corporal (PC) do animal foi determinado, assim como: comprimento padrão (COMP), largura (LARG) e altura do corpo (ALT).

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 a hipófise foi coletada, acondicionada em RNAlater® *Stabilization Solution* (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, SP) e armazenada a -80°C até o momento da extração de RNA. Para histopatologia do fígado, pequenos fragmentos do órgão foram obtidos, fixados em solução de formaldeído tamponado

10% e armazenado para posterior análise no Laboratório de Ecologia da Reprodução e do Recrutamento de Organismos Marinhos, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.

3.1.4 Histopatologia do Fígado dos Tambaquis

As amostras foram processadas no segundo a técnica de Behmer (1976), desidratados em séries crescentes de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes transversais seriados de aproximadamente 5µm de espessura foram corados com Hematoxilina e Eosina de Put (HE) para análise geral e pesquisa das histopatologias. Igual número de cortes foi submetido à reação histoquímica de Perls para pesquisa de depósito de Fe⁺⁺⁺. As alterações histopatológicas observadas no fígado foram fotomicrografadas e ordenadas, segundo o grau de severidade das lesões, conforme escala sugerida por Bernet et al. (1999).

A observação das lamínas foi realizada em microscópio ótico utilizando-se as objetivas 10x e 40x, e as lesões encontradas foram fotomicrografadas em fotomicroscópio AXIOSKOP – ZEIS.

3.1.5. Extração do DNA Genômico

As análises foram realizadas no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura da Universidade de Mogi das Cruzes (LAGOAA), Mogi das Cruzes – SP.

A extração do DNA foi realizada conforme protocolo de extração salina com adaptações (ALJANABI e MARTINEZ, 1997). Uma porção de 20mg de cada nadadeira foi cortadas e transferidas para tubos de 1,5 mL onde foi realizada a reidratação com 500 µL de tris-EDTA 1x (TE) por 30 minutos. O TE foi retirado dos tubos e foram adicionados a cada amostra 500 µL de tampão de lise e 10 µL de proteinase K e incubadas a 55°C por 2 horas com agitação. Adicionou-se 5 µL de RNase e as amostras foram incubadas por mais 30 minutos a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas na velocidade máxima por 15 minutos e 500 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 mL. Foi adicionado 300 µL de NaCl em cada amostra e foram centrifugadas por 15 minutos. Novamente 500 µL do

sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 mL, 550 µL de isopropanol foi adicionado, as amostras foram agitadas e armazenadas à -20°C over night. Na manhã seguinte foram centrifugadas na velocidade máxima por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, o pelete foi lavado com 750 µL de etanol 70%, as amostras foram secas em estufa à 37°C por 2 horas, os peletes foram resuspensores em 100 µL de água ultra-pura, as amostras foram agitadas e homogeneizadas com auxílio de uma pipeta e estocadas em freezer a -20°C para posterior amplificação.

3.1.6. Amplificação e Genotipagem do Locus STR

Para este estudo a região no promotor do gene do GH foi alvo para a amplificação, que possui 391 pb e os *primers* utilizados foram desenhados conforme sequência depositada no GenBank para as regiões STR em questão: Forward-Promotor (5'CCCCGAAAAGACACTACACC3') e Reverse-Promotor (5'CAATGACAGCAGGGATAGG3'). A variação na repetição do microssatélite é um tetranucleotídeo [CACT], portanto, apenas uma diferença de 4 pb é esperada para os *amplicons*.

