

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

MÁRCIO DE AZEVEDO FIGUEIREDO

**Desenvolvimento de linhagens germinativas de peixes transgênicos para o gene do
hormônio do crescimento (GH) utilizando o paulistinha *Danio rerio*
(*Cypriniformes; Cyprinidae*) como modelo experimental**

RIO GRANDE, RS

2006

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Desenvolvimento de linhagens germinativas de peixes transgênicos para o gene do hormônio do crescimento (GH) utilizando o paulistinha *Danio rerio* (*Cypriniformes; Cyprinidae*) como modelo experimental

MÁRCIO DE AZEVEDO FIGUEIREDO

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

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marins

Rio Grande – RS

Fevereiro de 2006

Índice

Agradecimentos	v
Resumo Geral	vi
Abstract	viii
Introdução Geral	1
Referências	5
Capítulo I	8
Transferência de genes em peixes, através da técnica de microinjeção, utilizando o paulistinha (<i>Danio rerio</i>) como modelo experimental	8
Resumo	10
Abstract	11
Introdução.....	12
Material e métodos.....	13
Resultados e Discussão	14
Conclusão	16
Agradecimentos	16
Referências	16
Capítulo II	22
Produção de linhagens de peixes transgênicos: avaliação <i>in vivo</i> do mosaicismismo através da estratégia de co-injeção do transgene da proteína verde fluorescente (GFP)	22
Resumo	24
Abstract	25
Introdução.....	26
Material e métodos.....	27
Resultados.....	30
Discussão	32
Agradecimentos	35
Bibliografia.....	35
Capítulo III	41
Performance do crescimento de peixes transgênicos para o gene do hormônio do crescimento, utilizando o paulistinha (<i>Danio rerio</i>) como modelo experimental ...	41
Resumo	43
Abstract	44
Introdução.....	45
Material e métodos.....	47
Resultados.....	51
Discussão	52
Referências	54
Discussão Geral	64
Referências	67
Conclusões Gerais	69

Dedico esta dissertação aos meus filhos
Henrique e Beatriz e à minha esposa Patrícia.

Agradecimentos

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Luís André Sampaio e Prof. Dr. Heden Luiz Moreira pela atenção, contribuições e sugestões. A todos os professores e colegas do curso.

À Ana Lupe, Bruna, Liane, Jú e Nino, colegas do Laboratório de Bioquímica Marinha, que me ajudaram durante a realização dos experimentos, pelas discussões sobre minha tese e pelos os bons momentos vividos no lab. Não posso de deixar de agradecer ainda à Karina e ao Michel, que também fizeram parte desta família.

À Dani e ao Fred, que participam desde o início deste projeto, quero dizer que não conseguiria chegar aqui sem vocês, e quero agradecer por todas as opiniões e sugestões, e por toda a dedicação de vocês neste trabalho.

Ao Luf agradeço por me receber no laboratório, mesmo com um currículo “em branco”, e confiar que eu seria capaz de concluir o planejado. Serei sempre grato por isto.

Finalmente gostaria de agradecer aos meus pais, Nanci e Mario, por darem todo o suporte que necessitei, inclusive financeiro durante o período em que fiquei sem bolsa. Amo vocês.

Resumo Geral

O objetivo deste trabalho foi produzir linhagens germinativas transgênicas do paulistinha (*Danio rerio*) para o gene do hormônio do crescimento (GH) através da técnica de co-injeção utilizando o gene marcador da proteína verde fluorescente (GFP). Para atingir este objetivo, na primeira parte deste trabalho foram determinadas as condições a serem utilizadas para a produção dos peixes transgênicos. Para isto, foram microinjetadas em ovos recém fertilizados, duas concentrações diferentes da construção genética contendo o gene da GFP associado ao promotor da β -actina da carpa (*Cyprinus carpio*). Os resultados obtidos demonstraram que a concentração de 18,3 ng/ μ L foi mais eficiente na produção de indivíduos transgênicos em relação à concentração de 3,7 ng/ μ L. Na segunda parte deste estudo, foi utilizada a estratégia de co-injeção do gene do GH com o gene marcador para avaliar o grau de mosaïcismo *in vivo* e identificar paulistinhas transgênicos com potencial para gerar linhagens germinativas para o gene de interesse. As duas construções, reguladas pelo mesmo promotor, foram co-injetadas linearizadas numa proporção equimolar (1:1). O gene do GH utilizado foi o do peixe rei-marinho *Odontheistes argentinensis* (msGH). Após a eclosão, as larvas foram observadas em microscópio de epifluorescência, e as que apresentaram uma expressão forte para a GFP foram cultivadas até a maturidade sexual, quando foram reproduzidas com indivíduos não-transgênicos. Os peixes G₁ positivos para a expressão da GFP foram analisados por PCR de DNA genômico para a presença do gene do msGH. Isto permitiu identificar dois indivíduos G₀ (M0104 e F0104) que transmitiram os dois transgenes para a G₁. Os animais da G₁ que carregavam ambos transgenes foram reproduzidos com não-transgênicos. A análise da G₂ demonstrou que na linhagem M0104 os transgenes integraram-se em cromossomos diferentes, e que na linhagem F0104 os dois transgenes integraram-se no mesmo cromossomo. Na terceira parte deste trabalho, foram realizados experimentos de crescimento entre transgênicos homocigotos, hemizigotos e não-transgênicos da linhagem F0104. Os resultados destes experimentos demonstraram que os animais hemizigotos apresentaram um crescimento significativamente maior do que os demais, o que pode ser explicado pelo aumento significativo da expressão do gene do IGF-I (Fator de crescimento tipo-insulina I) observado nesta classe. Embora os transgênicos homocigotos tenham apresentado,

como esperado, uma maior expressão do gene do msGH, não foi detectada a expressão do gene do IGF-I. Este fato pode explicar os resultados dos experimentos de crescimento. A metodologia aplicada no presente estudo permitiu inferências sobre os eventos de integração dos transgenes utilizados, possibilitando a identificação de uma linhagem que estava transmitindo ambos transgenes ligados no mesmo cromossomo. No modelo experimental aqui desenvolvido, peixes transgênicos hemizigotos mostraram-se mais viáveis para o cultivo. Estes resultados podem, no futuro, ser aplicados para a produção de linhagens geneticamente modificadas de espécies de peixes comercialmente importantes com maior performance de crescimento.

Palavras-chave: paulistinha, peixe geneticamente modificado, hormônio do crescimento, proteína verde fluorescente, co-injeção.

Abstract

The objective of this work was to produce transgenic zebrafish germline (*Danio rerio*) for the growth hormone (GH) gene using the of co-injection technique with the green fluorescent protein (GFP) reporter gene. To reach this objective, in the first part of this work were determined the conditions to be used for transgenic fish production. For this, just fertilized eggs of zebrafish were microinjected with two different concentrations of the genetic construction, containing the gene of the GFP associated with the carp (*Cyprinus carpio*) β -actin promoter. The obtained results demonstrated that the concentration of 18.3 ng/ μ L was more efficient in the production of transgenic individuals in relation to the concentration of 3.7 ng/ μ L. In the second part of this study, it was used the co-injection strategy of the GH gene along with the reporter gene to evaluate the mosaicism degree *in vivo* and to identify transgenic zebrafish with potential to generate germline for gene of interest. The two constructions were regulated by the same promoter and co-injected linearized in a equimolar ratio (1:1). The GH gene used was from the marine silverside *Odonthestes argentinensis* (msGH). After the hatching, the larvae were observed in epifluorescence microscope, G₀ transgenic individuals classified as strong for GFP expression were cultivated until the sexual maturity, when were reproduced with non-transgenic individuals. The G₁ fish positive for the GFP expression were analyzed by PCR of genomic DNA for the presence of the msGH gene. This allowed identifying two G₀ individuals (M0104 and F0104) that were transmitting both transgenes for the G₁. The G₁ animals positive to both transgenes were reproduced with non-transgenic. The G₂ individuals originated from the M0104 lineage, when analyzed for both transgenes indicated that the integration occurred in different chromosomes, and in the F0104 lineage the two transgenes had integrated in the same chromosome. In the third part of this work, growth experiments were carried out comparing transgenic homozygous, hemizygous and non-transgenic produced from F0104 lineage. The results of these experiments demonstrated that the hemizygous individuals presented a significantly bigger growth than the other classes, which can be explained by the significative increased expression of the IGF-I (Insulin-like growth factor) gene in this class. Even though transgenic homozygous had presented, as expected, bigger expression of the msGH gene than hemizygous fish, no expression for

IGF-I gene was observed. This fact can explain the growth experiments results. The methodology applied in the present study allowed inferences about the integration events of transgenes used, making possible the identification of a lineage that was carrying both transgenes in the same chromosome. In the experimental model here developed, transgenic hemizygous fish showed to be more viable to culture. These results can be, in the future, applied for genetically modified lineage production of commercially important fish species with improved growth performance.

Key words: zebrafish, genetically modified fish, growth hormone, green fluorescent protein, co-injection.

Introdução Geral

A transferência de genes (transgênese) é uma área especial da biologia molecular que abriu um campo bastante promissor para o melhoramento genético de espécies utilizadas na aquicultura, envolvendo a alteração do genoma de um organismo multicelular através da inserção, modificação ou deleção de um gene com o objetivo de modificar características fenotípicas de interesse específico (Houdebine, 2002; Carter, 2004). Sendo assim, características novas, estáveis e determinadas geneticamente poderão ser incorporadas ao organismo receptor, com a possibilidade de serem transmitidas para a progênie.

Nas últimas duas décadas, um número crescente de pesquisas tem sido realizado utilizando a tecnologia de transferência de genes em peixes. Os teleósteos, além de serem vertebrados inferiores comercialmente importantes, apresentam certas características reprodutivas e biológicas (grande produção de ovos por fêmea, fertilização e embriogênese externa) que permitem uma fácil manipulação dos processos genéticos e fisiológicos nos primeiros estágios da ontogênese, para a produção de um fenótipo alterado (Zhu & Shu, 2000). Desta maneira, uma ou mais características podem ser modificadas para o aumento da produtividade e da eficiência reprodutiva para a aquicultura, mesmo em poucas gerações (Horváth & Orbán, 1995).

Devido à grande aplicabilidade desta ferramenta nas mais diversas áreas, atualmente existe uma série de técnicas disponíveis para produzir peixes transgênicos, as quais têm sido desenvolvidas com os objetivos de aumentar a eficiência de integração dos transgenes transferidos ao genoma do organismo receptor, produzir transgênicos puros na primeira geração e produzir transgênicos em grande quantidade. Para aumentar a eficiência da integração, estratégias que facilitam o transporte dos transgenes para o núcleo e a inserção no genoma receptor têm sido desenvolvidas, como, por exemplo, a utilização de pequenos peptídeos associados aos transgenes denominados de sinais de localização nuclear (Collas & Alestrom, 1997). Também têm sido usados, para esse mesmo propósito, vetores adenovirais (Chou *et al.* 2001; Hsiao *et al.*, 2001), a enzima meganuclease *I-SceI* (Thermes *et al.*, 2002), transposons (Grabher *et al.*, 2003) e a transferência nuclear (Jesuthasan & Subburaju, 2002). Com a finalidade de produzir peixes transgênicos em grande quantidade e aumentar a produção de transgênicos puros

na primeira geração, a maioria dos métodos tem se baseado, fundamentalmente, na manipulação do sêmen. Dentre essas técnicas destaca-se a eletroporação do sêmen, ou seja, a utilização de uma corrente elétrica para facilitar a entrada de DNA exógeno nas células espermáticas. Após esse processo o sêmen transformado é utilizado para fertilizar os óvulos *in vitro* (Müller *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 2002). Além da manipulação do sêmen, a manipulação genética diretamente sobre os tecidos gonadais *in vivo* também permite um aumento na produção de transgênicos como foi demonstrado por Lu *et al.* (2002), onde uma mistura de lipídios catiônicos, DNA e água foi injetada diretamente na gônada de um macho de perca marinha (*Sparus sarba*). Essa mistura, denominada lipossoma, mostrou-se eficiente, uma vez que 80% da descendência produzida foi positiva para o transgene injetado na gônada do macho.

Embora estes novos métodos de transferência de genes estejam ganhando espaço devido a resultados bastante promissores, a microinjeção em peixes é, ainda, a técnica que tem sido empregada com mais sucesso para este propósito devido a sua simplicidade e confiabilidade (Udvardia & Linney, 2003; Zbikowska, 2003). Maclean *et al.* (2002) afirmam que, na tilápia (*Oreochromis niloticus*), nenhuma técnica provou ser realmente superior à microinjeção. Entretanto, a microinjeção, quase invariavelmente, produz indivíduos mosaicos, ou seja, o transgene integra-se em apenas uma parcela de células ou tecidos no embrião, dificultando a transmissão para a descendência no caso de não haver integração nos tecidos gonadais (Maclean, 1998). Desta forma, a ocorrência deste fenômeno aumenta o esforço necessário para a identificação de transgênicos com potencial para gerar linhagens germinativas. Para atenuar o problema do mosaicismo, o uso de transgenes marcadores associados ou co-injetados com a construção genética de interesse, pode possibilitar um menor esforço e um ganho de tempo na identificação de prováveis fundadores de linhagens germinativas. Genes marcadores como a luciferase, a lacZ (β -galactosidase), a CAT (clorofenicol acetil transferase), a NEO (neomicina fosfotransferase) e a GFP (proteína verde fluorescente) podem ser utilizados para facilitar a identificação de transgênicos na primeira geração (Maclean, 1998). Dentre esses marcadores, o gene da GFP, isolado da medusa *Aequorea victoria*, é o único que não requer um substrato exógeno para analisar a sua atividade, o que permite a seleção dos indivíduos transgênicos *in vivo* sem que o animal seja sacrificado (Amsterdam *et al.*, 1995).

Uma grande variedade de genes tem sido utilizada para a produção de peixes transgênicos, com o objetivo de influenciar características importantes para o cultivo, tais como crescimento, maturação, resistência ao congelamento e resistência a doenças. Os estudos iniciais com transgenia em peixes enfocaram principalmente o impacto da transferência do gene do hormônio do crescimento (GH) na taxa de crescimento (Maclean & Talwar, 1984; Zhu *et al.*, 1985), com resultados bastante expressivos em termos de possibilidade de cultivo. Estes estudos pioneiros abriram um novo campo de pesquisa com potencial considerável no melhoramento genético para a aquicultura, e uma série de espécies de peixes tornaram-se alvo de pesquisa neste sentido incluindo truta arco-íris (Agellon & Chen, 1986; Chourrout *et al.*, 1986; Maclean *et al.*, 1987; Guyomard *et al.*, 1988), salmão do Atlântico (Fletcher *et al.*, 1988; Rokkones *et al.*, 1989), tilápia (Brem *et al.*, 1988), carpa (Zhang *et al.*, 1990; Powers *et al.*, 1992), entre outros, com resultados satisfatórios.

O GH tem sido alvo de intensas pesquisas nas últimas décadas, desde o trabalho de Palmiter *et al.* (1982) quando, pela primeira vez, foi demonstrado que a transferência do gene do GH de rato produziu um aumento significativo na taxa de crescimento em camundongos. Este experimento demonstrou a função centralizada do GH na promoção do crescimento em mamíferos e sua possível utilização para a modificação das taxas de crescimento em animais. Este hormônio, também denominado de somatotropina, é um hormônio polipeptídico, produzido e secretado na adenohipófise, o qual intensifica praticamente todos os aspectos da captação de aminoácidos e da síntese de proteínas pelas células, reduzindo ao mesmo tempo a degradação das proteínas (Guyton, 1992). Além disso, afeta o metabolismo de gorduras, proteínas e carboidratos, e exerce funções, tanto diretamente sobre os órgãos alvo, quanto pela estimulação da produção de fatores de crescimento.

