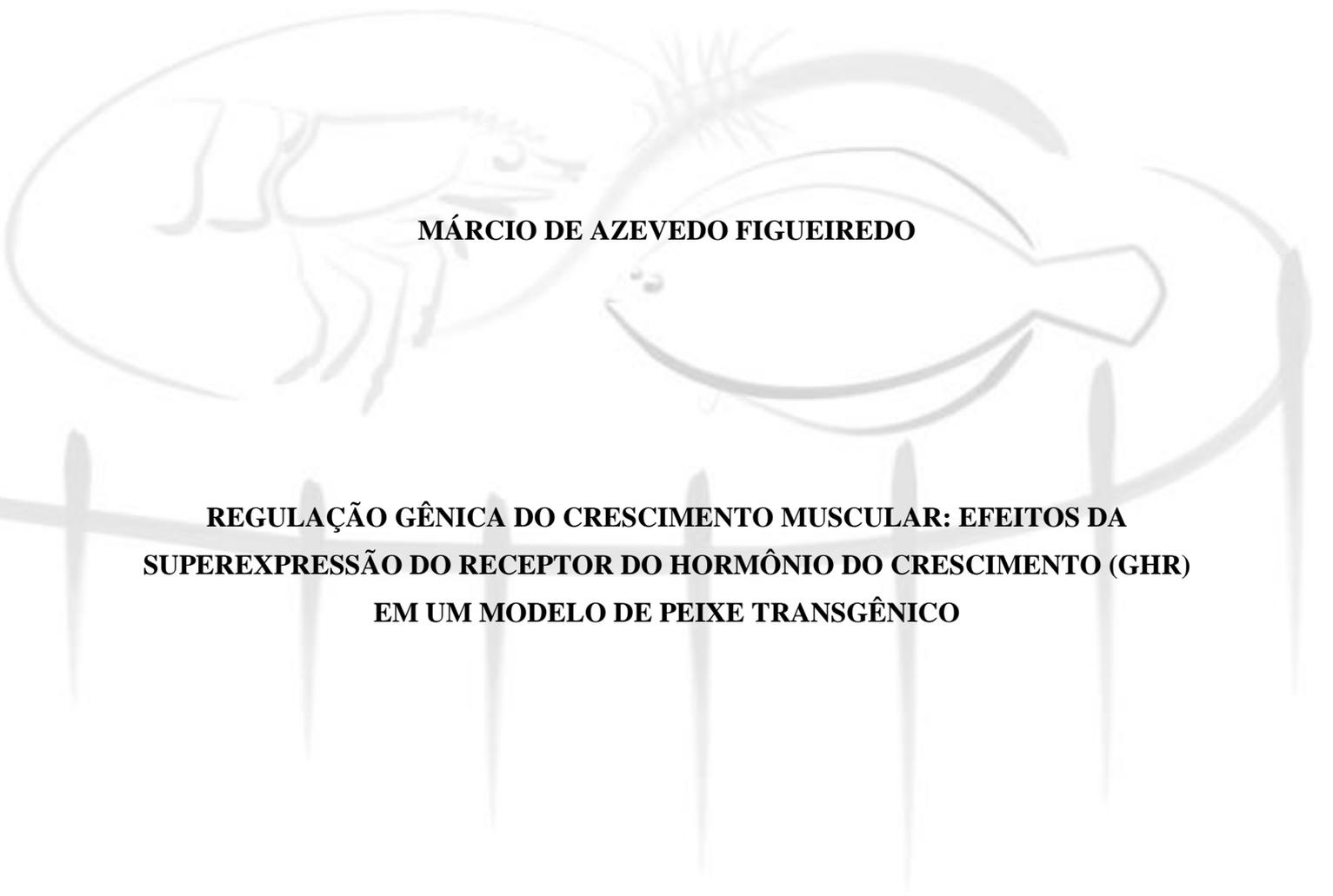


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**



**MÁRCIO DE AZEVEDO FIGUEIREDO**

**REGULAÇÃO GÊNICA DO CRESCIMENTO MUSCULAR: EFEITOS DA  
SUPEREXPRESSÃO DO RECEPTOR DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GHR)  
EM UM MODELO DE PEIXE TRANSGÊNICO**