O DNA genômico foi amplificado em um volume final de reação de 25 µL contendo: 2,5 µL *buffer* (100 mM Tris-HCL pH 8,8; 500 mM KCL); 1,5 µL de MgCl₂; 0,2 µL de dNTP; 0,5 µL de cada *primer*; 0,4 UI de Taq DNA polimerase; 2,0 µL de DNA genômico; 15,4 µL de H₂O deionizada q.s.p. A amplificação foi executada em termociclador *Veriti*TM Dx (Applied Biosystems®) utilizando o seguinte programa: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos para desnaturação inicial; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 52°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 30 segundos para extensão; 1 ciclo de 72°C por 10 minutos para extensão final, 10°C para estabilização. A eficiência da amplificação foi verificada por eletroforese vertical em gel *Matrix Plus* de poliacrilamida 6,5% e detectado pelo sequenciador automático DNA Analyzer 4300, Li-Cor (IR2, Lincoln, NE, USA). Um marcador de peso molecular de 50 a 350 pb marcado com o fluoróforo IRDye®700 com iguais intensidades de bandas em 90% de solução de formamida e azul de bromofenol foi utilizado para detecção do tamanho das bandas. Os tamanhos dos Alelos foram estimados utilizando o programa Saga^{GT} Client (Li-color Biosciences, Lincoln, NE, USA).

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

As análises foram realizadas no Laboratório de Oncologia Comparada e Transgenia, do Departamento de Medicina Veterinária, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP – Pirassununga, SP.

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 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 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 Super Script 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) 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 Super Script 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 para a quantificação da expressão do Gh foram desenhados com base nos dados depositados no site www.ncbi.nlm.nih.gov através da ferramenta BLAST e também baseado na comparação com uma parte do genoma do Tambaqui sequenciado (Figura 4) Primer Fw 5'CCGTGTGCAACACCTTCAC3' e Primer Rv 5'TCAGGCGGTATGATGTGC3'; o gene que expressa a proteína ribossomal 18S foi utilizado como controle endógeno da reação. Todas as análises foram realizadas em um volume de 10 µL e em duplicatas.

Gatgactgcattggtgaagagccactgcagaggttaaactcggatgatggcgaacagaggttaaggctgaaatagccct
tataacttcacccttgaatgggctgctgttagggctgaagaggcagacacatgtaaagcatttggtatgtcaaaga
aacattcagagcaggcaataatttgcagcgtagattaaatttaataatgtttacacaccacatcaaagtcttttat
ttcaaaaagtgcagaaaaggagcttttctgtgatgtggaccctttaaattagtaattgtcaaataaaatctccaag
agtttcaactctttatactgcataatttctgtacacagctctgcccattgttttagtcccaattaaactcaaattagcatt
ttactttaacttttatctctcataaaaactggagtaaatgaccaatgaagaatctttaATGATTTCAGtccaaagac
agtgtatgtatgttaaagatgctttttcacattctAAAGGATTGGTGCTGCTCTCTGTTGTGGTGGCAAGTGTGTT
CATTAGCCAGGGCTCAACCTCTGAGAATCAACGGATCTTCAACAATGCAGTCATCCGTGTGCAACACCTTCACCA
GCTGGCTGCGAAGATGATCACCGATTTTgtaaaattcctttaaactatcatttagtttagaatcaccgatttaac
tctgcagtgtagatctcttctatttgagttatttgtttaaagaantactccatcatttttcaaccttacctctgt
tcgccacatctgttaccactacaggtgtttctagactgccacttgttttagggcacagcctaacctctttgcttg
tcagttgtagtgcagaaacagctctgcattaaaaaacaacagctgcattttttgactgactattatataatattaa
tgatgtattaaattcagttacacttcctaagatgctaacttaactaatgactttggttagtgctctaatatgca
ttgttggttaggctacaagtgatttagccttatgctggcatttagcaactccgctttgagaacagctggcatagagac
tcacctcatggaaactaacaacggttcaaagaaaagatgctgaggccttatgggaaatgtagtgaataattgtttg
tgtcacgtagtttcgccaacaatctagattaaaacaggaaaccttatagcttacatgttgaccttaaaactggga
aaacagtggggcatgcagcattttactgggccacaccaattcactacagacactacatttcccagagtaccctt
ttttcccttttaaatgcttcttctgttctgtttttaagtacaagtaaatattatccgtggcaactgatggttca
aaatagatgcaaaagacagagattagactgaaaacggtggagaattcctttaaaaaggggaccaataagaacca
ctggttgtcacaaagaagcacagtttaagttcatttttaatcaggtacaacttaataaaaataactgttttgcttattg
tgttgccattctgaaGAGGAAAGTCTTTTACCTGAGGAACGCAGACAGCTGAGCAAGATTTTCCCCCTGTCCTTC
TGCAATTCTGACTCCATTGAAGCCCCACTGGCAAGGACGAGACCCAGAAGAGCTCTGTGCTGAAATTGCTGCAC
ATCTCATACCGSCTGATCGAGTCTTGGGAGTACCCASCAGGATCCTCGGAAASCCCAACCAGATTACAGAGAAG
CTGGCTGACCTGAAAGTGGGCATTAGTGTGCTTATCAAGGATGTCTGGATGGCCAAACCAACATGGACGACAAT
GAATCTCTGACCCTACCATTGGAAGACTTCTACCAGACCTTGGGTGATGGAAACTCAAGAAAGAGCTTACGTCTG
CTGGCATGCTTCAAAAAGGACAAGCACCCAGAGAAGACATATCTGCGGTGGACAACCTGC