Entre esses fatores, os mais importantes são os IGFs (fatores de crescimento tipo insulina) ou somatomedinas formados por pequenas cadeias polipeptídicas produzidas, principalmente no fígado, exercendo uma influência direta nos processos de crescimento e desenvolvimento animal. Dentre os fatores de crescimento, os mais estudados atualmente são IGF-I e IGF-II. A função fisiológica do IGF-II, em peixes, não está definida com clareza na literatura. Para ratos, no entanto, é considerado como um fator de crescimento fetal (Dechiara *et al.*, 1990). A função básica do IGF-I é ativar

a secreção, pelos condrócitos (células de cartilagem) de condroitina-sulfato e de colágeno, ambos necessários para o crescimento da cartilagem e ossos (Guyton, 1992). O IGF-I está presente em concentrações relativamente altas em uma grande variedade de tecidos, exibindo propriedades hipertróficas e hiperplásicas, sendo reguladores particularmente importantes da miogênese, exercendo um papel endócrino, autócrino e parácrino na integração entre a regulação tecido-específica e outros eventos biológicos (Moriyama *et al.*, 2000; Mommsen, 2001).

O objetivo deste trabalho foi produzir linhagens germinativas de paulistinhas (*Danio rerio*) transgênicos para o gene do GH do peixe-rei marinho (*Odonthestes argentinensis*) através da técnica de co-injeção com o gene marcador da GFP. Para atingir estes objetivos, no primeiro capítulo foi testada a microinjeção do gene da GFP para determinar as melhores condições para a produção dos peixes transgênicos. No segundo capítulo foi utilizada a estratégia de co-injeção do gene de interesse (GH do *Odonthestes argentinensis*) com o gene marcador (GFP) para facilitar a produção de linhagens germinativas de paulistinhas transgênicos. No terceiro capítulo foram avaliadas as taxas de crescimento entre indivíduos transgênicos (homozigotos e hemizigotos) e não-transgênicos, relacionando com a expressão do gene do IGF-I.

Referências

- Agellon, L.B., Chen, T.T., 1986. Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. DNA, 5, 463-471.
- Amsterdam, A., Lin, S., Hopkins, N., 1995. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. Dev. Biol. 171, 123-129.
- Brem, G., Brenig, B., Horstgen-Schwark, G., Winnacker, E.L., 1988. Gene transfer in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 68, 209-219.
- Carter, L., 2004. Re-interpreting some common objections to three transgenic applications: GM foods, xenotransplantation and germ line gene modification (GLGM). Transgenic Res. 13, 583-591.
- Chou, C.Y., Horng, L.-S., Tsai, H.-J., 2001. Uniform GFP-expression in transgenic medaka (*Oryzias latipes*) at the F0 generation. Transgenic Res. 10, 303-315.
- Chourrout, D., Guyomard R., Houdebine L., 1986. High efficiency gene transfer in rainbow trout (*Salmon gairdneri*) by microinjection into egg cytoplasm. Aquaculture 51, 143-150.
- Collas, P., Alestrom, P., 1997. Nuclear localization signals: a driving force for nuclear transport of plasmid DNA in zebrafish. Biochem. and Cell Biol. 75, 633-640.
- Dechiara, T.M., Efstratiadis, A., Robertson, E.J., 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. Nature 345, 78-80
- Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, K.J., Davies, P.L., Hew, C.L., 1988. Evidence for antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45, 352-357.
- Grabher, C., Henrich, T., Sasado, T., Arenz, A., Wittbrodt, J., Furutani-Seiki, M., 2003. Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. Gene 322, 57-66.
- Guyomard, R., Chourrout D., Houdebine, L., 1988. Gene transfer by microinjection into fertilized trout eggs: efficient integration and germ line transmission. Third International Symposium of Genetics in Aquaculture, Trondheim, Norway.
- Guyton, A.C., 1992, Tratado de fisiologia médica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 793-800.

- Houdebine, L.M., 2002. La transgénèse et ses applications médicales. *Pathol.-Biol.* 50, 380-387.
- Horváth, L., Orbán, L., 1995, Genome and gene manipulation in the common carp. *Aquaculture* 129, 157-181.
- Hsiao, C.D., Hsieh, F.J., Tsai, H.J., 2001. Enhanced expression and stable transmission of transgenes flanked by inverted terminal repeats from adeno-associated virus in zebrafish. *Dev. Dynamics* 220, 323-36.
- Jesuthasan, S., Subburaju, S., 2002. Gene transfer into zebrafish by sperm nuclear transplantation. *Dev. Biol.* 242, 88-95.
- Lu, J.K., Fu, B.H., Wu, J.L., Chen, T.T., 2002. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar. Biotechnol.* 4, 328-337.
- Macleán, N., Talwar, S., 1984, Injection of cloned genes into rainbow trout eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 82, suppl. 136.
- Macleán, N., Penman, D.J., Zhu Z., 1987. Introduction of novel genes into fish. *BioTechnol.* 5, 257-261.
- Macleán, N., 1998. Regulation and exploitation of transgenes in fish. *Mutation Res.* 399, 255-266.
- Macleán, N., Rahman, M.A., Sohm, F., Hwang, G., Iyengar, A., Ayad, H., Smith, A., 2002. Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene* 295, 265-277.
- Mommsen TP (2001) Paradigms of growth in fish *Comp Bioch Physiol*, Part B 129: 207-219.
- Moriyama S, Ayson FG e Kawauchi H (2000) Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1553-1562.
- Müller, F., Ivics, Z., Erdelyi, F., Papp, T., Varadi, L., Horváth, L., Macleán, N., 1992. Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. *Mol. Mar. Biol. and Biotechnol.* 1, 276-281.
- Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birberg, N.C., Evans, R.M., 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300, 611-615.

- Powers, D.A., Cole, T., Creech, K., Chen, T.T., Lin, C.M., Kight, K., Dunham, R., 1992. Electroporation: a method for transferring genes into the gametes of zebrafish (*Brachydanio rerio*), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), and common carp (*Cyprinus carpio*). *Mol. Mar. Biol. and Biotechnol.* 1, 301-308.
- Rokkones, E., Alestrom, P., Skjervold, H., Gautvik, K.M., 1989. Microinjection and expression of a mouse metallothionein human growth hormone fusion gene in fertilised salmonid eggs. *J. of Comp. Physiol.* 158 (B), 751-758.
- Thermes, V., Grabher, C., Ristoratore F., Bourrat, F., Choulika, A., Wittbrodt, J., Joly, J.S., 2002. *I-SceI* meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mechan. of Dev.* 118, 91-98.
- Udvardia, A.J., Linney, E., 2003. Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* 256, 1-17.
- Zbikowska, H.M., 2003. Fish can be first - advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Res.* 12, 379-389.
- Zhang, P., Hayat, M., Joyce, C., Gonzalez-Villasenor, L.I., Lin, C.M., Dunham, R.A., Chen, T.T., Powers, D.A., 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH-cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol. Reprod. Dev.* 25, 13-25.
- Zhu, Z., Li, G., He, L., Chen, S., 1985. Novel gene transfer into the fertilised eggs of goldfish (*Carassius auratus*). *Z. Angew. Ichthyol.* 1, 32-34.
- Zhu, Z.Y., Shu, Y.H., 2000. Embryonic and genetic manipulation in fish. *Cell Res.* 10, 17-27.

Capítulo I

Transferência de genes em peixes, através da técnica de microinjeção, utilizando o paulistinha (*Danio rerio*) como modelo experimental

Co-autores: Carlos Frederico Ceccon Lanes, Daniela Volcan Almeida e Luis Fernando Marins.

Segundo normas da revista "Ciência Rural"

Transferência de genes em peixes, através da técnica de microinjeção, utilizando o paulistinha (*Danio rerio*) como modelo experimental

Carlos Frederico Ceccon Lanes¹, Márcio de Azevedo Figueiredo¹, Daniela Volcan Almeida² e Luis Fernando Marins^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil.

³Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Autor para correspondência. E-mail: dqmluf@furg.br.

RESUMO

A tecnologia de transferência de genes (transgênese) tem um grande potencial de aplicação em peixes devido ao fato desses vertebrados inferiores apresentarem características reprodutivas e biológicas que permitem uma fácil manipulação dos processos genéticos e fisiológicos nos primeiros estágios da ontogênese. No presente estudo foi utilizada uma construção genética contendo um gene marcador (GFP, proteína verde fluorescente) sob a ação de um promotor de expressão constitutiva (β -actina), a qual foi transferida por microinjeção em embriões do paulistinha (*Danio rerio*). O objetivo foi avaliar o efeito de duas concentrações de DNA na produção de peixes geneticamente modificados com potencial para gerar linhagens germinativas estáveis. Os resultados demonstraram que a concentração de 18,3 ng/ μ L da construção genética microinjetada foi mais eficiente na produção de indivíduos transgênicos em relação à concentração de 3,7 ng/ μ L. A obtenção de um maior número de indivíduos com menor grau de mosaïcismo aumenta a probabilidade do transgene ser transmitido para a descendência, possibilitando assim, uma maior eficiência na produção de linhagens germinativas estáveis.

Palavras-chaves: peixes geneticamente modificados, microinjeção, proteína verde fluorescente, paulistinha.

ABSTRACT

The gene transfer technology (transgenesis) has a great potential of application in fish due to the fact of these inferior vertebrates present reproductive and biological characteristics that allow an easy manipulation of the genetic and physiological processes in the early ontogenesis. In the present study a genetic construct comprised of a reporter gene (GFP, green fluorescent protein) driven by a constitutive promoter (β -actin) was transferred by microinjection in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. The objective was to evaluate the effect of different DNA concentrations in the genetically modified fish production with potential to generate stable germlines. The results demonstrated that the genetic construct concentration of 18.3 ng/ μ L was more efficient in the production of transgenic individuals in relation to the concentration of 3.7 ng/ μ L. The production of a greater number of individuals with lesser mosaicism degree increases the probability of transgene to be transmitted for the descent, making possible the development of stable germlines, with better efficiency.

Key words: genetically modified fish; microinjection; green fluorescent protein; zebrafish

INTRODUÇÃO

A transferência de genes (transgênese) envolve a alteração do genoma de um organismo multicelular através da inserção, modificação ou deleção de um gene com o objetivo de modificar características fenotípicas de interesse específico (HOUDEBINE, 2002; CARTER, 2004). Sendo assim, características novas, estáveis e determinadas geneticamente poderão ser incorporadas ao organismo receptor, com a possibilidade de serem transmitidas para a progênie. Estudos envolvendo a transferência de genes estão sendo desenvolvidos numa ampla variedade de organismos. Entretanto, nas últimas duas décadas, essa tecnologia vem sendo largamente aplicada em peixes, por apresentarem características reprodutivas e biológicas (grande fecundidade, fertilização e embriogênese externa) que permitem uma fácil manipulação dos processos genéticos e fisiológicos nos primeiros estágios da ontogênese, ao contrário do que ocorre, por exemplo, em mamíferos (ZHU & SHU, 2000; ROCHA et al., 2004).

Atualmente, existe uma série de técnicas para produzir peixes transgênicos, as quais têm sido desenvolvidas com os objetivos de aumentar a eficiência de integração dos transgenes no genoma receptor, produzir transgênicos puros na primeira geração e em grande quantidade. Dentre essas técnicas destacam-se, a eletroporação do sêmen (MULLER et al., 1992; LU et al., 2002), a biobalística em ovos recém fertilizados (YAMAUCHI et al., 2000; YAZAWA et al., 2005), a transferência de lipídios catiônicos e DNA diretamente sobre os tecidos gonadais *in vivo* (LU et al., 2002) e a transferência nuclear (JESUTHASAN & SUBBURAJU, 2002). Apesar dessas novas técnicas, a microinjeção em ovos recém fertilizados é, ainda, a técnica que tem sido empregada com mais sucesso devido a sua simplicidade e confiabilidade (UDVADIA & LINNEY, 2003; ZBIKOWSKA, 2003).

De acordo com MACLEAN (2003), para produzir peixes transgênicos através da microinjeção são requeridas altas concentrações de DNA (10^5 - 10^6 cópias por célula), uma vez que os pró-núcleos masculino e feminino não podem ser observados ao microscópio e a microinjeção é realizada diretamente no citoplasma. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo utilizar diferentes concentrações de DNA para avaliar qual a melhor relação entre a concentração utilizada e a produção de peixes geneticamente modificados com potencial para gerar linhagens germinativas estáveis. Para atingir este

objetivo foi utilizada uma construção genética contendo um gene marcador sob a ação de um promotor de expressão constitutiva, a qual foi transferida por microinjeção em embriões do paulistinha (*Danio rerio*). Esta espécie foi escolhida como modelo experimental por apresentar uma série de características que a torna especialmente adequada para estudos de manipulação genética. Dentre estas, destacam-se o baixo custo de manutenção, pequeno espaço necessário para o cultivo, rápido ciclo de gerações (2 a 3 meses), grande número de descendentes produzidos por geração, estágios de desenvolvimento bem caracterizados e ovos com córion relativamente fino e translúcido adequados para os procedimentos de manipulação e microinjeção (LELE & KRONE, 1996).

MATERIAL E MÉTODOS

Peixes adultos foram adquiridos de fornecedores comerciais e mantidos em um sistema de cultivo fechado com temperatura a 28°C, oxigenação próxima da saturação, pH em torno de 7 e fotoperíodo de 14 horas claro e 10 horas escuro. Os reprodutores foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (ColorBits, Tetra) e *Artemia* sp. No dia anterior à microinjeção, machos e fêmeas foram colocados no mesmo aquário na proporção de um macho para cada duas fêmeas. Na manhã seguinte, logo após o acionamento das luzes, armadilhas foram colocadas nos aquários para coletar os ovos recém fertilizados para a realização da microinjeção. Cada desova obtida foi dividida de modo a gerar os grupos experimentais e controle.

Peixes transgênicos foram produzidos utilizando a construção genética constituída pelo promotor da β -actina da carpa (*Cyprinus carpio*) com o éxon 1 e o íntron A, associado ao cDNA da GFP da medusa *Aequorea victoria*, denominado pc β A/GFP (gentilmente cedido pela Dra. Suzanne Brooks, University of Southampton, UK). O gene da GFP foi utilizado devido a sua expressão ser facilmente observada *in vivo*, através do microscópio de epifluorescência, sem a necessidade de qualquer substrato exógeno (AMSTERDAM et al., 1995). Para facilitar a integração do transgene no genoma do organismo receptor, o mesmo foi linearizado com a endonuclease de restrição *Spe I*, que apresenta dois sítios de restrição no plasmídeo, gerando um fragmento de aproximadamente 5,6 kb, denominado c β A/GFP, contendo o promotor da

β -actina da carpa com o éxon 1 e o íntron A, o gene da GFP e a região de terminação SV40.

Para a realização da microinjeção foram utilizadas duas concentrações de DNA diferentes, uma contendo 3,7 ng/ μ L e a outra 18,3 ng/ μ L, o que corresponde a 2×10^5 e 10^6 cópias do transgene por célula, respectivamente. Para cada concentração foram realizados três experimentos de microinjeção, sendo que esses seguiram o protocolo geral recomendado por VIELKIND (1992). O volume de solução de DNA injetado no citoplasma de ovos recém fertilizados no estágio de uma célula foi de aproximadamente 300 pL, utilizando-se um picoinjetor motorizado (Modelo IM-30 – Narishige, Japão). As agulhas para a microinjeção foram produzidas a partir de capilares de vidro (Modelo GDC-1 – Narishige, Japão) num Micro-electrode Puller (Modelo PC-10 – Narishige, Japão). Os embriões microinjetados e não-microinjetados foram mantidos em estufa a 28 °C até o momento da eclosão, em recipientes com capacidade de 1 L de água.

Após a eclosão, as larvas foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Modelo EK2000, EIKONAL) e classificadas em diferentes padrões de acordo com o grau de expressão da GFP, conforme os critérios utilizados por GIBBS & SCHMALE (2000) e THERMES et al. (2002). Dessa forma, os indivíduos foram classificados em negativos (nenhuma célula expressando GFP), fracos (poucas células expressando GFP), moderados (menos de 50% do corpo expressando GFP) e fortes (mais de 50% do corpo expressando GFP).