**RIO GRANDE, RS**

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

REGULAÇÃO GÊNICA DO CRESCIMENTO MUSCULAR: EFEITOS DA  
SUPEREXPRESSÃO DO RECEPTOR DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO (GHR)  
EM UM MODELO DE PEIXE TRANSGÊNICO

MÁRCIO DE AZEVEDO FIGUEIREDO

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

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marins

Rio Grande – RS

Outubro de 2011



## Sumário

Agradecimentos .....	vi
Resumo Geral .....	vii
Abstract.....	viii
Introdução Geral .....	1
Objetivo Geral .....	9
Referências .....	10
Capítulo I.....	16
Resumo .....	18
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	23
Produção das construções genéticas .....	23
Manutenção dos peixes e produção dos transgênicos .....	24
Análise de crescimento .....	25
Expressão gênica .....	25
Análise histológica .....	26
Análise estatística .....	27
Resultados.....	27
Discussão .....	28
References .....	33
Tabela 1 .....	40
Figura 1.....	41
Figura 2.....	42
Figura 3.....	43
Figura 4.....	44
Figura 5.....	45
Capítulo II.....	46
Resumo .....	48
Abstract.....	49
1. Introdução.....	50
2. Material e Métodos.....	52
3. Resultados.....	53
4. Discussão .....	53
Referências .....	56
Tabela 1 .....	62
Figura 1.....	63

Figura 2.....	64
Figura 3.....	65
Discussão Geral.....	66
Referências .....	69
Conclusões Gerais .....	73
Anexo 1 .....	74

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

## **Agradecimentos**

Aos membros da banca examinadora, professores Alexandre Hilsdorf, Luis Sampaio, Luis Romano e Luiz Nery, pelas contribuições e atenção dedicada a esta tese. Trouxeram valorosas contribuições ao trabalho.

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, por todo aprendizado adquirido com vocês.

À Prof. Maeli Dal Pai Silva e ao Edson Mareco pelas contribuições nos experimentos de histologia.

À Maíra e ao Bruno pela força no inglês.

Ao Rafael Kuradomi e à Raissa que me ajudaram muito com os experimentos iniciais desta tese.

A todo pessoal da sala de permanência 4 da Fisiologia, pelos ótimos momentos vividos durante estes quatro anos de doutorado. Obrigado pessoal pelos papos divertidos que ajudaram muito durante os períodos mais difíceis do doutorado.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Fábio, Ju e Nino (agora professores), Bernardo, Bruno Cruz, Bruno Oliveira, Camila, Carol Peixoto, Carol Reyes, Cássia, Cecilia, Guilherme, Juliana, Loraine, Luana, Maíra, Regina, pela excelente convivência e amizade de todos.

Aos amigos, Bruna, Dani, Liane, Lupe e Rubens, com os quais convivo, em algumas épocas, mais que com a minha família, o meu mais sincero agradecimento pela amizade e carinho de vocês. Muito obrigado por tudo.

Ao Fred, que mesmo distante, está sempre presente em nossas conversas e lembranças.

Ao Luf, que me acolheu no laboratório, e com paciência e discernimento, vem me mostrando os caminhos da Biologia Molecular. Saiba que tenho muita admiração e respeito por ti. Muito obrigado por ter aberto as portas do laboratório para mim.

Aos meus pais, Nanci e Mario, por toda educação que me deram, e principalmente, por toda ajuda nos momentos mais difíceis da minha vida. Vocês sabem que devo muito a vocês, e sempre que precisarem de qualquer coisa saibam que podem contar comigo.

Por último, tenho que agradecer aos meus filhos Beatriz e Henrique, e a minha esposa Patrícia, pela compreensão e paciência durante este período. Foi tudo por vocês meus amores.