Figura 4. Primers construídos para amplificação da região alvo: Primer Fw em violeta e Primer Rv em azul. Letras minúsculas: promotor e introns. Letras maiúsculas: exons – 1, 2, 3 e 4. Separados pelas cores. TATA box em verde claro. Em cinza: códon de início de tradução. Cinza e sublinhado: STR.

3.2. Análises estatísticas

Para as análises histopatológicas, os dados foram analisados por meio do teste de Student (teste t).

Para verificação de possíveis erros de genotipagem e se o tamanho amostral foi suficiente utilizou-se o software Micro-Checker. As heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), as frequências genotípicas e alélicas foram calculados usando o software R (R Development Core Team, 2010).

Os dados de desempenho, expressão gênica 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 t a 5% de probabilidade. As médias de expressão gênica do Gh entre os grupos genéticos foram comparadas por meio de um teste de médias (teste t, $p > 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Histopatologia de Fígado

Uma das mais importantes funções do fígado é limpar o sangue que vem do intestino, de qualquer substância estranha ou poluente (SALEH, 1982), sendo assim, qualquer alteração que prejudique seu funcionamento, resulta em grande impacto na sanidade do indivíduo e consequentemente da população. A análise histopatológica realizada nos exemplares de *C. macropomum* coletados em uma Piscicultura comercial mostrou alterações morfológicas no fígado (Figura 5). Pequenos vasos sanguíneos, chamados de vasos sinusóides, são observados por entre os hepatócitos (Figura 5D). Quando corados pela técnica do Perls, os fígados apresentaram uma alta reação positiva a presença de ferro (Figura 5B). Apenas 60% dos animais apresentaram anomalias de grau leve ou moderado enquanto que nos outros 40% as anomalias encontradas são classificadas como irreversíveis (Figura 6).

Figura 5. Morfologia do tecido hepático de *C. macropomum*, ilustrando as lesões encontradas. A – Hipertrofia ductal (setas); B – Hemossiderose em grau 3 (setas); C – Colestase; D – Necrose focal (seta grossa) e Congestão de vasos e sinusóides (setas).

As lesões encontradas indicam uma precária sanidade do ambiente aquático. O que pode acarretar perdas em produtividade, uma vez que os animais desviam energia de ganho, para combater fontes de estresse, como o baixo suporte de oxigênio dissolvido, poucos nutrientes disponíveis, oscilação da temperatura, infestação parasitária, exemplificado pelo aumento de reação inflamatória e a presença de necrose (FLORES LOPES e MALABARBA., 2007). Áreas de necrose foram encontradas também por Campos et al. (2008) em peixes cultivados em locais contaminados por pesticidas agrícolas.