As análises estatísticas utilizadas para testar as diferenças de sobrevivência entre os grupos controle e microinjetados, assim como, o percentual de indivíduos expressando a GFP e os diferentes padrões obtidos entre as duas concentrações microinjetadas foi ANOVA, seguida do Teste de TUKEY ($P < 0,05$), utilizando o programa Statistic versão 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o experimento com a concentração de 3,7 ng/ μ L foram microinjetados 267 ovos recém fertilizados no estágio de uma célula, sendo que a sobrevivência média observada foi de 66,3% (177/267). Já para a concentração de 18,3 ng/ μ L foram microinjetados 386 ovos e a sobrevivência média foi de 53,4% (206/386). As taxas de

sobrevivência dos animais microinjetados com as diferentes concentrações foram significativamente menores das observadas para o grupo controle (89,6%, $P < 0,05$). Entretanto, não houve diferença na sobrevivência entre as duas concentrações utilizadas ($P < 0,05$) (Figura 1). De acordo com MACLEAN (1998), a taxa de sobrevivência dos embriões microinjetados varia de 10 a 50%. Essa taxa está diretamente relacionada ao manuseio dos ovos durante a microinjeção e à quantidade de DNA utilizado, já que altas concentrações são tóxicas.

Dos indivíduos analisados no microscópio de epifluorescência para a concentração de 3,7 ng/ μ L, 66,1% (117/177) apresentaram algum tipo de expressão para a GFP, e para a concentração de 18,3 ng/ μ L o percentual de indivíduos positivos foi de 72,7% (150/206). A diferença observada entre as duas concentrações foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$). O percentual de transgênicos obtidos no presente estudo, para ambas concentrações de DNA utilizadas, foi extremamente significativo visto que, em média, para cada 100 ovos microinjetados são obtidos de 5 a 10 indivíduos transgênicos (MACLEAN, 2003). Em termos gerais, a produção de peixes geneticamente modificados utilizando a técnica da microinjeção é altamente variável de espécie para espécie, assim como de laboratório para laboratório e está diretamente relacionada com a habilidade na microinjeção e a concentração de DNA utilizada (MACLEAN, 2003). Adicionalmente, a forma da construção genética microinjetada (linear ou circular) também influencia na produção de peixes transgênicos, sendo que o transgene linear chega a ser até 15 vezes mais eficiente na integração no genoma do organismo receptor do que a construção genética circular (PENMAN et al., 1990). No presente estudo verificou-se que ambas as concentrações utilizadas produziram um número relativamente alto de indivíduos transgênicos, embora, a concentração de 18,3 ng/ μ L tenha sido mais eficiente e não tenha causado uma mortalidade significativamente mais elevada.

Os indivíduos analisados no microscópio de epifluorescência apresentaram um grau variado de expressão da GFP, provavelmente devido ao efeito do mosaïcismo. Este fenômeno é caracterizado pela integração tardia do transgene microinjetado em relação à velocidade com que a célula se divide (MACLEAN, 1998). Isto dificulta a produção de linhagens germinativas, pois é necessário que a integração do transgene ocorra nas células germinativas para que a característica seja transmitida para a geração seguinte.

Com relação aos padrões de expressão da GFP para a concentração de 18,3 ng/ μ L, foi observado um percentual significativamente maior ($P < 0,05$) de indivíduos fortes (9,9%) e moderados (27,4%) quando comparados aos percentuais observados para a concentração de 3,7 ng/ μ L (3,5% e 14%, respectivamente). Por outro lado, para os indivíduos classificados como fracos e negativos, o percentual obtido para a concentração de 18,3 ng/ μ L foi significativamente menor ($P < 0,05$) em relação aos padrões observados para a concentração 3,7 ng/ μ L (Figura 2). GIBBS & SCHMALE (2000) e THERMES et al. (2002) também utilizaram construções lineares carregando o gene da GFP direcionado por promotores de expressão ubíqua (α e β -actina). Em condições parecidas àquelas utilizadas no presente estudo, GIBBS & SCHMALE (2000) obtiveram 5,1% de paulistinhas transgênicos classificados como fortes para a expressão da GFP, enquanto que THERMES et al. (2002), trabalhando com medaka (*Oryzias latipes*), obtiveram 3% de indivíduos fortes para a GFP.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a concentração de 18,3 ng/ μ L da construção genética microinjetada foi mais eficiente na produção de indivíduos transgênicos do que a concentração de 3,7 ng/ μ L, além de não ter aumentado a mortalidade. A obtenção de um maior número de indivíduos com menor grau de mosaicismo (fortes e moderados) aumenta a probabilidade do transgene de interesse estar também integrado nas células germinativas, possibilitando a produção de linhagens germinativas estáveis.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio do CNPq-PROFIX (Proc. No. 540903/01-9) e da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

REFERÊNCIAS

- AMSTERDAM, A. et al. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Developmental Biology*, v.171, n.1, p.123-129, 1995.
- ANDERSON, D.C.; KRUMMEN, L., Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, n.2, p.117–123, 2002.
- CARTER, L. Re-interpreting some common objections to three transgenic applications: GM foods, xenotransplantation and germ line gene modification (GLGM). *Transgenic Research*, v.13, n.6, p.583-591, 2004.
- DEVLIN, R.H., et al. Extraordinary salmon growth. *Nature*, v.371, p.209-210, 1994.
- DOOLEY, K.; ZON, L.I. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, v.10, n.3, p.252-256, 2000.
- GIBBS, P.D.L.; SCHMALE, M.C. GFP as a marker scorable throughout the life cycle of transgenic zebra fish. *Marine Biotechnology*, v.2, n.2, p.107-125, 2000.
- GOLDMAN, D., et al. Transgenic zebrafish for studying nervous system development and regeneration. *Transgenic Research*, v.10, n.1, p.21-33, 2001.
- HOUDEBINE, L.M. La transgénèse et ses applications médicales. *Pathologie-Biologie*, v.50, p.380-387, 2002.
- HUANG, H.G., et al. Analysis of pancreatic development in living transgenic zebrafish embryos. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.177, n.1-2, p.117-124, 2001.
- HWANG, G. et al. Fish as bioreactors: transgene expression of human coagulation factor VII in fish embryos. *Marine Biotechnology*, v.6, n.5, p.485-492, 2004.
- JESUTHASAN, S.; SUBBURAJU, S. Gene transfer into zebrafish by sperm nuclear transplantation. *Developmental Biology*, v.242, n.2, p.88-95, 2002.
- LELE, Z.; KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances*, v.14, n.1, p.57-72, 1996.
- LEVENTHAL J.R., et al. Evidence that tilapia islets do not express alpha-(1,3)gal: implications for islet xenotransplantation. *Xenotransplantation*, v.11, n.3, p.276-283, 2004.
- LEVY, J.A. et al. Gene transfer technology in aquaculture. *Hydrobiologia*, v.420, p.91-94, 2000.

- LU, J.K., et al. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Marine Biotechnology*, v.4, n.3, p.328-337, 2002.
- MACLEAN, N. Regulation and exploitation of transgenes in fish. *Mutation Research*, v.399, n.2, p.255–266, 1998.
- MACLEAN, N. Genetically modified fish and their effects on food quality and human health and nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, v.14, n.5-8, p.242–252, 2003.
- MORITA, T., et al. Fish eggs as bioreactors: the production of bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos. *Transgenic Research*, v.13, n.6, p.551-557, 2004.
- MULLER, F., et al. Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, v.1, n.4-5, p.276-81, 1992.
- NAM, Y.K., et al. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Research*, v.10, n.4, p.353–362, 2001.
- PENMAN, D. J., et al. Factors affecting survival and integration following microinjection of novel DNA into rainbow trout eggs. *Aquaculture*, v.85, n.1-4, p.35–50, 1990.
- POHAJDAK, B., et al. Production of transgenic tilapia with Brockmann bodies secreting [desThrB30] human insulin. *Transgenic Research*, v.13, p.313–323, 2004.
- ROCHA, A., et al. Application of inducible and targeted gene strategies to produce transgenic fish: a review. *Marine Biotechnology*, v.6, n.2, p.118-127, 2004.
- TAKECHI, M., et al. Fluorescence visualization of ultraviolet-sensitive cone photoreceptor development in living zebrafish. *Febs Letters*, v.553, n.1-2, p.90-94, 2003.
- THERMES, V., et al. *I-SceI* meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mechanisms of Developmental*, v.118, n.1-2, p.91-98, 2002.
- UDVADIA, A.J.; LINNEY, E. Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Developmental Biology*, v.256, n.1, p.1-17, 2003.

- VIELKIND, J.R. Medaka and zebrafish: Ideal as transient and stable transgenic systems. In: HEW C. L.; FLETCHER G. L. Transgenic Fish. World Scientific, Singapore: 1992, p.72-91.
- WARD, A.C.; LIESCHKE, G.J. The zebrafish as a model system for human disease. *Frontiers Bioscience*, v.7, p.D827-D833, 2002.
- YAZAWA, R. et al. Gene transfer for Japanese flounder fertilized eggs by particle gun bombardment. *Fisheries Science*, v.71, p.869-874, 2005.
- YAMAUCHI, M. et al. Introduction of a foreign gene into medaka fish using the particle gun method. *Journal of Experimental Zoology*, v.287, n.4, p.285-293, 2000.
- ZBIKOWSKA, H.M. Fish can be first – advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Research*, v.12, n.4, p.379–389, 2003.
- ZHU, Z.Y.; SHU, Y.H. Embryonic and genetic manipulation in fish. *Cell Research*, v.10, n.1, p.17-27, 2000.

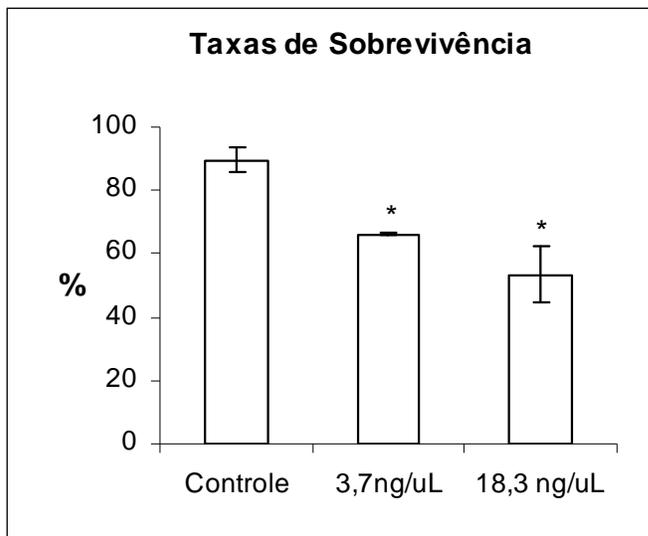


Figura 1 – Sobrevivência das larvas de paulistinha (*Danio rerio*) microinjetadas com diferentes concentrações do transgene $c\beta A/GFP$, uma semana após a fertilização. Asteriscos (*) indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre controle e microinjetados. Os valores são expressos como média \pm erro padrão.

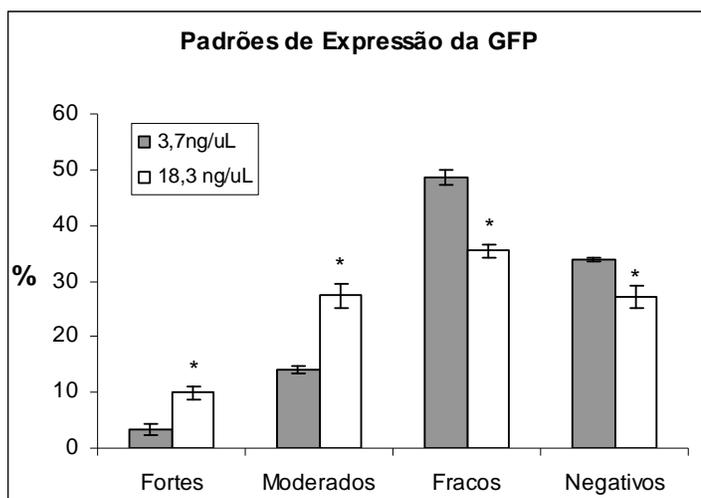


Figura 2 – Percentual de indivíduos transgênicos obtidos nos distintos padrões de expressão da proteína verde fluorescente (GFP) a partir da microinjeção do transgene $c\beta A/GFP$ em diferentes concentrações. Asteriscos (*) indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as concentrações de DNA utilizadas dentro de cada padrão de expressão. Os valores são expressos como média \pm erro padrão.

Capítulo II

Produção de linhagens de peixes transgênicos: avaliação *in vivo* do mosaicismos através da estratégia de co-injeção do transgene da proteína verde fluorescente (GFP)

Co-autores: Carlos Frederico Ceccon Lanes, Daniela Volcan Almeida e Luis Fernando Marins.

Segundo normas da revista "Genetics and Molecular Biology"

Produção de linhagens de peixes transgênicos: avaliação *in vivo* do mosaïcismo através da estratégia de co-injeção do transgene da proteína verde fluorescente (GFP)

Márcio de Azevedo Figueiredo¹, Carlos Frederico Ceccon Lanes², Daniela Volcan Almeida³ e Luis Fernando Marins^{1,2,3}

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

²Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Ciências Fisiológicas, Rio Grande, RS, Brasil.

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

Resumo

A microinjeção tem sido a técnica mais usada para a transferência de genes em peixes. Entretanto, esta técnica, quase invariavelmente, produz indivíduos mosaicos devido a integração tardia do transgene. Assim a transmissão para a descendência fica difícil, no caso de não haver integração em células germinativas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o grau de mosaicismo *in vivo* através de uma estratégia onde um transgene marcador foi co-injetado com o transgene de interesse, de forma que potenciais fundadores de linhagens germinativas possam ser facilmente identificados. Paulistinhas (*Danio rerio*) transgênicos foram produzidos usando dois transgenes sendo ambos constituídos do promotor da β -actina da carpa (*Cyprinus carpio*) direcionando a expressão do gene marcador da GFP (Proteína verde fluorescente) ou do cDNA do hormônio do crescimento do peixe-rei marinho *Odonthestes argentinensis*. A metodologia aplicada permitiu uma rápida identificação de peixes transgênicos G₀ e também definiu quais indivíduos estavam transmitindo os transgenes para a próxima geração. Além disso, esta estratégia possibilitou uma inferência sobre os eventos de integração genômica dos transgenes, permitindo identificar uma dentre seis linhagens produzidas, a qual estava transmitindo ambos transgenes ligados no mesmo cromossomo. Estes resultados representam um avanço significativo na redução do esforço investido na produção de linhagens estáveis de peixes geneticamente modificados.

Palavras-chave: peixe geneticamente modificado; co-injeção; proteína verde fluorescente; hormônio do crescimento; paulistinha.

Abstract

The microinjection has been the most used technique for gene transfer in fish. However, this technique produces almost invariably mosaic individuals due to the delayed integration of transgene, making difficult the transmission for the descent in the case not to have integration in germinative cells. The objective of the present work was to evaluate the mosaicism degree *in vivo* through a strategy where a reporter transgene was co-injected with a transgene of interest, so that potential germline founders could be easily identified. Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) were produced using two transgenes both comprised of the carp (*Cyprinus carpio*) β -actin promoter driving the expression of the GFP (green fluorescent protein) reporter gene or the growth hormone cDNA from the marine silverside fish *Odonthestes argentinensis*. The methodology applied allowed a fast G₀ transgenic fish identification and also defined which individuals were transmitting transgenes for the next generation. Furthermore, this strategy made possible an inference on genomic transgene integration events, permitting identify one out off six produced lineage which was transmitting both transgene linked in the same chromosome. These results represent a significant advance in the reduction of the effort invested for production of stable genetically modified fish lineage.

Key words: genetically modified fish; co-injection; green fluorescent protein; growth hormone; zebrafish

Introdução

A transgênese envolve a alteração do genoma de um organismo multicelular através da inserção, modificação ou deleção de um gene com o objetivo de modificar características fenotípicas de interesse específico (Houdebine, 2002; Carter, 2004). Desta forma, características novas, estáveis e determinadas geneticamente poderão ser incorporadas ao organismo receptor, com a possibilidade de serem transmitidas para a progênie. Nas últimas duas décadas, esta tecnologia tem sido aplicada com sucesso em peixes, devido ao fato destes vertebrados inferiores apresentarem características reprodutivas e biológicas que permitem uma fácil manipulação dos processos genéticos e fisiológicos nos primeiros estágios da ontogênese (Zhu e Shu, 2000). Estudos de transferência de genes têm sido conduzidos em mais de 35 espécies de teleósteos, sendo a maioria destas, importantes para a aqüicultura (Zbikowska, 2003). Entretanto, linhagens de peixes geneticamente modificados também têm sido desenvolvidas como modelos experimentais para a pesquisa biomédica, especialmente em estudos de embriogênese e organogênese (Amacher, 1999; Motoike *et al.*, 2000; Goldman *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001; Takechi *et al.*, 2003), assim como no estudo de doenças humanas (Dodd *et al.*, 2000; Dooley e Zon, 2000; Ward e Lieschke, 2002), xenotransplantes (Wright e Pohajdak, 2001; Leventhal *et al.*, 2004; Pohajdak *et al.*, 2004), e na produção de proteínas recombinantes como importantes agentes para aplicações terapêuticas (Anderson e Krummer, 2002).