## Resumo Geral

A aquicultura tem crescido significativamente nas últimas décadas devido ao aumento da demanda de pescado no mundo e à estagnação do setor pesqueiro. Porém, este crescimento depende do desenvolvimento de novos pacotes tecnológicos que visem o aumento da produtividade. Uma alternativa é a manipulação genética (transgenia), sendo que o hormônio do crescimento (GH) tem sido o principal alvo das pesquisas com peixes transgênicos. Entretanto, está comprovado que o excesso de GH acarreta uma série de efeitos adversos devido a sua ação pleiotrópica. A ativação do eixo somatotrófico de forma tecido-específica e independente do excesso de hormônio circulante pode contornar estes problemas. Neste contexto, o objetivo desta tese foi superexpressar o gene do receptor do GH (GHR) no tecido muscular esquelético do zebrafish (*Danio rerio*) e estudar os efeitos desta manipulação sobre os mecanismos envolvidos na regulação gênica do crescimento muscular. A linhagem transgênica estável obtida expressa o GHR especificamente no tecido muscular 100 vezes mais do que os não transgênicos. Estes transgênicos não apresentaram aumento significativo no crescimento, provavelmente devido à queda na expressão do fator de crescimento tipo insulina I (IGF-I). Esta queda foi, provavelmente, relacionada à ação dos principais moduladores da sinalização do GH (SOCS1 e 3), os quais apresentaram-se aumentados nos transgênicos. Ainda, foi observada uma queda na expressão das principais proteínas musculares estruturais (Acta1, myhc4 e mylz2), o que explica a ausência de hipertrofia nos transgênicos. Por outro lado, o aumento na expressão dos principais fatores reguladores miogênicos (myod, myf5 e myog) explica a hiperplasia observada nas análises histológicas. Para verificar como a superexpressão do GHR ativou a transcrição dos fatores reguladores miogênicos (MRFs) e, por consequência a hiperplasia, foram estudados os possíveis mecanismos envolvidos neste processo. Dentre estes, tanto a via proliferativa (MEK/ERK) quanto à via relacionada com a síntese protéica (PI3K/Akt), não tiveram alteração na expressão de seus genes. Entretanto, foi observado aumento na expressão das proteínas de transporte para o núcleo (importinas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  e  $\beta 1$ ), podendo-se concluir que a ativação dos MRFs está relacionada ao transporte do GHR para o núcleo das células musculares. Desta forma, pode se concluir que hiperplasia e hipertrofia seguem duas vias de sinalização intracelular distintas, ambas desencadeadas pelo GH, mas reguladas por mecanismos diferentes.

**Palavras-chave:** receptor do hormônio do crescimento, zebrafish, *Danio rerio*, importina, fatores reguladores miogênicos, proteína vermelho fluorescente.

## **Abstract**

Aquiculture practice has been significantly increasing during the last decades due to the fish rising demand and to fishery activity stagnation. However, such increase depends on new technological packages development aiming to productivity rises. Genetic manipulation is an alternative, once growth hormone (GH) has been the main target on transgenic fish researches. Nevertheless, it has been proved that GH excess leads to many adverse effects due to its pleiotropic action. The somatotropic axis activation in a tissue-specific manner and independent on the circulating hormone excess may bypass these problems. Following these ideas, the present thesis objective was overexpressing GH receptor's gene (GHR), in zebrafish (*Danio rerio*) skeletal muscular tissue, and studying such manipulation effects over the mechanisms involved in muscular growth gene regulation. The stable transgenic lineage obtained expresses GHR, specifically in muscular tissue, 100 times more than non-transgenic. These transgenic did not present significant growth, possibly due to a gene expression fall in insulin-like growth factor I (IGF-I). The mentioned fall is, probably, related to GH main signaling modulators (SOCS1 and 3) action, which were increased in transgenic. Also, a gene expression fall from the main structural muscle proteins (Acta1, myhc4 and mylz2) was observed, explaining the transgenic hypertrophy absence. However, the main myogenic regulatory factors (myod, myf5 and myog) expression rising explains the observed hyperplasia in histological analysis. Intending to verify how GHR overexpression has activated the myogenic regulatory factors (MRFs) transcription and, consequently, the hyperplasia, the mechanisms possibly involved in this process were studied. Among these, even the proliferative pathway (MEK/ERK) or the pathway related to protein synthesis (PI3K/Akt), did not presented gene expression altering. However, a gene expression rise in transporting proteins into nucleus (importins  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 3 and  $\beta$ 1) was observed, which may be understood as a correlation between MRFs activation and GHR transport into muscular cell's nucleus. Therefore, it may be understood that hyperplasia and hypertrophy follow two distinct intracellular signaling pathways, both triggered by GH, but regulated by different mechanisms. These data may be important for aquiculture new transgenic lineages development.