Figura 6. Frequência das lesões encontradas no tecido hepático de *C. macropomum*, relacionada com a escala do grau de severidade das lesões.

O tipo de alimentação e a qualidade do alimento podem provocar lesões ao tecido hepático. Caballero et al. (1999) encontraram processos inflamatórios e acúmulo de lipídios no fígado de *Sparus aurata*.

Os centros de melanomacrófagos (CMM) quase não foram encontrados nos fígados que apresentaram lesões mais severas, sugerindo um dano tecidual agudo, comprometendo o mecanismo de defesa e podendo levar o animal a morte. Estas estruturas são grandes granulomas hepáticos compostos quase que exclusivamente de macrófagos e estes encontram-se separados do parênquima hepático por uma

delgada camada de tecido fibroso e um moderado número de linfócitos (FERGUSON, 1989). Segundo Agius (1980), a sua função é capturar partículas estranhas ou partículas derivadas de destruição ou degeneração celular, eliminando-as pelo processo de fagocitose.

O fígado é a maior glândula exo-endócrina dos vertebrados e apresenta uma série de funções, dentre as quais se destaca o acúmulo de substâncias de reserva, em especial sob a forma de glicogênio e de lipídios (BUCKE et al., 1984). Seu bom funcionamento é fundamental para uma população saudável.

4.2. Expressão Gênica e Crescimento

Durante a corrida no gel de poliacrilamida a emissão da fluorescência pelo fluoróforo M13 presente nas amostras amplificadas foi capturada pelo equipamento DNA Analyzer 4300 que gerou picos evidentes e com pouco ruído, isto é, com ausência de pequenos picos oriundos de amplificação inespecífica (Figura 7), dando indício que a genotipagem e a análise de polimorfismo foram acuradas.

Figura 7. Amostras em gel de poliacrilamida da corrida no aparelho DNA Analyzer 4300 e analisadas no programa Saga^{GT} Client. As setas em preto e vermelho indivíduos com genótipos 130/122 e 130/130 respectivamente, e os retângulos em vermelho e azul apontam os alelos presentes na população, respectivamente 130 e 122.

Considerando todos os acasalamentos os genótipos obtidos foram 122/130 e 130/130 com uma frequência de 12% e 88%, respectivamente. Já a frequência alélica para foi de 6% para o 122 e 94% para o 130.

Figura 8. Frequencia genotípica (A) e frecuencia alélica (B) na população de tambaqui de uma Piscicultura Comercial no Norte do Brasil.

Há trabalhos que demonstram a associação de polimorfismos na região promotora do GH com taxa de crescimento em peixes de diferentes espécies e outras espécies de produção. No trabalho realizado por Bernardini et al. (1999) com truta arco-íris, encontraram que fatores de transcrição secretadas pela pituitária interferiam na expressão do gene responsável pela produção de GH. Já no trabalho de Blanck et al. (2009), utilizando a técnica de PCR-RFLP, identificou polimorfismos no íntron 1 do gene GH1 da tilápia – do - nilo e este apresentou correlação significativa com o comprimento total, comprimento padrão, altura e largura corporal.

Tabela 1. Peso médio e comprimento dos juvenis de tambaqui por grupo genético e acasalamento.

		Primeira Coleta		Segunda Coleta		Terceira Coleta	Quarta Coleta	
		Peso	Comp	Peso	Comp	Peso3	Peso	Comp
Acasalamentos	1	4,28	4,92	227,16	19,89	773,82	1114,18	32,92
	2	4,85	5,15	276,87	19,30	807,50	1030,00	32,56
	3	7,59	5,89	185,43	12,61	766,96	993,91	32,12
	4	3,41	4,34	242,81	17,41	859,37	1272,50	33,96
	5	10,31	6,47	331,00	19,12	866,00	1396,50	35,59
	6	3,86	4,62	297,72	20,84	825,21	1119,85	33,01
	7	7,41	6,02	234,00	17,34	791,00	1002,00	31,90
	8	4,85	5,09	254,16	18,04	831,11	1106,67	32,88
	9	4,46	4,95	265,62	18,90	862,92	1231,25	33,70
Grupo Genético	130/130	5,00	5,06	249,41	18,49	807,69	1127,71	33,09
	122/130	5,15	5,20	270,71	19,36	848,09	1167,62	33,16