Para a produção de peixes transgênicos existe, atualmente, uma série de técnicas disponíveis as quais têm sido desenvolvidas com objetivo de aumentar a eficiência de integração dos transgenes e/ou produzir grande quantidade de indivíduos transformados simultaneamente. Embora estes novos métodos de transferência de genes estejam ganhando espaço devido a resultados promissores obtidos (Tanaka e Kinoshita, 2001; Lu *et al.*, 2002; Grabher *et al.*, 2003; Hostetler *et al.*, 2003; Kinoshita *et al.*, 2003; Kurita *et al.*, 2004), em peixes a microinjeção é, ainda, a técnica que tem sido empregada com mais sucesso para este propósito devido a sua simplicidade e confiabilidade (Udvardia e Linney, 2003; Zbikowska, 2003). Maclean *et al.* (2002), afirmam que na tilápia *Oreochromis niloticus* nenhuma técnica provou ser realmente superior a microinjeção. Entretanto, quando aplicada para a produção de peixes

geneticamente modificados, a microinjeção quase invariavelmente produz indivíduos mosaicos. O mosaicismo é um fenômeno resultante da integração tardia do transgene, a qual ocorre após alguns ciclos de divisão da célula embrionária inicial. Desta forma, o indivíduo produzido pode ter o transgene integrado em apenas uma parcela de células ou tecidos, dificultando a transmissão para a descendência, no caso de não haver integração nas células germinativas (Maclean, 1998).

O uso de genes marcadores que permitam a avaliação *in vivo* do grau de mosaicismo de cada indivíduo transgênico gerado pode facilitar a identificação de prováveis fundadores de linhagens germinativas. Desta forma, a aplicação de uma metodologia que envolva a co-injeção de um transgene marcador com a construção genética de interesse pode representar uma diminuição considerável no esforço necessário para o estabelecimento de linhagens transgênicas. O gene codificante para a proteína verde fluorescente (GFP), isolado da medusa *Aequorea victoria*, tem sido amplamente utilizado como gene marcador pelo fato desta proteína não requerer um substrato exógeno para a sua atividade (Amsterdam *et al.*, 1995), assim como ser estável e não apresentar efeitos tóxicos no organismo receptor (Peters *et al.*, 1995). Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi aplicar uma metodologia que permitiu avaliar o grau de mosaicismo *in vivo* e identificar paulistinhas (*Danio rerio*) transgênicos com potencial de gerar linhagens germinativas para o gene de interesse.

Material e Métodos

Produção de peixes transgênicos

Paulistinhas adultos tipo selvagens foram mantidos em um sistema de cultivo fechado a 28 °C num fotoperíodo 14h claro / 10h escuro. Ovos recém-fertilizados foram coletados para os procedimentos de microinjeção. Paulistinhas transgênicos foram produzidos utilizando dois transgenes construídos a partir do promotor da β -actina da carpa (*Cyprinus carpio*) direcionando a expressão do gene GFP ou do cDNA do hormônio do crescimento (GH) do peixe-rei marinho *Odontheistes argentinensis* (msGH), denominados pc β A/GFP e pc β A/msGH, respectivamente. O plasmídeo pc β A/GFP foi gentilmente cedido pela Dra. Suzanne Brooks (University of Southampton, UK) e foi usado para produzir o transgene pc β A/msGH pela substituição

do gene da GFP pelo cDNA do msGH (Marins *et al.*, 2002). Ambos transgenes foram linearizados com a enzima *Spe I* (apresenta dois sítios de restrição nos plasmídeos) e co-injetados na proporção molar de 1:1 no citoplasma de ovos recém-fertilizados no estágio de uma célula, numa concentração total de DNA de 35 ng/μL. As construções genéticas linearizadas (chamadas cβA/GFP e cβA/msGH) foram transferidas numa razão equimolar para que tivessem a mesma chance de integração e expressão, uma vez que possuem aproximadamente o mesmo tamanho e estão sob a ação do mesmo promotor.

O processo de microinjeção seguiu o protocolo geral recomendado por Vielkind (1992). O volume de solução de DNA injetado foi de aproximadamente 300 pL, utilizando-se um picoinjetor motorizado (Modelo IM-30 – Narishige, Japão), o que representa um número final de 10⁶ cópias de cada transgene por embrião injetado. As agulhas necessárias para a microinjeção foram produzidas a partir de capilares de vidro (Modelo GDC-1 – Narishige, Japão) num Micro-electrode Puller (Modelo PC-10 – Narishige, Japão). Os embriões microinjetados e controles (não-microinjetados) foram mantidos em estufa a 28 °C até o momento da eclosão.

Determinação do grau de mosaicismo da G₀

Após a eclosão, as larvas foram analisadas em microscópio de epifluorescência e classificadas em diferentes padrões de acordo com o grau de expressão da GFP, conforme os critérios utilizados por Gibbs e Schmale (2000) e Thermes *et al.* (2002). Dessa forma, os indivíduos foram classificados em fracos (poucas células expressando a GFP), moderados (menos de 50% do corpo expressando a GFP) e fortes (mais de 50% do corpo expressando a GFP).

Avaliação da expressão do GH exógeno por RT-PCR

Para confirmar a expressão do gene do GH exógeno na G₀, alevinos com quatro semanas de idade expressando a GFP foram analisados através do método da RT-PCR (reação em cadeia da polimerase, utilizando a transcriptase reversa). Para a extração do RNA total, indivíduos inteiros foram homogeneizados utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Brasil), segundo protocolo sugerido pelo fabricante. Aproximadamente 3 μg de RNA total de cada indivíduo foi utilizado como molde para a RT-PCR com o *primer* AP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)17-3', Invitrogen, Brasil). A síntese

do DNA complementar (cDNA) foi realizada usando a enzima RT SuperScript III (Invitrogen, Brasil), segundo protocolo sugerido pelo fabricante.

O cDNA foi utilizado como molde para a amplificação do gene do GH exógeno, utilizando *primers* específicos para o gene do GH do peixe-rei marinho, denominados EXO 293 (5'-GAAAGCTCTCTGCAGACGGAG-3') e GHEX6-RIG (5'-AGAGTGCAGTTTGCCTCTGG-3'), os quais produzem um fragmento do msGH de 467 bp e não amplificam para o gene do GH endógeno do paulistinha. A PCR foi feita com um volume de reação de 12,5 µL contendo 1,25 µL de tampão PCR 10X (Invitrogen, Brasil), 0,2 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 0,75 mM de MgCl₂, 0,5 unidades de *Platinum Taq polimerase* (Invitrogen, Brasil) e 1,0 µL da solução de cDNA. A reação foi incubada a 94 °C por 2 min seguida de 30 ciclos de 94 °C por 15 s, 65 °C por 30 s e 72 °C por 30 s. Foi realizado um passo final 5 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), sendo as bandas amplificadas visualizadas em transluminador de luz ultravioleta.

Efeito biológico do GH exógeno na G₀

Grupos de indivíduos não-transgênicos e transgênicos G₀ classificados como fortes para a expressão da GFP foram cultivados até os 12 meses de idade para a comparação do peso médio final. Os peixes foram alimentados *ad libitum* duas vezes ao dia com ração comercial (Tetra Color Bits). O objetivo deste experimento foi verificar se o GH exógeno produz efeitos biológicos significativos sobre o crescimento nos indivíduos transgênicos. Os dados de média de peso foram analisados estatisticamente através do teste t para variâncias heterogêneas com auxílio do programa Statistica versão 6.0.

Transmissão dos transgenes para a G₁

As larvas que apresentaram um padrão de expressão forte para a GFP foram selecionadas e cultivadas até a maturidade sexual como sendo prováveis fundadoras de linhagens germinativas. Ao atingirem essa fase, os indivíduos transgênicos foram reproduzidos com peixes selvagens para a produção da G₁. Os indivíduos G₁ foram analisados em microscópio de epifluorescência para verificar se apresentavam a

expressão uniforme da GFP, como esperado no caso de integração genômica. Para confirmar a presença do transgene msGH no genoma dos peixes G₁, somente as larvas GFP positivas foram cultivadas até atingirem a fase adulta, e um pequeno pedaço da nadadeira caudal de cada indivíduo foi utilizado para a extração do DNA genômico, seguindo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). O gene do msGH foi amplificado com o uso de *primers* específicos para o GH do peixe-rei marinho (EXO 293 e GHEX6-RIG), através de uma PCR com as mesmas condições descritas anteriormente. Somente indivíduos G₁ GFP positivos foram testados para a presença do msGH, pois o objetivo era identificar os peixes G₀ que transmitissem ambos os transgenes para os seus descendentes.

Transmissão dos transgenes para a G₂

Os indivíduos G₁, que apresentavam ambos os transgenes, foram cruzados com peixes não-transgênicos para a produção da G₂. Para verificar se houve a integração dos transgenes no mesmo cromossomo, o DNA genômico das larvas G₂ positivas e negativas para a expressão da GFP foi utilizado para a amplificação por PCR do transgene msGH, como descrito anteriormente.

Resultados

Paulistinhas transgênicos foram produzidos através da co-injeção de 1872 ovos recém fertilizados, no estágio de uma célula, com os transgenes cβA/GFP e cβA/msGH numa razão equimolar (1:1). A sobrevivência dos embriões microinjetados, no momento da análise no microscópio de epifluorescência (uma semana após a fertilização), foi de 46,8% (877/1872), enquanto para os peixes não-microinjetados a sobrevivência foi de 75,5% (1414/1872). Dos 877 indivíduos analisados no microscópio de epifluorescência, 602 (68,6%) apresentaram algum tipo de expressão para a GFP. Os percentuais dos padrões de expressão da GFP foram: 31,4% (275/877) negativos (sem expressão da GFP), 35,9% (315/877) fracos, 22,6% (198/877) moderados e 10,1% (89/877) indivíduos fortes.

Com um mês de idade, 12 indivíduos que estavam expressando a GFP foram analisados para a expressão do gene do msGH por RT-PCR. A expressão do transgene

msGH foi detectada em 100% dos indivíduos testados. A análise do peso médio após 12 meses de cultivo demonstrou um aumento significativo ($P < 0,01$) no grupo de transgênicos ($1,79 \text{ g} \pm 0,37$) em relação aos não-transgênicos com a mesma idade ($0,68 \text{ g} \pm 0,13$), o que representa um desempenho de crescimento 2,6 vezes maior do grupo transgênico em relação ao não-transgênico, comprovando o efeito biológico do transgene c β A/msGH no paulistinha (Figura 1).

Para o estudo da transmissão dos transgenes, oito indivíduos mosaicos, classificados como fortes para a expressão da GFP, foram separados em aquários individuais e cruzados com peixes não-transgênicos. Dois destes peixes transgênicos não desenvolveram comportamento reprodutivo. Os outros seis indivíduos, sendo dois machos (M0104 e M0204) e quatro fêmeas (F0104, F0204, F0304 e F0404), reproduziram e suas descendências foram analisadas em microscópio de epifluorescência. Foi verificado que quatro indivíduos (M0104, F0104, F0204 e F0304) estavam transmitindo o gene da GFP para a G₁ em percentuais que variaram de 2,2% até 42% (Tabela 1). O padrão da expressão da GFP observado nos indivíduos da G₁ indicou que eles expressavam o transgene em todas as células do corpo. O gene do msGH foi detectado somente nas descendências dos indivíduos M0104 e F0104. Na descendência do indivíduo M0104 apenas a metade dos indivíduos GFP positivos estavam carregando o gene do GH exógeno. Por outro lado, na descendência da F0104 todos os indivíduos GFP positivos estavam carregando o gene do GH exógeno (Tabela 1). Na descendência obtida dos indivíduos M0204 e F0404 não foi detectada a expressão do gene da GFP.

Indivíduos G₁ originários dos G₀ mosaicos M0104 e F0104, que foram positivos para ambos os transgenes, foram cultivados até a maturação sexual. Destes, seis indivíduos de cada ancestral foram reproduzidos com peixes não-transgênicos para a produção da G₂. Um total de 466 indivíduos G₂ foram produzidos da linhagem M0104, enquanto 588 indivíduos foram obtidos da linhagem F0104. Todos eles foram analisados em microscópio de epifluorescência, e sub amostras de peixes GFP positivos (N=10) foram utilizadas em cada linhagem para a inferência da presença do msGH por PCR. Os resultados obtidos foram resumidos na Tabela 1 e indicam dois diferentes padrões de transmissão em cada linhagem analisada. Os indivíduos G₂ originados da linhagem M0104, quando analisados para ambos transgenes, mostraram que 25% foram

negativos para ambos transgenes, 25% foram positivos somente para a GFP, 25% positivos somente para o msGH e 25% foram positivos para os dois transgenes. O tipo de transmissão dos transgenes na G₂ originada da linhagem F0104 foi diferente, onde 50% dos indivíduos analisados não carregavam nenhum dos dois transgenes e 50% foram positivos para ambos.

Discussão

Embora algumas metodologias tenham apresentado resultados promissores para aumentar a produção de peixes transgênicos na primeira geração, a necessidade do cultivo de um número significativo de indivíduos G₀ para posterior identificação daqueles com potencial para gerar linhagens germinativas estáveis carregando o transgene de interesse, ainda permanece. Este esforço é ainda maior quando a espécie alvo tem um grande tamanho e necessita de instalações de cultivo complexas, tais como salmões, carpas, trutas ou tilápias. Dessa forma, a metodologia aplicada neste estudo permitiu a produção de peixes transgênicos carregando, além do transgene de interesse (cβA/msGH), um transgene marcador (cβA/GFP), que possibilitou a avaliação do mosaicismos de cada indivíduo transgênico G₀. A análise dos padrões de expressão da GFP permitiu a seleção de possíveis fundadores de linhagens germinativas, além da redução do número de organismos transgênicos cultivados na primeira geração.

Foram observados 68,6% de indivíduos expressando o transgene da GFP, uma semana após a microinjeção, o que representa uma alta eficiência na produção de transgênicos. No entanto, parte da expressão observada pode ser atribuída a uma expressão transitória, a qual é um resultado da transcrição de transgenes não integrados (Chong e Vielkind, 1989). Estes resultados são significativos quando comparados aos obtidos por Rahman *et al.* (1997) e Morales *et al.* (2001), os quais utilizaram a mesma estratégia de co-injeção com um transgene marcador e obtiveram apenas 10% e 1,95% de indivíduos positivos para o gene marcador, respectivamente. A maior expressão do transgene obtida neste estudo, está relacionada com o manejo de coleta dos ovos (armadilhas colocadas nos aquários logo após o acionamento das luzes da sala), com a maior concentração de DNA utilizada e com a forma das construções microinjetadas (lineares). Adicionalmente, com relação aos padrões de expressão da GFP observados,

10,1% dos indivíduos analisados apresentaram um padrão de expressão forte para o gene marcador. Este resultado foi significativamente superior aos encontrados por Gibbs e Schmale (2000) e Thermes *et al.* (2002), os quais também utilizaram construções lineares carregando o gene da GFP direcionado por promotores de expressão ubíqua (α e β -actina). Em condições similares àsquelas utilizadas no presente estudo, Gibbs e Schmale (2000) obtiveram um máximo de 5,1% de paulistinhas transgênicos fortes para a expressão da GFP na G_0 , enquanto que Thermes *et al.* (2002), trabalhando com medaka, encontraram um máximo de 3%.