**Key words:** growth hormone receptor, zebrafish, *Danio rerio*, importin, myogenic regulatory factors, fluorescent red protein.

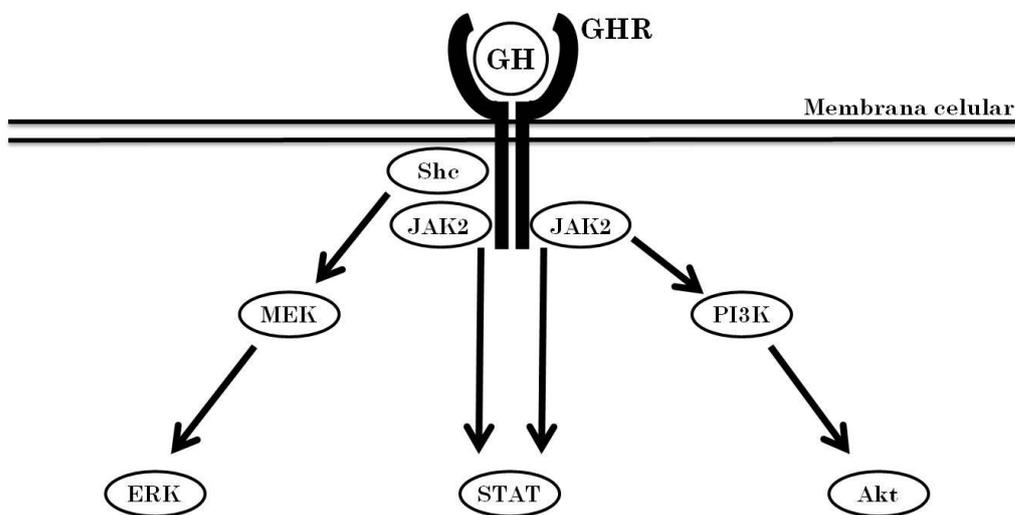
## **Introdução Geral**

O consumo mundial de organismos aquáticos tem crescido significativamente nas últimas décadas, devido ao crescimento da população e ao incentivo ao consumo. Segundo a FAO (2010), a produção mundial de pescado, incluindo a pesca e a aquicultura, atingiu o recorde de 142,3 milhões de toneladas em 2008, dos quais 115,1 milhões foram utilizados para o consumo humano. Deste total, 46% referem-se à produção da aquicultura. Sem dúvida, este é o setor da produção de alimentos de origem animal que mais cresce no mundo, numa tentativa de atender a crescente demanda global por pescado que, segundo a própria FAO, atingirá 183 milhões de toneladas no ano de 2015. Entretanto, a taxa de crescimento atual da aquicultura não será suficiente para evitar uma escassez de peixes e produtos derivados de pescado nos próximos anos, uma vez que a maioria das pescarias comerciais atingiu seu potencial máximo e existem poucas perspectivas de crescimento do setor pesqueiro (Delgado *et al.*, 2002). Neste sentido, fica evidente que o incremento da produção mundial de pescado depende, fundamentalmente, do crescimento da aquicultura. Entretanto, para que a aquicultura cresça em um ritmo mais acelerado, uma série de obstáculos precisa ser superada. Além dos fatores referentes à economia mundial e o preço do pescado, existe a necessidade do desenvolvimento de novos pacotes tecnológicos que incluam métodos de manejo de cultivo mais avançados, a utilização de espécies mais produtivas e, principalmente, novas aplicações biotecnológicas que permitirão uma maior produtividade e um menor impacto sobre os recursos hídricos disponíveis para esta atividade.