Com relação às medidas morfométricas (Tabela 1) embora tenha sido observada diferença entre os grupos genéticos (Teste t, $p < 0.05$), nota-se uma superioridade no grupo dos animais com genótipo 122/130.

Os valores observados não estão de acordo com os trabalhos realizados com outros peixes e outros marcadores. A população era bastante homogênea, não existiram muitas variáveis interferentes. Os animais tinham a mesma idade, foram manejados juntos, mesmo tanque, mesma água, mesma alimentação.

Podemos observar que também não existe diferença entre as taxas de expressão do Gh para os grupos genéticos. Existe uma variação considerável dentro do grupo, mas não entre os grupos.

O fato do polimorfismo encontrado ocorrer em região não codificadora não significa que essa mutação seja necessariamente neutra, pois segundo Gross e Nilsson (1999), é possível a ocorrência de equilíbrio entre genes e regiões gênicas. A ocorrência de polimorfismos no íntron 1 e sua associação ao crescimento já foram relatadas em peixes como o linguado (Kang et al., 2002) e o salmão-do-atlântico (GROSS E NILSSON, 1999). Também foram observados polimorfismos no gene GH, em regiões não codificadoras, associados à produção, em bovinos, aves e suínos (KUHNLEIN et al., 1997; ZHOU et al., 2005; FARIA et al., 2006).

Figura 9. Taxa de expressão de Gh na hipófise de juvenis de tambaqui cultivados em tanque escavado.

O fato do polimorfismo encontrado no promotor do gene do Gh ser um microssatélite explicaria essa ausência de diferença entre os grupos, pois existe a possibilidade de sequências de 4 STR seriam mais facilmente detectáveis pelos mecanismos de reparo do DNA que um SNP, e assim, deletar essa transcrição. Seriam necessários estudos mais aprofundados com sítios de ligação e fatores de transcrição.

Na figura 9 temos as taxas de expressão entre os grupos genéticos.

Embora não tenha havido diferença estatísticas entre a expressão de mRNA dos grupos genéticos podemos observar que mesmo com uma expressão um pouco menor, os animais do grupo genético 130/122 tiveram maiores valores de medidas corporais como peso e comprimento (Tabela 1).

5. CONCLUSÃO

O par de iniciadores desenhado amplificou e genotipou com eficiência o locus STR nos animais estudados.

A falta de qualidade da água e o manejo inadequado dos animais podem ser os causadores das alterações histopatológicas encontradas no fígado dos animais estudados. Os peixes podem ser via de contaminação humana, devido ao seu consumo como alimento, portanto, medidas de controle devem ser iniciadas para minimizar esse processo.

A histopatologia é uma alternativa interessante para avaliar a sanidade dos peixes cultivados, porém estudos de limnologia e análise detalhada da água são necessários para auxiliarem na pesquisa dos possíveis agentes estressores, contribuindo assim, com o seu controle.

Embora não houve diferença estatística nas análises realizadas, uma associação entre o polimorfismo e as características de desempenho pode ser percebida quando menores valores de expressão por indivíduos de genótipos 122/130 apresentaram maiores comprimentos e pesos que animais 130/130, enquanto esses mesmos animais apresentaram maiores valores de expressão, sendo que se esperava o contrário.