As análises de RT-PCR mostraram que 100% dos indivíduos positivos para a GFP estavam expressando o gene msGH. Entretanto, isso não significa que todos os indivíduos estejam expressando o GH nas células germinativas e que devem transmitir esta característica para a próxima geração, o que ficou evidenciado no cruzamento dos indivíduos G_0 com peixes não-transgênicos. Corroborando os resultados da RT-PCR, os dados da análise de crescimento indicaram que o grupo dos transgênicos cresceu 2,6 vezes mais do que o grupo dos não-transgênicos. Estes resultados demonstram que o transgene $c\beta A/msGH$, além de estar sendo transcrito, está sendo traduzido no hormônio ativo. O maior crescimento dos organismos transgênicos provavelmente está relacionado ao aumento do nível de msGH circulante na corrente sangüínea, devido ao fato do organismo não conseguir controlar a produção desse hormônio pelo mecanismo de retroalimentação negativa, como ocorre na regulação do gene do GH endógeno (Peter e Marchant, 1995).

A principal conseqüência negativa do mosaicismo na produção de linhagens germinativas de peixes transgênicos é o fato de que as células germinativas dos indivíduos G_0 podem carregar poucas ou nenhuma cópia dos transgenes microinjetados, dificultando a transmissão da característica para a descendência (Macleán, 1998). Entretanto, usando a estratégia de avaliação do mosaicismo pela co-injeção do gene marcador, este problema pode ser minimizado. Isso ficou evidenciado neste estudo, uma vez que 33,3% (2/6) dos peixes GFP positivos fortes transmitiram ambos transgenes para a G_1 , indicando uma elevação considerável na possibilidade de identificação de peixes fundadores de linhagens germinativas. De acordo com Macleán (1998), as taxas de transmissão de transgenes para a progênie são baixas, onde apenas 5% de transgênicos G_0 têm a capacidade de transmitir os transgenes para a geração seguinte.

As G₁ dos indivíduos selecionados foram avaliadas em termos de percentual de GFP positivos produzidos, o que indicou o grau de mosaicismo nas células germinativas dos peixes G₀. Dois indivíduos não transmitiram nenhum dos transgenes para a descendência, indicando ausência de integração nas células germinativas. Quatro transmitiram o transgene cβA/GFP em níveis variados, desde 2,2% até 42% de descendentes GFP positivos. Teoricamente, era esperado que a ausência completa de mosaicismo nas células gonadais produzisse 50% da descendência carregando a característica de interesse, no caso do cruzamento com um não-transgênico. Desta forma, os resultados observados indicaram que, apesar dos indivíduos terem sido classificados como fortes para a expressão da GFP, a integração do transgene nas células germinativas foi variável. Em termos gerais, os percentuais de produção de transgênicos na G₁ a partir de mosaicos é baixo (Maclean, 1998), fato que dificulta a identificação, no caso da ausência de uma marca de fácil reconhecimento. No presente estudo, a identificação dos transgênicos G₁ foi extremamente facilitada pela presença do gene marcador da GFP. Uma simples avaliação em microscópio de epifluorescência permitiu uma rápida identificação dos indivíduos transgênicos de interesse. Adicionalmente, os indivíduos G₁ originários da fêmea F0104 e do macho M0104 que estavam carregando ambos os transgenes foram cruzados com não-transgênicos para verificar de que forma os transgenes haviam se integrado no genoma dos peixes da G₂. Na G₂ proveniente da linhagem do macho M0104 constatou-se que havia indivíduos GFP positivos que não estavam carregando o transgene msGH, enquanto que indivíduos GFP negativos o estavam carregando. Isso indica que houve a segregação dos transgenes cβA/GFP e cβA/msGH na G₂ de acordo com as proporções genotípicas observadas (Tabela 1), as quais são típicas para genes situados em cromossomos diferentes. Diferentemente, na descendência da linhagem da fêmea F0104 todos os indivíduos GFP positivos estavam carregando o transgene do cβA/msGH, indicando que os transgenes integraram-se no mesmo cromossomo e, provavelmente, ligados um ao outro na forma de concatêmeros, o que foi observado por Rahman *et al* 1997, trabalhando com a tilápia *Oreochromis niloticus*.

A metodologia aplicada no presente estudo permitiu uma rápida identificação dos peixes transgênicos G₀ e também definiu quais indivíduos estavam transmitindo os transgenes para a próxima geração. Além disso, esta estratégia possibilitou uma

inferência sobre os eventos de integração genômica dos transgenes utilizados, permitindo identificar uma dentre seis linhagens produzidas, que estava transmitindo ambos transgenes ligados no mesmo cromossomo. Este resultado representa um avanço significativo na diminuição do esforço empregado para a produção de linhagens germinativas estáveis de peixes geneticamente modificados.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio do CNPq-PROFIX e da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Bibliografia

- Amacher, SL (1999) Transcriptional regulation during zebrafish embryogenesis. *Curr Opin Gen Dev* 9:548-552.
- Amsterdam, A, Lin, S e Hopkins, N (1995) The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev Biol* 171:123-129.
- Anderson, DC e Krummen, L (2002) Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol* 13:117–123.
- Carter, L (2004) Re-interpreting some common objections to three transgenic applications: GM foods, xenotransplantation and germ line gene modification (GLGM). *Transgenic Res* 13:583-591.
- Chong, SSC e Vielkind, JR (1989) Expression and fate CAT reporter gene microinjected into fertilized medaka (*Oryzias latipes*) eggs in the form of plasmid DNA, recombinant phage particles in its DNA. *Theor Appl Genet* 78: 369-380.
- Dodd, A, Curtis, PM, Williams, LC e Love, DA (2000) Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Hum Mol Genet* 9:2443-2449.
- Dooley, K e Zon, LI (2000) Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev* 10:252-256.

- Gibbs, PDL e Schmale, MC (2000) GFP as a marker scorable throughout the life cycle of transgenic zebra fish. *Mar Biotechnol* 2:107-125.
- Goldman, D, Hankin, M, Li, Z, Dai, X e Ding, J (2001) Transgenic zebrafish for studying nervous system development and regeneration. *Transgenic Res* 10:21-33.
- Grabher, C, Henrich, T, Sasado, T, Arenz, A, Wittbrodt, J e Furutani-Seiki, M (2003) Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. *Gene* 322:57-66.
- Hostetler, HA, Peck, SL e Muir, WA (2003) High efficiency production of germ-line transgenic Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by electroporation with direct current-shifted radio frequency pulses. *Transgenic Res* 12:413-424.
- Houdebine, LM (2002) La transgénèse et ses applications médicales. *Pathol Biol* 50:380-387.
- Huang, HG, Vogel, SS, Liu, NG, Melton, DA e Lin, S (2001) Analysis of pancreatic development in living transgenic zebrafish embryos. *Mol Cell Endocrinol* 177:117-124.
- Kinoshita, M, Yamauchi, M, Sasanuma, M, Ishikawa, Y, Osada, T, Inoue, K, Wakamatsu, Y e Ozato, K (2003) A transgene and its expression profile are stably transmitted to offspring in transgenic medaka generated by the particle gun method. *Zoolog Sci* 20:869-875.
- Kurita, K, Burgess, SM e Sakai, N (2004) Transgenic zebrafish produced by retroviral infection of in vitro-cultured sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1263-1267.
- Leventhal, JR, Sun, J, Zhang, J, Galili, U, Chong, A, Baker, M, Kaufman, DB e Wright Jr, JR (2004) Evidence that tilapia islets do not express alpha-(1,3)gal: implications for islet xenotransplantation. *Xenotransplantation* 11:276-283.
- Lu, JK, Fu, BH, Wu, JL e Chen, TT (2002) Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar Biotechnol* 4:328-337.
- Macleán, N (1998) Regulation and exploitation of transgenes in fish. *Mutat Res* 399:255-266.
- Macleán, N, Rahman, MA, Sohm, F, Hwang, G, Iyengar, A, Ayad, H e Smith, A (2002) Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene* 295:265-277.
- Marins, LF, Iyengar, A, Macleán, N, Levy, JA e Sohm, F (2002) Simultaneous overexpression of GH and STAT5b genes inhibits the STAT5 signalling

- pathway in tilapia (*Oreochromis niloticus*) embryos. *Genet Mol Biol* 23:293-298.
- Morales, R, Herrera, MT, Arenal, A, Cruz, A, Hernández, O, Pimentel, R, Guillén, I, Martínez, R e Estrada, MP (2001) Tilapia chromosomal growth hormone gene expression accelerates growth in transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Electron J Biotechnol* 14:1-7.
- Motoike, T, Loughna, S, Perens, E, Roman, BL, Liao, W, Chau, TC, Richardson, CD, Kawate, T, Kuno, J, Weinstein, BM, Stainier, DYR e Sato, TN (2000) Universal GFP reporter for the study of vascular development. *Genesis* 28:75-81.
- Peter, RE e Marchant, TA (1995) The endocrinology of growth in carp and related species. *Aquaculture* 129:299-321.
- Peters, KG, Rao, PS, Bell, BS e Kindman LA (1995) Green fluorescent fusion proteins: powerful tools for monitoring protein expression in live zebrafish embryos. *Dev Biol* 171:252-257.
- Pohajdak, B, Mansour, M, Hrytsenko, O, Conlon, JM, Dymond, LC e Wright Jr, JR (2004) Production of transgenic Tilapia with Brockmann bodies secreting [desThrB30] human insulin. *Transgenic Res* 13:313–323.
- Rahman, MA, Iyengar, A e Maclean, N (1997) Co-injection strategy improves integration efficiency of a growth hormone gene construct, resulting in lines of transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) expressing an exogenous growth hormone gene. *Transgenic Res* 6:369-378.
- Sambrook, J, Fritsch, EF e Maniatis, T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Takechi, M, Hamaoka, T e Kawamura, S (2003) Fluorescence visualization of ultraviolet-sensitive cone photoreceptor development in living zebrafish. *Febs Letters* 553:90-94.
- Tanaka, M e Kinoshita, M (2001). Recent progress in the generation of transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Zoolog Sci* 18:615-622.
- Thermes, V, Grabher, C, Ristoratore F, Bourrat, F, Choulika, A, Wittbrodt, J e Joly, JS (2002) *I-SceI* meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech Dev* 118:91-98.

- Udvardia, AJ e Linney, E (2003) Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Dev Biol* 256:1-17.
- Vielkind, JR (1992) Medaka and zebrafish: Ideal as transient and stable transgenic systems. In: Hew CL and Fletcher GL (eds.), *Transgenic Fish*. World Scientific, Singapore, pp. 72-91.
- Ward, AC e Lieschke, GJ (2002) The zebrafish as a model system for human disease. *Front Biosci* 7:D827-D833.
- Wright, JR e Pohajdak, B (2001) Cell therapy for diabetes using piscine islet tissue. *Cell Transplant* 10:125-143.
- Zbikowska, HM (2003) Fish can be first - advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Res* 12:379-389.
- Zhu, ZY e Shu, YH (2000) Embryonic and genetic manipulation in fish. *Cell Res* 10:17-27.

Tabela 1 – Transmissão para a descendência e expressão do transgene marcador (c β A/GFP) e do transgene do GH (c β A/msGH) no paulistinha transgênico (*Danio rerio*).

Linhasgens transgênicas (G ₀)	N° de embriões G ₁ expressando GFP e percentual de transmissão da G ₀ para a G ₁	Percentagem de embriões G ₁ GFP positivos carregando o gene msGH	Percentagem de segregação de c β A/GFP e c β A/msGH em embriões G ₂			
			GFP+	GH+	GFP+/GH+	GFP-/GH-
M0104	50/757 (6,6%)	3,3%	25%	25%	25%	25%
F0104	18/812 (2,2%)	2,2%	0%	0%	50%	50%
F0204	119/283 (42%)	0%	-	-	-	-
F0304	51/167 (30,5%)	0%	-	-	-	-
M0204	0/115 (0%)	-	-	-	-	-
F0404	0/107 (0%)	-	-	-	-	-

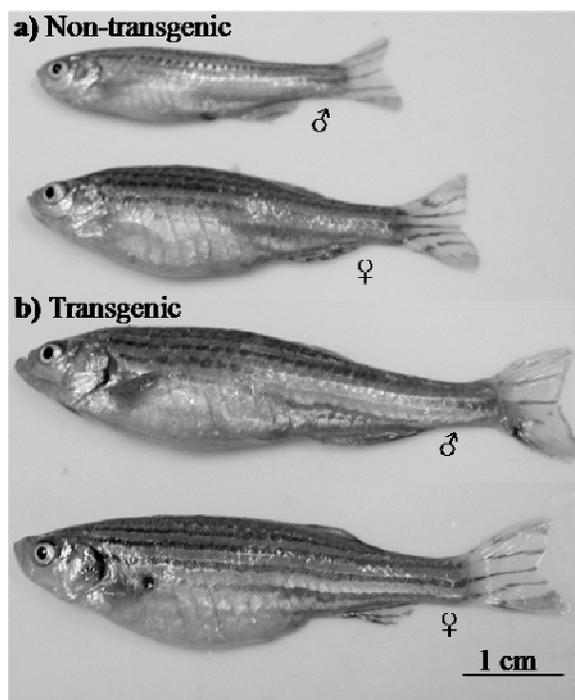


Figura 1 – Paulistinhas (*Danio rerio*) não-transgênicos (a) e transgênicos (b) com 12 meses de idade. O peso médio \pm erro padrão destes grupos de peixes foi $0,68 \text{ g} \pm 0,13$ e $1,79 \text{ g} \pm 0,37$, respectivamente.

Capítulo III

Performance do crescimento de peixes transgênicos para o gene do hormônio do crescimento, utilizando o paulistinha (*Danio rerio*) como modelo experimental

**Co-autores: Carlos Frederico Ceccon Lanes, Daniela Volcan Almeida e Luis
Fernando Marins**

Segundo normas da revista “Transgenic Research”

Performance do crescimento de peixes transgênicos para o gene do hormônio do crescimento, utilizando o paulistinha (*Danio rerio*) como modelo experimental

Márcio de Azevedo Figueiredo¹, Carlos Frederico Ceccon Lanes¹, Daniela Volcan Almeida², Luis Fernando Marins^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil.

³Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), CP 474, 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Autor para correspondência. E-mail: dqmluf@furg.br.

Resumo

Existem inúmeros estudos sobre a performance do crescimento de várias espécies de peixes transgênicos para o hormônio do crescimento (GH), entretanto os trabalhos têm comparado apenas o desempenho de crescimento entre indivíduos transgênicos hemizigotos em relação aos não-transgênicos. O presente estudo teve como objetivo comparar o crescimento entre peixes homozigotos e hemizigotos transgênicos para o GH e não-transgênicos, a fim de verificar qual a melhor classe a ser utilizada para o cultivo. Para isso os indivíduos de cada classe foram cultivados separadamente por um período de 75 dias, sendo realizadas biometrias a cada 15 dias. No final desse experimento foi realizada a análise de expressão dos genes do GH exógeno e do IGF-I (fator de crescimento tipo insulina), através de RT-PCR semi-quantitativa. Nos experimentos de crescimento os indivíduos hemizigotos atingiram um peso médio final significativamente maior do que os homozigotos ($P < 0,01$) e não-transgênicos ($P < 0,05$). Com relação às medidas de comprimento padrão não foi observada nenhuma diferença entre as classes ($P < 0,05$). Entretanto, para as medidas de altura foi encontrada uma correlação com as medidas de peso, sendo que os hemizigotos apresentaram uma altura média final significativamente maior do que os homozigotos ($P < 0,01$) e que os não-transgênicos ($P < 0,01$). Nas análises genéticas verificou-se que os homozigotos apresentaram uma expressão cerca de 1,5 vezes maior que os hemizigotos para o gene do GH exógeno ($P < 0,01$). Para o gene do IGF-I não foi detectada nenhuma expressão nos homozigotos, e os hemizigotos apresentaram uma expressão 1,75 vezes maior que os indivíduos não-transgênicos ($P < 0,01$). Estes resultados indicam que o excesso de GH pode ser prejudicial ao organismo, não produzindo os efeitos metabólicos esperados para o crescimento, demonstrando que os hemizigotos são os mais indicados para o cultivo.

Palavras-chave: peixe geneticamente modificado, hormônio do crescimento, fator de crescimento tipo insulina I, homozigoto, paulistinha.