Os avanços na biotecnologia nas últimas décadas têm fornecido ferramentas importantes para a manipulação de genes e cromossomos em organismos vivos. O desenvolvimento de peixes transgênicos é um tema de grande interesse para a aquicultura devido ao potencial de melhoramento na produção que esta tecnologia pode oferecer (Zbikowska, 2003; Dunham, 2004). A transgênese envolve a transferência de uma característica de um organismo para outro pela introdução do gene correspondente que codifica tal característica. Desta forma, características novas, estáveis e determinadas geneticamente poderão ser incorporadas ao organismo receptor, com a possibilidade de serem transmitidas para a progênie. A tecnologia de transferência de genes já foi realizada com sucesso em mais de 35 espécies de peixes, com aplicações farmacológicas, industriais e para a aquicultura (Zbikowska, 2003; Rasmussen & Morrissey, 2007). Uma ampla 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 (Rasmussen & Morrissey, 2007).

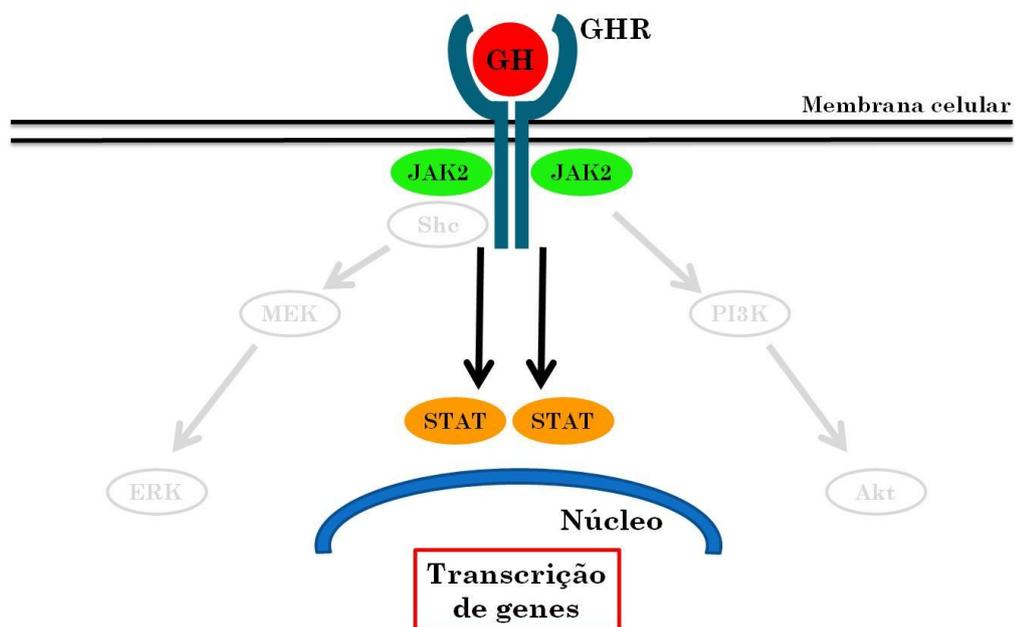
Entre as principais características importantes para a aquicultura, o crescimento tem sido um dos alvos mais frequentes da manipulação genética. O processo do crescimento se inicia através da síntese do hormônio do crescimento (GH) na hipófise, sendo este liberado na corrente sanguínea, onde irá atuar em determinados órgãos através da sua associação com receptores específicos (GHR) presentes na membrana das células alvo, ativando vias de sinalização intracelular que culminam com a transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento das respostas biológicas ao GH (Fig. 1). Entre estes, talvez os mais importantes sejam aqueles que codificam para os fatores de crescimento tipo-insulina - IGFs (Schindler & Darnel Jr., 1995; Ihle, 1996), que tem sua transcrição ativada pela via de sinalização JAK2/STAT (Fig. 2). Os IGFs são pequenas cadeias polipeptídicas produzidas principalmente no fígado, que exercem uma influência direta nos processos de crescimento e desenvolvimento animal (Yakar *et al.*, 1999). Desta forma, as respostas biológicas do GH são desenvolvidas e controladas principalmente pelo denominado eixo somatotrófico, onde o IGF-I é o principal mediador da ação fisiológica do GH (Moriyama *et al.*, 2000; Butler & Le Roith, 2001).