Estudos mais aprofundados com maior controle ambiental, maior variabilidade alélica, maior número amostral e análise de outros genes de interesse associados, seriam interessantes para complementar e enriquecer o presente trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIUS, C. Phylogenetic development of melano macrophage centers in fish. **Jour. of Zool.**, v. 191, p. 11 – 31, 1980.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.
- BERNIER, N. J.; KRAAK, G. V. D.; FARREL, A. P; BRAUNER, C. J. Fish Neuroendocrinology. **Fish Physiology**, v. 28, 537p., 2009.
- BLANCK, D. V., GASPARINO, E., RIBEIRO, R. P., MARQUES, D. S., Polimorfismo no gene GH1-PstI associado a características corporais de linhagens de tilápia do Nilo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 44, p. 599-604, 2009.
- BERNARDINI, S.; ARGENTON, F.; VIANELLO, S.; COLOMBO, L.; BORTOLUSSI, M. Regulatory regions in the promoter and third intron of the growth hormone gene in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **General and Comparative Endocrinology**, v. 116, n. 2, p. 126-171, 1999.
- BUCKE, D.; WATERMANN, B.; FEIST, S. Histological variations of hepato-splenic organs from the North Sea dab, *Limanda limanda* (L.). **Jour. of Fish Dis.**, v. 7, p. 255 – 268, 1984.
- CARIAGA MARTÍNEZ, A. E.; ZAPATA, P. D. **El laboratorio de biología molecular: una guíapráctica**. 1ª ed. Argentina, Posadas, EDUNaM, 2005.
- CABALLERO, M. J.; LOPEZ-CALERO, G.; SOCORRO, J. et al. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*), **Aquaculture**, v. 179, n. 1-4, p. 277-290, 1999.
- CAMPOS, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no Rio Aquidauana, MS, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 200-205, 2008.
- CHENG, W. T. K., LEE, C. H., HUNG, C. M., CHANG, T. J., CHEN, C. M. Growth hormone gene polymorphisms and growth performance traits in Duroc, Landrace and Tao-Yuan pigs. **Theriogenology**, v. 54, p. 1225–1237, 2000.
- CURI, R. A., PALMIERI, D. A., SUGISAWA, L., FERRAZ, A. L. J., DE OLIVEIRA, H. N., FURLAN, L. R., SILVEIRA, A. C., LOPES, C. R. Effects of GHR gene polymorphisms on growth and carcass traits in Zebu and crossbred beef cattle. **Livestock Science**, v. 101, p. 94–100, 2006.

DE-SANTIS, C., JERRY, D.R. Candidate growth genes in finfish – where should we be looking?. **Aquaculture**, v. 272, p. 22-38, 2007.

DIAS, M. A. D. **Caracterização genética do gene do Hormônio do Crescimento em variedades de tilápia utilizando marcadores microssatélites**. 2015. 69 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

DUAN, C.; REN, H.; GAO, S. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-1 binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 167, p. 344-351, 2010.

EXCOFFIER, L., LAVAL, G., SCHNEIDER, S. **Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis**, v. 1, 2006.

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

FERGUSON, A.; TAGGART, J. B.; PRODHOL, A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population whit special reference to Salmo. **Journal of Fish Biology**, London, v. 47, supl. A, p. 103-126, 1995.

FERGUSON, H.W. **Sistematic Pathology of fish. A text and Atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts**. Iowa, Iowa State University Press. USA. 263 p. 1989.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética, 3 ed, **Brasília:Embrapa**, 222 p., 1998.

FLORES-LOPES F.; MALABARBA L.R. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambarí *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Teleostei, Characidae) sob influência de efluentes petroquímicos. **Biociências** 15(2):166-172. 2007.

FORBES, S. H., KNUDSEN, K. L., NORTH T. W., ALLENDORF, F. W. One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. **Proc Natl Acad Sci**, v. 91, p. 1628-1631, 1994.

FOX, B.K., RILEY, L.G., HIRANO, T., GRAU, E.G. 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.** v. 148, p. 340–347, 2006.

GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Ann. Math Stat.**, Ann Arbor, v.35, n. 2, p. 716-725, 1964.

GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence interval for multinomial proportions. **Technometrics**, Washington, D.C., v. 7, n. 2, p. 247-254, 1965.

GOUDET, J. **FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2)**. Lausanne, USA: Department of Ecology & Evolution, University of Lousanne, 2002.

GOUDING, M; CARVALHO, M., L. Life history and management of the tambaqui, (*Colossoma macropomum*, Characidae): na important Amazonian food fish, **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, p. 107-133, 1982.

GROSS, R.; SCHLEE, P.; STEIN, H.; ROTTMANN, O. Detection of allelic variation within the growth hormone gene in common bream using heteroduplex analysis. **Journal of Fish Biology**, v. 48, n. 6, p. 1283-1287, 1996.

GROSS, R.; NILSSON, J. Application of heteroduplex analysis for detecting variation within the growth hormone 2 gene in *Salmo trutta* L. (brown trout). **Heredity**, v. 74, n. 3, p. 86-295, 1995.

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 43, 47p., 2015.

INOUE, L. A .K. A.; BOIJINK, C. L. **Manaus: a capital do tambaqui**. 4p. 2011.

ISAAC, V. J.; RUFFINO, M. L. Informe estatístico do desembarque pesqueiro na cidade de Santarém, PA: 1992 – 1993. **In...**: Fischer, C. F. (Ed.). Recursos pesqueiros do Médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira. IBAMA/GTZ/GOPA, Brasília, p. 225- 280, 2000.

JANGARELLI, M., EUCLYDES, R. Endogamia e limite de seleção em populações sob seleção assistida por marcadores moleculares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1493-1501, 2008.

CHISTIAKOV, D.A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F.A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n.1, p. 1-29, 2006.

JEGÚ, M. Subfamily Serrasalminae (Pacu and Piranhas). **In..**: Reis, R. E.; Kullander, S. O, e Ferraris Jr., C.J. (Orgs.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 182-196, 2003.

KANG, J.H., LEE, S.J., PARK, S.R., RYU, H.Y. DNA polymorphism in the growth hormone gene and its association with weight in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries Sci**, v. 68, p. 494-498, 2002.

KOEPPEN, Wilhelm. **Climatologia com un estudio de los climas de la tierra**. Fondo de Cultura Economica, México, 1948.

KUBITZA, F.; KUBTZA, L. M. M. Principais Parasitoses e Doenças dos Peixes Cultivados, 4 ed., Coleção Piscicultura Avançada, **Acquaimagem Pess**, Jundiaí-SP, 2004.

KUHNLEIN, U.; NI, L.; WEIGEND, S.; GAVORA, J.S.; FAIRFULL, W.; ZADWORNÝ, D. DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: response to selection

for disease resistance and association with egg production. **Animal Genetics**, v.28, p.116-123, 1997.

LEE, W. J.; KOCHER, T. D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 49, n. 1, p. 169-171, 1996.

LIMA, R. M. G. **Polimorfismos de microssatélites em DNA de equinos e seu uso na determinação de parentesco em animais de raça mangalarga marchador**. 1998, 91 p. Tese (Doutorado em Ciência animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

MARQUES-RESENDE, K. F.; SANTOS, F. M. C.; DIAS, M. A. D.; RAMALHO, M. A. P. Implication of the changing concept of genes on plant breeder's work. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.**, vol. 11, n. 4, p. 345-35, 2011.

MELO, D. C. et al. Aplicações praticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 220-224, 2008.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciencia & Desenvolvimento**, Rio Grande do Sul, v. 1, n. 5, p. 14-17, 1998.

MOREIRA, H. L. M. **Análise da estrutura de plantéis e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) estimadas por microssatélites**. 1999. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegres, 1999.

NEBO, C., PORTELLA, M.C., CARANI, F.R., ALMEIDA, F.L.A., PADOVANI, C.R., CARVALHO, R.F., DAL PAI-SILVA, M. 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.** v. 164, p. 268-274, 2013.