Abstract

There are innumerable studies on growth hormone (GH) transgenic fish comparing the growth performance between hemizygous transgenic individuals in relation to the non-transgenic. Thus, this study had as objective to compare growth between homozygous and hemizygous GH transgenic fish and non-transgenic, in order to verify which the best class to be used for the culture. For this the individuals of each class were cultivated for a period of 75 days, being carried out biometry each 15 days. In the end of this experiment gene expression analysis was performed for the exogenous GH and the IGF-I (insulin-like growth factor-I) genes through RT-PCR. In the growth experiments the hemizygous individuals reached a final medium weight significantly bigger than the homozygous ($P < 0.01$) and non-transgenic ($P < 0.05$). With relation to the measures of standard length was not observed any difference between the classes ($P < 0.05$). However, for the measures of height were found a correlation with measures of weight, being that the hemizygous presented a final average height significantly bigger than the homozygous ($P < 0.01$) and non-transgenic ($P < 0.01$). The genetic analysis showed that homozygous transgenic fish presented an expression about 1.5 fold the hemizygous for the exogenous GH gene ($P < 0.01$). For the IGF-I gene no expression was detected in homozygous, and the hemizygous presented an expression 1.75 fold the non-transgenic individuals ($P < 0.01$). These results indicate that the GH excess can be harmful to the organism, not producing the waited metabolic effect for the growth and indicating hemizygous individuals as the best for culture.

Key words: genetically modified fish, growth hormone, insulin-like growth factor I, homozygous, zebrafish.

Introdução

O hormônio do crescimento (GH), também denominado de somatotropina, é um hormônio polipeptídico produzido e secretado na adeno-hipófise, o qual intensifica praticamente todos os aspectos da captação de aminoácidos e da síntese de proteínas pelas células, reduzindo ao mesmo tempo a degradação das proteínas (Guyton, 1992). A via pela qual o processo do crescimento se desenvolve começa pela síntese do GH na hipófise, o qual é liberado na corrente sanguínea de onde vai atuar em determinados órgãos através da sua associação com receptores específicos (GHR) presentes na superfície das células alvo. A ativação da sinalização começa com a dimerização do receptor, visto que o GH possui dois sítios de ligação com afinidades diferentes permitindo com que uma molécula de GH interaja seqüencialmente com duas moléculas de GHR.

A ligação do GH com o GHR induz a fosforilação e conseqüente ativação de membros de uma família de enzimas conhecidas como Janus Kinases (JAKs) comumente associadas à parte intracelular do receptor (Argetsinger *et al.*, 1993; VanderKuur *et al.*, 1994; 1995). Uma vez ativada, as JAKs fosforilam regiões específicas do receptor, ricas em tirosinas, as quais irão servir de sítios de ancoragem para as moléculas conhecidas como sinais de tradução e ativadores da transcrição (STATs). Estas são fosforiladas pelas JAKs, formando dímeros e translocando-se para o núcleo para ativar genes específicos, envolvidos no desenvolvimento das respostas biológicas ao GH, como o fator de crescimento tipo insulina - IGF (Schindler & Darnel Jr., 1995; Ihle, 1996).

Os IGFs ou somatomedinas são pequenas cadeias polipeptídicas produzidas no fígado, que exercem uma influência direta nos processos de crescimento e desenvolvimento animal. Em peixes, os IGFs estão presentes em concentrações relativamente altas em uma grande variedade de tecidos, exibindo propriedades hipertróficas e hiperplásicas, sendo reguladores particularmente importantes da miogênese, exercendo um papel endócrino, autócrino e parácrino na integração entre a regulação tecido-específica e outros eventos biológicos (Moriyama *et al.*, 2000; Mommsen, 2001). Dentre os fatores de crescimento, os mais estudados atualmente são IGF-I e IGF-II. A produção de IGF-I e IGF-II parece estar relacionada com o

desenvolvimento animal, sendo que os altos níveis de IGF-II são detectados no início da embriogênese, diminuindo mais tarde quando os níveis de IGF-I aumentam (Méndez *et al.*, 2000). O IGF-I tem a função básica de ativar a secreção, pelos condrócitos (células de cartilagem), de condroitina-sulfato e de colágeno, ambos necessários para o crescimento da cartilagem e ossos (Guyton, 1992). Além disso, o IGF-I têm as funções de estimular a síntese protéica (Negatu & Meier, 1995), estimular a espermatogênese (Dubois & Callard, 1993; Loir & Lê Gac, 1994), induzir a maturação final de ovócitos (Maestro *et al.*, 1997) e aumentar a adaptabilidade para a água salgada (McCormick *et al.*, 1991). Já o IGF-II é um importante fator de crescimento fetal em mamíferos (Baker *et al.*, 1993), mas a sua função em peixes não está claramente identificada (Duval *et al.* 2002).

Genes relacionados com o crescimento têm sido ligados a diferentes tipos de promotores e, em alguns casos, utilizados com sucesso na produção de peixes com taxas de crescimento melhoradas e é provável que tais linhagens de peixes geneticamente modificados tenham um impacto significativo no futuro da aquicultura (Maclean, 1998). Embora esta afirmação tenha uma grande possibilidade de se concretizar, é fato que a aceleração do crescimento em peixes através da super expressão de transgenes tem sido observada em um número razoável de linhagens, porém nenhuma aceleração tem sido observada em outras, incluindo um relato de carência de crescimento em linhagens geneticamente selecionadas de truta (Devlin *et al.*, 2001). Adicionalmente, maior aceleração no crescimento tem sido observado em linhagens que apresentam níveis de GH circulante relativamente mais baixos (de la Fuente *et al.*, 1999). Estudos demonstrando conseqüências fenotípicas em peixes transgênicos para o GH, têm resultados diferentes sobre o aumento no crescimento em relação a peixes normais (Zhang *et al.*, 1990; Du *et al.*, 1992; Gross *et al.*, 1992; Devlin *et al.*, 1994).

O objetivo deste trabalho foi comparar o crescimento entre peixes homozigotos e hemizigotos geneticamente modificados para o gene do GH e indivíduos não-transgênicos, avaliando o peso, o comprimento padrão e a altura. Além disso, foram analisadas as expressões do transgene do GH e do gene do IGF-I entre as diferentes classes.

Material e métodos

Modelo experimental

Como modelo experimental para este trabalho foi escolhido o paulistinha (*Danio rerio*) por apresentar uma série de características que o torna especialmente adequado para estudos genéticos, dentre as quais podem ser destacadas o pequeno tamanho dos embriões, o rápido desenvolvimento e a transparência, facilitando a visualização ao microscópio de epifluorescência (Udvardia & Linney, 2003).

Obtenção dos peixes

Os peixes transgênicos homocigotos utilizados para o experimento de crescimento foram produzidos a partir do cruzamento entre indivíduos homocigotos para o transgene msGH, oriundos da linhagem F0104 (Capítulo II). Esta linhagem foi produzida através da co-injeção dos transgenes c β A/GFP e c β A/msGH, o que permitiu a identificação dos transgênicos pela expressão do gene da proteína verde fluorescente. Os indivíduos hemizigotos e não-transgênicos foram produzidos a partir do cruzamento de machos hemizigotos da linhagem F0104 e fêmeas não-transgênicas, sendo as desovas analisadas em microscópio de epifluorescência (excitação 485 nm, emissão 520 nm), para a classificação dos grupos.

Análise de crescimento dos peixes

Para o experimento de crescimento foram utilizados alevinos com 30 dias de idade. Grupos de não-transgênicos, transgênicos hemizigotos e transgênicos homocigotos foram cultivados separadamente por um período de 75 dias, em um sistema de cultivo de circulação fechada, em aquários com capacidade de 25 L. A temperatura da água foi mantida em 28 °C, oxigenação próxima da saturação, pH em torno de 7 e fotoperíodo de 14 horas claro e 10 horas escuro. Os peixes foram alimentados diariamente na proporção de 5% da biomassa total de cada experimento, com ração comercial (Tetra Color Bits).

Foram utilizados 71 indivíduos não-transgênicos, 57 hemizigotos e 61 homocigotos, divididos em três repetições. As biometrias foram realizadas a cada 15 dias, sendo que nas duas primeiras foram coletados somente os dados de peso, e a partir

da terceira biometria foi iniciada a coleta dos dados de comprimento padrão e altura. Este critério foi usado devido ao pequeno tamanho dos alevinos nas duas primeiras biometrias, o que dificultava a manipulação dos mesmos. Em cada biometria, todos os peixes foram analisados e posteriormente devolvidos aos aquários. Para a manipulação, os peixes foram anestesiados com triclaína (0,1 mg/ml).

Análise da expressão do transgene c β A/msGH

A RT-PCR (reação em cadeia da polimerase, utilizando a transcriptase reversa) foi utilizada para analisar a expressão gênica de forma semi-quantitativa. Este método foi desenvolvido por Chelly *et al.* (1988), o qual baseia-se na quantificação da expressão de um determinado gene, utilizando um gene endógeno com expressão constitutiva como controle interno. Transcritos codificando proteínas estruturais, enzimas metabólicas, proteínas ribossomais podem ser usados como controles internos. A função do controle interno é agir como indicador das variações entre as diferentes amostras nas reações de síntese do cDNA e na PCR. Após a normalização com base no controle interno, os níveis de mRNA de cada amostra individual são comparadas diretamente.

Ao final dos experimentos de crescimento foram utilizados três indivíduos de cada classe, amostrados aleatoriamente, para confirmar a presença do transgene c β A/msGH. Esses animais foram sacrificados e uma secção transversal da região abdominal foi retirada para a extração do RNA total com o reagente Trizol (Invitrogen, Brasil), conforme descrito pelo fabricante. Aproximadamente 5 μ g de RNA de cada indivíduo foi utilizado como molde para a RT-PCR com o *primer* AP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC (T)₁₇ - 3' Invitrogen, Brasil). A síntese do cDNA foi realizada através da enzima RT SuperScript III (Invitrogen, Brasil), segundo protocolo sugerido pelo fabricante.

O cDNA sintetizado foi utilizado para amplificar o transgene msGH por PCR utilizando os *primers* EXO 293 (5'-GAAAGCTCTCTGCAGACGGAG-3') e GHEX6-RIG (5'-AGAGTGCAGTTTGCCTCTGG-3'), o qual produz um fragmento de 467 pb e não amplifica o gene do GH endógeno do paulistinha. As reações da PCR foram realizadas utilizando 38,1 μ L de água, 5,0 μ L de tampão PCR 10X, 1,5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1,0 μ L de dNTP (10 mM), 2,0 μ L de cDNA, 1,0 μ L de cada *primer* (0,2 μ M)

e 0,4 µL de *Platinum Taq polimerase* (5 U/µL) (Invitrogen, Brasil), totalizando um volume final de 50,0 µL para cada reação.

As condições de amplificação para a PCR do msGH foram constituídas de um passo de desnaturação a 94 °C por 2 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 15 s, 65 °C por 30 s e 72 °C por 30 s e um passo final de elongação a 72 °C por 5 min. Após a amplificação as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e fotografado para posterior análise de densitometria das bandas observadas.

O gene da β-actina do paulistinha foi utilizado para normalizar a expressão do gene msGH, utilizando os mesmos cDNAs sintetizados anteriormente. Para a amplificação desse gene foram utilizados os *primers* ZFBAC-FOR (5'-CCCTTGTTACAATAACCT-3') e ZFBAC-REV (5'-TCTGTTGGCTTTGGGATTCA-3') desenhados por Pang & Ge (2002), em um volume de 1,0 µL cada (0,2 µM). Para completar a reação da PCR foram usados 38,1 µL de água, 5,0 µL de tampão PCR 10X, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µL de dNTP (10 mM), 2,0 µL de cDNA e 0,4 µL de *Platinum Taq polimerase* (5 U/µL) (Invitrogen, Brasil), totalizando um volume final de 50,0 µL para cada reação.

As condições de amplificação para a PCR do β-actina foram constituídas de um passo de desnaturação a 94 °C por 1 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 30 s e 72 °C por 1 min e um passo final de elongação a 72 °C por 5 min. Após a amplificação as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo e fotografado para posterior análise de densitometria das bandas observadas. O tamanho esperado do produto da PCR é de 380 pb.

Análise da expressão do gene do IGF-I

Foram utilizados, para a amplificação do gene do IGF-I, os mesmos cDNAs produzidos para a verificação da expressão do transgene msGH. Entretanto, foi necessária a realização de duas PCRs, sendo que na primeira utilizou-se *primers* mais externos e na segunda foi usado o *primer* reverso mais interno. Os *primers* foram desenhados a partir da seqüência do cDNA do IGF-I do paulistinha, disponível no GenBank (AF268051). Para a primeira PCR foram utilizados os *primers* IGF-IF (5'-GGCATTGGTGTGATGTCTT-3') e AUAP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'),

em um volume de 0,25 μL (0,2 μM) cada. Para completar a reação da PCR foram usados 9,525 μL de água, 1,25 μL de tampão PCR 10X, 0,375 μL de MgCl_2 (50 mM), 0,25 μL de dNTP (10 mM), 0,5 μL de cDNA e 0,1 μL de *Platinum Taq polimerase* (5 U/ μL) (Invitrogen, Brasil), totalizando um volume final de 12,5 μL para cada reação. As condições de amplificação para essa PCR constituíram-se de um passo de desnaturação a 94 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 1 min e 30 s e 72 °C por 30 s e um passo final de elongação a 72 °C por 5 min.

Para a segunda PCR foram usados os oligonucleotídeos IGF-IF e IGF-IR (5'-GTGTGTCGTTGTGCTCGTA-3'), num volume de 1,0 μL (0,2 μM) cada. Para completar a reação da PCR foram usados 38,1 μL de água, 5,0 μL de tampão PCR 10X, 1,5 μL de MgCl_2 (50 mM), 1,0 μL de dNTP (10 mM), 2,0 μL do produto resultante da primeira PCR e 0,4 μL de *Platinum Taq polimerase* (5 U/ μL) (Invitrogen, Brasil), totalizando um volume final de 50,0 μL para cada reação.

As condições de amplificação para a segunda PCR foram constituídas de um passo de desnaturação a 94 °C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 1 min e 30 s e 72 °C por 30 s e um passo final de elongação a 72 °C por 5 min. Após a amplificação as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo e fotografado para posterior análise de densitometria das bandas observadas. O tamanho esperado do produto da PCR é de 345 pb. O gene da β -actina foi utilizado para normalizar a expressão do gene do IGF-I.

Análise estatística

Para testar as diferenças no crescimento e na expressão dos genes entre indivíduos transgênicos homocigotos, hemizigotos e não-transgênicos foi utilizada ANOVA, seguida pelo teste de múltiplas comparações (TUKEY) ($P < 0,05$), utilizando o programa Statistic versão 6.0.

Resultados

Crescimento dos peixes

No experimento de crescimento os indivíduos hemizigotos atingiram um peso médio final (175,9 mg \pm 10,9) significativamente maior do que os homozigotos (127,2 mg \pm 7,8, $P < 0,01$) e os não-transgênicos (147,9 mg \pm 6,8, $P < 0,05$). A diferença entre hemizigotos (93,3 mg \pm 5,1) e homozigotos (63,6 mg \pm 2,3) começou a ser evidenciada quando os animais atingiram a idade de 75 dias ($P < 0,01$). Já a diferença entre hemizigotos e não-transgênicos foi observada na última biometria ($P < 0,05$). Entre os homozigotos e os não-transgênicos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, embora haja uma tendência dos homozigotos terem um peso médio final menor (Figura 1).

Com relação às medidas de comprimento padrão não foi observada diferença significativa entre as classes. Os indivíduos não-transgênicos obtiveram um comprimento médio final de 19,3 mm (\pm 0,2), os homozigotos de 18,1 mm (\pm 0,3) e os hemizigotos de 20,2 mm (\pm 0,4) (Figura 2). Entretanto para as medidas de altura foi encontrada uma relação com as medidas de peso, sendo que os hemizigotos (4,7 mm \pm 0,1) apresentaram uma altura média final significativamente maior do que os homozigotos (4,1 mm \pm 0,1, $P < 0,01$) e os não-transgênicos (4,5 mm \pm 0,1, $P < 0,01$). Os não-transgênicos atingiram uma altura média final significativamente maior que os homozigotos ($P < 0,05$). O ponto onde começou a ocorrer a diferenciação entre hemizigotos (3,64 mm \pm 0,1) e homozigotos (3,27 mm \pm 0,1) foi a partir da quarta biometria ($P < 0,01$), e entre os hemizigotos e os não-transgênicos foi somente na última biometria (Figura 3).