**Figura 1:** Vias de sinalização intracelular do hormônio do crescimento (GH).

Além desta, existem outras duas vias de sinalização intracelular que são ativadas pelo GH, funcionando como vias alternativas à principal JAK/STAT. A via PI3K/Akt leva ao aumento de massa muscular induzido pelo IGF-I (Rommel *et al.*, 2001; Singleton & Feldman, 2001). A ativação de PI3K leva à fosforilação de fosfolipídios na

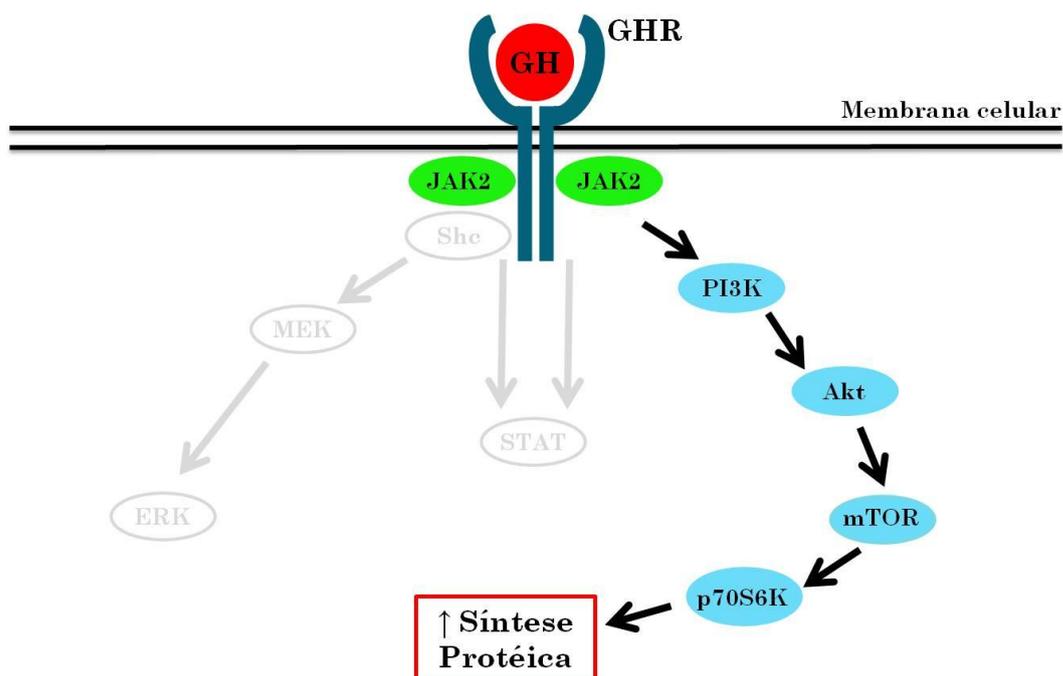
membrana celular, os quais recrutam e ativam a Akt (Coolican *et al.*, 1997). Uma vez ativada, a Akt atua fosforilando o mTOR (alvo mamífero da rapamicina) e a quinase p70S6K, o que acarreta em aumento de síntese protéica, hipertrofia e inibição de apoptose (Fig. 3) (Bodine *et al.*, 2001; Glass, 2003; 2005; Clemmons, 2009). A p70S6K atua fosforilando uma importante subunidade ribossomal que é necessária para a tradução de proteínas musculares (Clemmons, 2009). Já via MEK/ERK está presente como uma via alternativa de sinalização do GH bem como do IGF-I (Herrington & Carter-Su, 2001), estando relacionada ao processo proliferativo e de diferenciação celular (Coolican *et al.*, 1997; Clemmons, 2009). A ativação da via de sinalização MEK/ERK ocorre após a ligação do hormônio ao seu receptor, levando à fosforilação de tirosinas mediada por serina/treonina quinases como Shc, Raf e MAPK (Fig. 4) (Chiou *et al.*, 2007). Dentre estes fatores, as MAPK são cruciais para a regulação de importantes funções celulares em resposta a estímulos mitóticos (Seger & Krebs, 1995; Robinson & Cobb, 1997). Existem três classes de MAPK, sendo que foram analisadas no presente trabalho a MEK e a ERK.