NIE, Q., SUN, B., ZHANG, D., LUO, C., ISHAG, N. A., LEI, M., YANG, G., ZHANG, X. High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. **J. Hered.**, v. 96, p. 698–703, 2005.

O'CONNELL, M.; WRIGHT, J. M. Microsatellite DNA in Fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 7, n. 3, p. 331-363, 1997.

OTTO, A.; PATEL, K. Signalling and the control of skeletal muscle size. **Experimental Cell Research**, v. 316, p. 3059-3066, 2010.

PARK, L. K.; MORAN, P.; DIGHTMAN, D. A. A polymorphism in intron D of the Chinook salmon growth hormone 2 gene. **Animal Genetics**, v. 26, n. 4, p. 285, 1995.

PERAZZA, C.A.; MENEZES, J.T.B; FERRAZ, J.B.S.; PINAFFI, F.L.V., SILVA, L.A.; HILSDORF, A.W.S. Lack of intermuscular bones in specimens of *Colossomamacropomum*: An unusual phenotype to be incorporated into genetic improvement programs. **Aquaculture**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.014>, 2016

PROENÇA, C. E. M.; BITTENCOURT, P. R. L. **Manual de piscicultura tropical**. Ed. MMA/IBAMA, 195 p., Brasília, 1994.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ROMANA-EGUIA, M. R. R. et al. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated form microsatellite and mitochondrial DNA. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236 n. 1-4, p. 131-150, 2004.

SALEH, H. H. Fish liver as indicator of aquatic environmental pollution. *Bull. Inst. Oceanogr. & Fish.*, v. 8, p. 69 – 79, 1982.

SILVA, J. W. B.; GURGEL, J. J. L. Situação do cultivo de *Colossoma macropomum* no âmbito do Departamento Nacional de Obras contra secas (DNOCS). In: *Cultivo de Colossoma*. In R. Hernández. Ed. Guadalupe, Bogotá, 1999.

SILVA, M. G. S; SARAIVA, F. A. M.; ARAÚJO, M. L. P. Aspectos climáticos de Porto Velho- RO. In: XIII Congresso Brasileiro de Meteorologia, Fortaleza – CE. **Anais...** CD ROM, 2004.

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. Genes do eixo somatotrófico e características de crescimento numa população F2 de bovinos. **Pesq. agropec bras**, v. 41, p. 981-986, 2006

SILVA, N. M. V., RIBEIRO, M. N., ROCHA, L. L., GOMES FILHO, M. A., LIMA A. P. S. Polimorfismo genético da leptina e do receptor do hormônio do crescimento em caprinos. **Arch. Zootec.**, v. 61, p. 187-195, 2012.

STUART, M. T. **Caracterização molecular de bovinos da raça Simental com base em microssatélites e RFLP**. 2001. 73p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade de São Carlos, São Carlos, 2001.

TAKEI, Y.; LORETZ, C. A. Endocrinology. In: Evans, D. H.; Claiborne, J. B. *The physiology of fishes*, 3 ed, New York, p. 271-299, 2006.

TAVARES, R., NUNES, M., ALMEIDA, D., SILVA, J., VAZ, B., MOREIRA, C., DIONELLO, N., PIEDRAS, S., MOREIRA, H. Utilization of microsatellite markers to form families of “pejerrey” *Odontesthes bonariensis* in a genetic breeding program. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1269-1267, 2011.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. T009-Technical Bulletin NanoDrop 1000 & 8000: 260/280 and 260/230 Ratios. **Thermo Fisher Scientific - NanoDrop products**. Disponível em: <<http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Fishes of the amazon and their Enviroment: Physiological and Biochemical Aspects**. Springer-Verlag, p. 70-180, Berlin, 1999.

ZHOU, G.L.; JIN, H.G.; LIU, C.; GUO, S.L.; ZHU, Q.; WU, Y.H. Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. *Journal of Biosciences*, v.30, p.595-598, 2005.