O percentual de mortalidade durante o experimento de crescimento foi de 4,2% (3/71) para os indivíduos não-transgênicos, de 12,3% (7/57) para os hemizigotos e de 11,5% (7/61) para os homozigotos.

Expressão do transgene $c\beta A/msGH$

Os animais homozigotos apresentaram uma expressão 1,5 vezes maior para o transgene $msGH$ do que os hemizigotos, após a normalização dos dados pela expressão

do gene da β -actina ($P < 0,01$). Os peixes não-transgênicos não apresentaram, como esperado, nenhuma expressão para o transgene msGH (Figura 4).

Expressão do gene do IGF-I

Para a expressão do gene do IGF-I foi observado que os animais hemizigotos apresentaram uma expressão 1,75 vezes maior do que os não-transgênicos, quando os resultados foram normalizados com a expressão do gene da β -actina ($P < 0,01$). Para os indivíduos homozigotos não foi detectada nenhuma expressão desse gene (Figura 5).

Discussão

Atualmente, existem inúmeros estudos sobre a performance do crescimento com várias espécies de peixes transgênicos para GH, entretanto os trabalhos têm comparado apenas o desempenho do crescimento entre indivíduos transgênicos hemizigotos em relação aos não transgênicos (Hinitz & Moav, 1999; Rahman & Maclean, 1999; Morales *et al.*, 2001; Devlin *et al.*, 2004). O presente trabalho, contudo, avaliou o crescimento de indivíduos transgênicos homozigotos e hemizigotos e não-transgênicos visando determinar qual classe seria mais vantajosa para ser utilizada no cultivo. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os animais hemizigotos tiveram um potencial de crescimento significativamente maior do que as outras duas classes, o que também já havia sido observado por Martínez *et al.* (1999) trabalhando com a tilápia *Oreochromis hornorum*. Por outro lado, Rahman *et al.* (1998) trabalhando com a tilápia *Oreochromis niloticus* verificaram que o crescimento de indivíduos homozigotos e hemizigotos foi semelhante.

O maior crescimento dos indivíduos hemizigotos não se refletiu na expressão do gene do GH exógeno, já que essa foi aproximadamente 1,5 vezes menor do que a observada nos homozigotos. Nam *et al.*, (2000) trabalhando com uma linhagem de *Misgurnus mizolepis* transgênica para o gene da CAT (clorofenicol acetil transferase) observaram que a expressão desse gene foi cerca de 1,8 e 1,6 vezes maior no fígado e baço de indivíduos homozigotos quando comparados aos hemizigotos. Da mesma forma, Rahman *et al.*, (2000) trabalhando com a tilápia *Oreochromis niloticus* transgênica para o gene da *lacZ* (β -galactosidase) encontraram uma expressão duas vezes maior deste gene nos homozigotos em relação aos hemizigotos.

Com a finalidade de elucidar a questão da maior expressão do gene do GH exógeno e o menor crescimento dos indivíduos homozigotos foi realizada a análise genética do gene do IGF-I, que está intimamente ligado ao crescimento corporal. A via pela qual o processo do crescimento se desenvolve começa pela síntese do GH na hipófise, o qual é liberado na corrente sanguínea, onde vai atuar em determinados órgãos através da sua associação com receptores específicos (GHR) presentes na superfície das células alvo, sendo que cada molécula de GH se associa a duas moléculas de GHR. A ligação do GH com seu receptor induz a fosforilação de enzimas, que irão servir de sítios de ancoragem para as moléculas conhecidas como STATs, as quais ativam genes específicos no desenvolvimento das respostas biológicas ao GH, como os IGFs. No presente estudo foi observado que os indivíduos hemizigotos apresentaram uma expressão do gene do IGF-I significativamente maior que os não-transgênicos. Por outro lado, nos homozigotos não foi evidenciada a expressão desse gene, apesar deles apresentarem uma expressão significativamente maior do gene do GH exógeno. Ambos os resultados confirmam o que foi encontrado nos experimentos de crescimento.

De acordo com de la Fuente *et al.* (1999), elevados níveis de GH podem interferir com a capacidade de transdução do sinal dos GHRs, já que o excesso de GH circulante pode impedir a formação do complexo ativo (GH/GHR), inibindo a dimerização necessária para a sua atividade biológica. Isto ocorre porque cada molécula de GH está ligada a uma única molécula de GHR. Como a molécula do GH possui dois sítios de ligação com afinidades diferentes com o seu receptor, sendo que o sítio 1 é considerado como o sítio de ligação preferencial e de alta afinidade, enquanto que o sítio 2 é considerado como secundário e de baixa afinidade (Sundström *et al.*, 1996), é provável que todas as moléculas de GH estejam associadas aos seus receptores apenas pelo sítio 1. de la Fuente *et al.* (1999) demonstraram que o número e a afinidade de ligação dos GHRs não variaram entre tilápias transgênicas e não-transgênicas e, além disso, demonstraram que baixos níveis de GH exógeno aceleram o crescimento por permitirem uma melhor ocupação dos receptores. Esses resultados podem explicar a não detecção da expressão do gene do IGF-I e o menor crescimento dos indivíduos homozigotos, assim como, a maior expressão do gene do IGF-I e, conseqüentemente, o maior crescimento dos hemizigotos.

De uma maneira geral, os resultados obtidos neste estudo demonstram que o excesso de GH torna-se prejudicial ao organismo, não produzindo os efeitos metabólicos esperados para o crescimento. Por outro lado, ficou comprovado que os hemizigotos mostraram um melhor desempenho, sendo a classe mais indicada para o cultivo.

Referências

- Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN e Carter-Su C (1993) Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase *Cell* 74: 237-244.
- Baker J, Liu JP, Robertson EJ e Efstratiadis A (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth *Cell* 75: 73-82.
- Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gaustrom S e Kahn A (1988) Transcription of the dystrophin gene in human muscle and nonmuscle tissue *Nature* 333: 858-860.
- de la Fuente J, Guillen I, Martinez R e Estrada MP (1999) Growth regulation and enhancement in tilapia: basic research findings and their applications *Genet Anal* 15: 85-90.
- Devlin RH, Yesaki TY, Biagi CA, Donaldson EM, Swanson P e Chan WK (1994) Extraordinary salmon growth. *Nature* 371: 209-210.
- Devlin RH, Biagi CA, Yesaki TY, Smailus DE e Byatt JC (2001) Growth of domesticated transgenic fish *Nature* 409: 781-782.
- Devlin RH, Biagi CA, Yesaki TY (2004) Growth, viability and genetic characteristics of GH transgenic coho salmon strains *Aquaculture* 236: 607-632.
- Du SJ, Gong Z, Fletcher GL, Shears MA, King MJ, Idler DR e Hew CL (1992) Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct *Bio-Technology* 10: 176-181.

- Dubois W e Callard GV (1993) Culture of intact sertoli/germ cell units and isolated sertoli cells from *Squalus testis*. II. Stimulatory effects of insulin and IGF-I on DNA synthesis in premeiotic stages *J Exp Zool* 267: 233-244.
- Duval H, Rousseau K, Elies G, Le Bail PY, Dufour S, Boeuf G e Boujard D (2002) Cloning, characterization, and comparative activity of turbot IGF-I and IGF-II *Gen Comp Endocrinol* 126: 269-278.
- Gross ML, Schneider JF, Moav N, Moav B, Alvarez C, Myster SH, Liu Z, Hallerman EM e Kapuscinski AR (1992) Molecular analysis and growth evaluation of northern pike (*Esox lucius*) microinjected with growth hormone genes *Aquaculture* 103: 3-4.
- Guyton AC (1992) Tratado de fisiologia médica (pp. 793-800) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Hinitz Y e Moav B (1999) Growth performance studies in transgenic *Cyprinus carpio* *Aquaculture* 173: 285-296.
- Ihle JN (1996) STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription *Cell* 84: 331-334.
- Loir M e Lê Gac F (1994) Insulin-like growth factor-I and II binding and action on DNA synthesis in rainbow trout spermatogonia and spermatocytes *Biol Reprod* 51: 1154-1163.
- Macleán N (1998) Regulation and exploitation of transgenes in fish *Mutation Res* 399: 255-266.
- Maestro MA, Planas JV, Moriyama S, Gutierrez J, Planas J e Swanson P (1997) Ovarian receptors for insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) and effects of IGF-I on steroid production by isolated follicular layers of the preovulatory coho salmon ovarian follicle *Gen Comp Endocrinol* 106: 189-201.
- Martínez R, Arenal A, Estrada MP, Herrera F, Huerta V, Vásquez J, Sánchez T e de la Fuente J (1999) Mendelian transmission, transgene dosage and growth phenotype in transgenic tilapia (*Oreochromis hornorum*) showing ectopic expression of homologous growth hormone *Aquaculture* 173: 271-283.
- McCormick SD, Sakamoto T, Hasegawa S e Hirano T (1991) Osmoregulatory actions of insulin-like growth factor-I in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *J Endocrinol* 130: 87-92.

- Méndez E, Castillo J, Smith A, Capilla E, Gabillard JC, Planas JV, Navarro I e Gutiérrez J (2000) IGF-I and IGF-II throughout fish development *Comp Bioch Physiol*, Part A 126: S1-S163.
- Mommsen TP (2001) Paradigms of growth in fish *Comp Bioch Physiol*, Part B 129: 207-219.
- Morales R, Herrera MT, Arenal A, Cruz A, Hernández O, Pimentel R, Guillén I, Martínez R e Estrada MP (2001) Tilapia chromosomal growth hormone gene expression accelerates growth in transgenic zebrafish (*Danio rerio*) *Eletronic J Biotechnol* 4: 52-58.
- Moriyama S, Ayson FG e Kawauchi H (2000) Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1553-1562.
- Nam YK, Cho YS e Kim DS (2000) Isogenic transgenic homozygous fish induced by artificial parthenogenesis *Transgenic Res* 9: 463-469.
- Negatu Z e Meier AH (1995) In vitro incorporation of [¹⁴C] glycine into muscle protein of gulf killifish (*Fundulus grandis*) in response to insulin-like growth factor-I *Gen Comp Endocrinol* 98: 193-201.
- Pang Y e Ge W (2002) Gonadotropin regulation of activin betaA and activin type IIA receptor expression in the ovarian follicle cells of the zebrafish, *Danio rerio* *Mol Cell Endocrinol* 188: 195-205.
- Rahman MA, Mak R, Ayad H, Smith A e Maclean N (1998) Expression of a novel piscine growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Transgenic Res* 7: 357-369.
- Rahman MA e Maclean N (1999) Growth performance of transgenic tilapia containing an exogenous piscine growth hormone gene *Aquaculture* 173: 333-346.
- Rahman MA, Hwang GL, Razak SA, Sohm F e Maclean N (2000) Copy number related transgene expression and mosaic somatic expression in hemizygous and homozygous transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Transgenic Res* 9: 417-427.
- Schindler C e Darnell Jr JE (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway *Annu Rev Biochem* 64: 621-651.
- Sundström M, Lundqvist T, Rodin J, Giebel LB, Milligan D e Norstedt G (1996) Crystal structure of an antagonist mutant of human growth hormone, G120R, in complex with its receptor at 2.9 Å resolution *J Biol Chem* 271: 32197-32203.

- Udvardia AJ e Linney E (2003) Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish *Dev Biol* 256: 1-17.
- VanderKuur JA, Wang X, Zhang L, Campbell GS, Allevato G, Billestrup N, Norstedt G e Carter-Su C (1994) Domains of the growth hormone receptor required for association and activation of JAK2 tyrosine kinase *J Biol Chem* 269: 21709-21717.
- VanderKuur JA, Wang X, Zhang L, Allevato G, Billestrup N e Carter-Su C (1995) Growth hormone-dependent phosphorylation of tyrosine 333 and/or 338 of the growth hormone receptor *J Biol Chem* 270: 21738-21744.
- Zhang P, Hayat M, Joyce C, Gonzalez-Villasenor LI, Lin CM, Dunham RA, Chen TT e Powers DA (1990) Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH-cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* *Mol Reprod Dev* 25: 13-25.

Legendas das Figuras:

Figura 1: Peso médio de paulistinhas (*Danio rerio*) transgênicos homozigotos (HO), hemizigotos (HE) e não-transgênicos (NT), durante seis biometrias. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as classes ($P < 0,01$). Os valores são expressos em $\text{mg} \pm$ erro padrão.

Figura 2: Comprimento padrão médio de paulistinhas (*Danio rerio*) transgênicos homozigotos (HO), hemizigotos (HE) e não-transgênicos (NT), durante quatro biometrias. Os valores são expressos em $\text{mm} \pm$ erro padrão.

Figura 3: Altura média de paulistinhas (*Danio rerio*) transgênicos homozigotos (HO), hemizigotos (HE) e não-transgênicos (NT), durante quatro biometrias. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as classes ($P < 0,01$). Na biometria P6 a diferença entre NT e HO foi significativa ($P < 0,05$). Os valores são expressos em $\text{mm} \pm$ erro padrão.

Figura 4: Expressão do gene do hormônio do crescimento do peixe-rei marinho (*Odonthestes argentinensis*) em paulistinha (*Danio rerio*) transgênicos homozigotos (HO) e hemizigotos (HE) para este hormônio e não-transgênicos (NT). Letras diferentes representam diferenças significativas entre as classes ($P < 0,01$). Os valores são expressos como média \pm erro padrão.

Figura 5: Expressão do gene do fator de crescimento tipo insulina I em paulistinha (*Danio rerio*) transgênicos homozigotos (HO) e hemizigotos (HE) para o hormônio do crescimento do peixe-rei marinho (*Odonthestes argentinensis*) e não-transgênicos (NT). Letras diferentes representam diferenças significativas entre as classes ($P < 0,01$). Os valores são expressos como média \pm erro padrão.

Figura 1

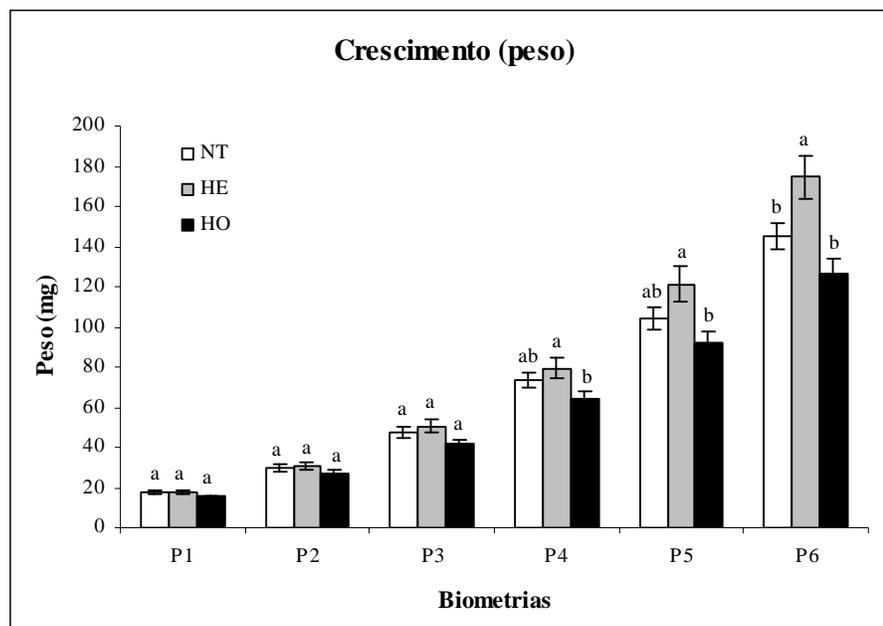


Figura 2

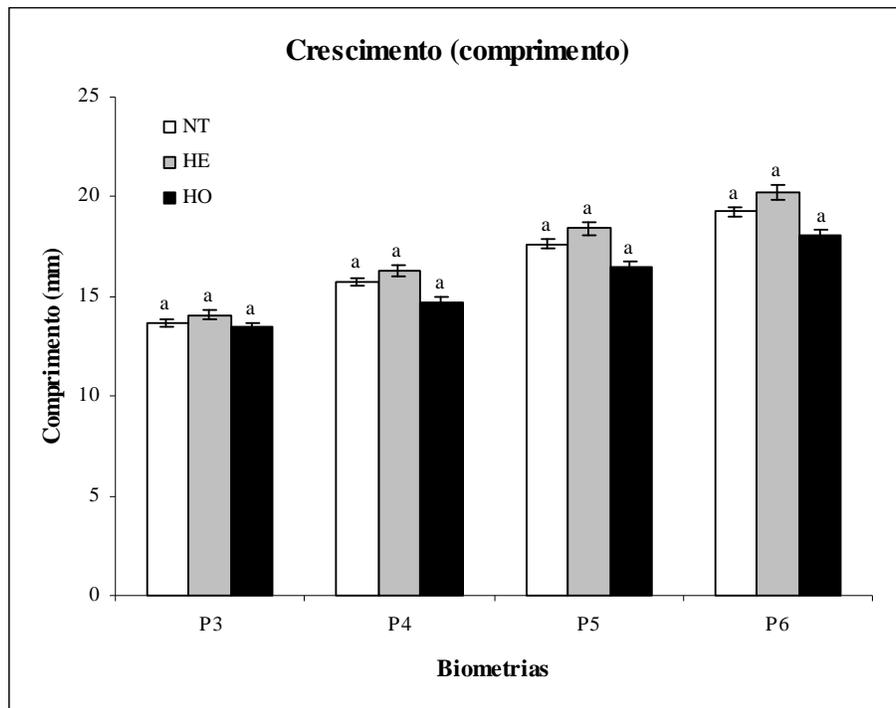


Figura 3

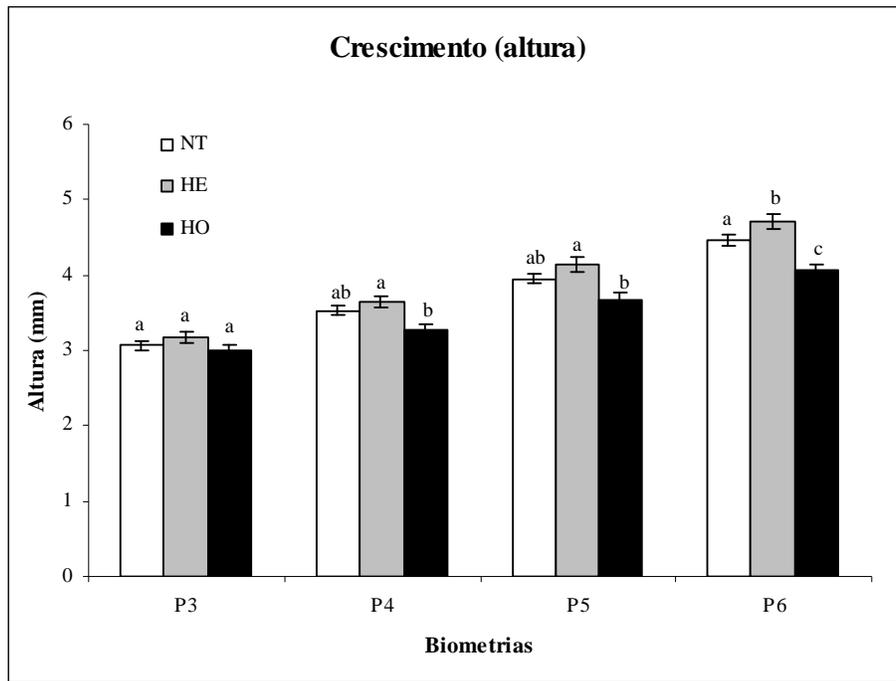


Figura 4

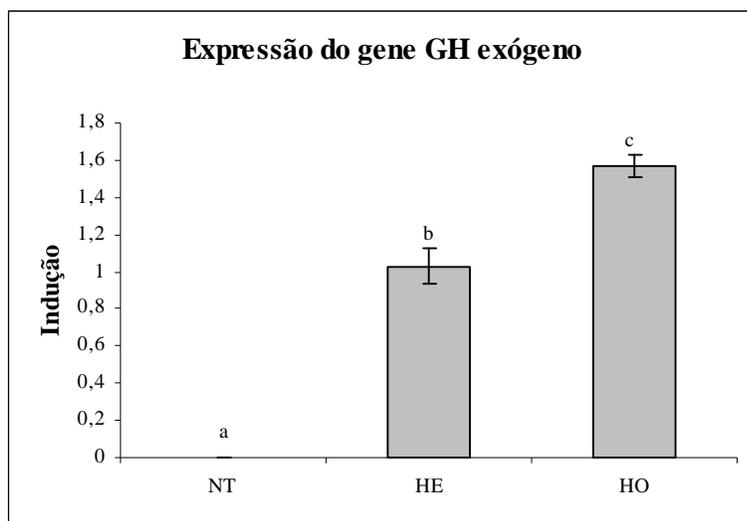
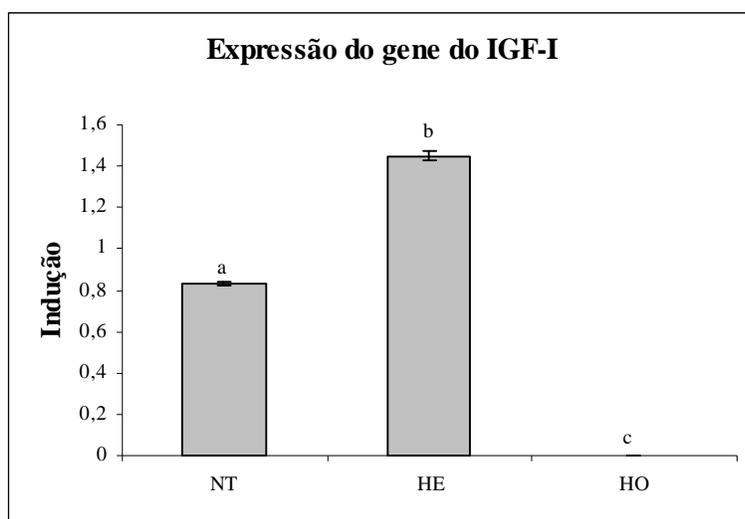


Figura 5



Discussão Geral

Várias estratégias para aumentar a produção de peixes transgênicos na primeira geração têm sido utilizadas, incluindo eletroporação (Inoue *et al.*, 1990), transferência de gene mediante lipossomo (Szelei *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 2002), introdução de transgenes através do sêmen (Müller *et al.*, 1992) e a injeção de DNA diretamente nas gônadas de machos (Lu *et al.* 2002). Embora essas metodologias tenham apresentado resultados promissores, a necessidade do cultivo de um número significativo de indivíduos transgênicos na primeira geração, para a posterior identificação daqueles com potencial para gerar linhagens germinativas estáveis carregando o transgene de interesse, ainda permanece. Este esforço é ainda maior quando a espécie alvo tem tamanho avantajado e necessita de instalações de cultivo de grande porte, tais como salmões, linguados, carpas, trutas ou tilápias. Dessa forma, a metodologia aplicada neste estudo permitiu a produção de peixes transgênicos carregando, além do transgene de interesse (GH), um transgene marcador (GFP), que possibilitou a avaliação individual de cada transgênico gerado com base no padrão da expressão da GFP observada no microscópio de epifluorescência. Com isso, a seleção de possíveis fundadores de linhagens germinativas foi facilitada e, além disso, foi possível reduzir o número de organismos cultivados na primeira geração.

O principal problema do mosaicismo na geração de linhagens germinativas é o fato de que as células gonadais dos indivíduos da primeira geração podem carregar poucas ou nenhuma cópia dos transgenes microinjetados, dificultando a transmissão da característica para a descendência (Maclean, 1998). Entretanto, a classificação dos indivíduos co-injetados em três diferentes padrões em relação à expressão da GFP permitiu a seleção dos organismos com maior potencial de gerar linhagens germinativas. Essa seleção prévia, além de economizar tempo e espaço, simplificou o trabalho para a obtenção de uma linhagem transgênica, já que não foi necessário cultivar todos os indivíduos da primeira geração até a maturação sexual, para a extração de DNA das células germinativas e, só então, verificar se carregavam o transgene de interesse. Além disso, a estratégia de co-injeção com o gene marcador permitiu identificar uma, dentre seis linhagens produzidas, que continha ambos os transgenes integrados no mesmo cromossomo, transmitindo estes juntos para a sua descendência. A

transmissão dos dois transgenes juntos facilitou a identificação de indivíduos transgênicos nas gerações seguintes, através de uma simples visualização em microscópio de epifluorescência.

Além da facilidade na identificação de transgênicos G_0 com potencial de gerar linhagens germinativas, a estratégia da co-injeção tem aplicação direta nos casos onde a utilização de proteínas fusionadas com a GFP não é recomendada. Estudos onde o objetivo é a avaliação da ação de promotores tecido-específicos ou que atuam em determinados estágios de desenvolvimento dos organismos, poderiam ser facilitados pela aplicação da estratégia de co-injeção com transgenes marcadores. Esta estratégia pode tornar-se ainda mais eficiente devido a recente disponibilização de plasmídeos carregando genes que codificam para proteínas fluorescentes com diferentes espectros de emissão como, por exemplo, a proteína vermelha fluorescente (RFP), da anêmona *Discosoma* sp. (Matz *et al.*, 1999). Desta forma, genes que codificam para duas proteínas fluorescentes podem ser utilizados de maneira complementar, onde um pode estar associado a um promotor de expressão ubíqua para avaliação do mosaicismo e identificação dos possíveis fundadores de linhagens germinativas, enquanto que outro pode ser utilizado para o estudo de um promotor específico.

Com relação aos experimentos de crescimento foi verificado que os animais G_0 , assim como os indivíduos hemizigotos da linhagem F0104, apresentaram um maior crescimento do que os não-transgênicos. Isto também já foi observado em outras espécies de peixes transgênicos para o GH, como tilápia (Rahman *et al.*, 1998), salmão (Du *et al.*, 1992; Devlin *et al.* 1994), mud loach (Nam *et al.*, 2001), carpa (Chatakondi *et al.*, 1995), bagre de canal (Dunham *et al.*, 1992) e até mesmo no próprio paulistinha (Morales *et al.*, 2001). Entretanto, os indivíduos homozigotos, apesar de terem uma maior expressão para o gene do GH exógeno, apresentaram uma menor taxa de crescimento do que os animais hemizigotos, semelhante ao encontrado por Martínez *et al.* (1999). O menor crescimento observado nos animais homozigotos está relacionado com a ausência de expressão do gene do IGF-I, que tem, entre outras, a função de ativar a secreção, pelos condrócitos, de condroitina-sulfato e de colágeno, ambos necessários para o crescimento da cartilagem e ossos e estimular a síntese protéica (Negatu & Meier, 1995).

A metodologia aplicada neste estudo permitiu que fossem feitas inferências sobre os eventos de integração dos transgenes utilizados, possibilitando a identificação de uma, dentre seis linhagens obtidas, que estava transmitindo ambos transgenes ligados no mesmo cromossomo, facilitando a obtenção de indivíduos homozigotos e hemizigotos, destinados a experimentos de crescimento, onde os indivíduos hemizigotos se mostraram mais viáveis, em termos de cultivo. A análise da expressão do gene do IGF-I permitiu encontrar o motivo pelo qual os animais homozigotos, apesar de estarem expressando mais o gene do GH exógeno, não apresentaram um crescimento proporcional a esta expressão.

Referências

- Chatakondi, N., Lovell, R.T., Duncan, P.L., Hayat, M., Chen, T.T., Powers, D.A., Weete, J.D., Cummins, K., Dunham, R.A., 1995. Body composition of transgenic common carp, *Cyprinus carpio*, containing rainbow trout growth hormone gene. *Aquaculture* 138, 99-109.
- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Biagi, C.A., Donaldson, E.M., Swanson, P., Chan, W.K., 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature* 371, 209-210.
- Du, S.J., Gong, Z., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Idler, D.R., Hew, C.L., 1992. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an “all fish” chimeric growth hormone gene construct. *Bio-Technol.* 10, 179-187.
- Dunham, R.A., Ramboux, A.C., Duncan, P.L., Hayat, M., Chen, T.T., Lin, C-M., Kight, K., Gonzalez-Villasenor, I., Powers, D.A., 1992. Transfer, expression, and inheritance of salmonid growth hormone genes in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and effects on performance traits. *Mol. Mar. Biol. and Biotechnol.* 1, 380-389.
- Inoue, K., Yamashita, S., Hata, J., Kabeno, S., Asada, S., Nagahisa, E., Fujita, T., 1990. Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell Diff. and Dev.* 29, 123-128.
- Lu, J.K., Fu, B.H., Wu, J.L., Chen, T.T., 2002. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar. Biotechnol.* 4, 328-337.
- Macleán, N., 1998. Regulation and exploitation of transgenes in fish. *Mutation Res.* 399, 255-266.
- Martínez, R., Arenal, A., Estrada, M.P., Herrera, F., Huerta, V., Vásquez, J., Sánchez, T., de la Fuente, J., 1999. Mendelian transmission, transgene dosage and growth phenotype in transgenic tilapia (*Oreochromis hornorum*) showing ectopic expression of homologous growth hormone. *Aquaculture* 173, 271-283.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., Lukyanov, S.A., 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nature Biotechnol.* 17, 969-973.

- Morales, R., Herrera, M.T., Arenal, A., Cruz, A., Hernández, O., Pimentel, R., Guillén, I., Martínez, R., Estrada, M.P., 2001. Tilapia chromosomal growth hormone gene expression accelerates growth in transgenic zebrafish (*Danio rerio*). Electronic J. of Biotechnol. 4, 1-7.
- Müller, F., Ivics, Z., Erdelyi, F., Papp, T., Varadi, L., Horváth, L., Maclean, N., 1992. Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. Mol. Mar. Biol. and Biotechnol. 1, 276-81.
- Nam, Y.K., Noh, J.K., Cho, Y.S., Cho, H.J., Cho, K.N., Kim, C.G., Kim, D.S., 2001. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. Transgenic Res. 10, 353-362.
- Negatu, Z., Meier, A.H., 1995. In vitro incorporation of [14C] glycine into muscle protein of gulf killifish (*Fundulus grandis*) in response to insulin-like growth factor-I. Gen. Comp. Endocrinol. 98, 193-201.
- Rahman, M.A, Mak, R., Ayad, H., Smith, A., Maclean, N., 1998. Expression of a novel growth hormone gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). Transgenic Res. 7, 357-369.
- Szelei, J., Varadi, L., Müller, F., Erdelyi, F., Orbán, L., Horváth, L., Duda, E., 1994. Liposome-mediated gene-transfer in fish embryos. Transgenic Res. 3, 116-119.

Conclusões Gerais

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- A concentração de 18,3 ng/ μ L (10^6 cópias) da construção genética da GFP microinjetada foi mais eficiente na produção de indivíduos transgênicos.

- A estratégia da co-injeção de duas construções genéticas lineares na proporção de 1:1 foi eficaz, devido ao grande número de organismos transgênicos produzidos na primeira geração.

- A seleção de indivíduos fortes para a expressão da GFP diminui o esforço necessário para a obtenção de linhagens germinativas, diminuindo o número de organismos cultivados na primeira geração.

- A estratégia utilizada permitiu identificar uma linhagem, dentre seis, que estava transmitindo ambos os transgenes, ligados no mesmo cromossomo, para a sua descendência.

- A utilização do gene da GFP como marcador, além de facilitar a identificação de prováveis fundadores, permitiu uma fácil seleção dos indivíduos positivos nas gerações seguintes.

- O gene do GH do peixe-rei marinho (*Odonthestes argentinensis*), além de ser transcrito, produz um hormônio biologicamente ativo no paulistinha (*Danio rerio*) induzindo um maior crescimento nos indivíduos transgênicos.

- Os animais hemizigotos são os mais indicados para o cultivo por apresentarem um potencial de crescimento significativamente maior do que os homozigotos,.

- O menor crescimento dos indivíduos homozigotos, quando comparados aos hemizigotos, está relacionado à ausência de expressão do gene do IGF-I.