**Figura 2:** Via de sinalização intracelular do hormônio do crescimento (GH) JAK/STAT.

Os primeiros estudos com a transferência do gene do GH apresentaram resultados bastante expressivos em termos de possibilidade de cultivo (Maclean & Talwar, 1984; Zhu *et al.*, 1985). Estes estudos pioneiros abriram um novo campo de pesquisa com potencial considerável no melhoramento genético para a aquicultura. Em

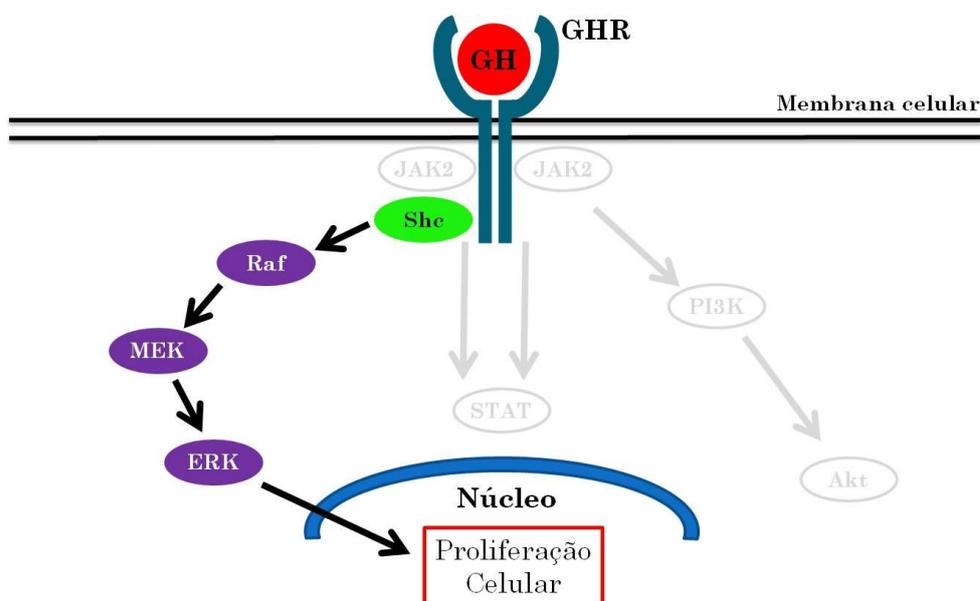
mais de uma dúzia de espécies de peixes o GH tem sido manipulado, sendo que os melhores resultados foram obtidos por Devlin *et al.* (1994) com salmão coho (*Oncorhynchus kisutch*) e por Nam *et al.* (2001) com *Misgurnus mizolepis*. Estes estudos apontaram um aumento no crescimento dos indivíduos transgênicos de até 11 vezes, em média, em relação aos controles não transgênicos. É provável que a manipulação genética do crescimento em peixes seja aplicada no futuro com o objetivo do aumento da produção da aquicultura comercial (Wu *et al.*, 2003), sendo que num futuro bem próximo peixes transgênicos podem ser liberados para o consumo humano (Marris, 2010). Entretanto, é importante salientar que não obstante o desenvolvimento da transgênese seja estratégico para qualquer país, mais estudos devem ser desenvolvidos sobre o bem-estar e comportamento dos peixes manipulados para o GH (Hallerman *et al.*, 2007) e também, sobre contenção genética dos transgênicos para evitar a sua introgressão em populações naturais (Wong *et al.*, 2008). Além disso, se faz necessárias ações de esclarecimento sobre transgênicos para se contornar a resistência da opinião pública sobre estes indivíduos (Hodgson, 2001).



**Figura 3:** Via de sinalização intracelular do hormônio do crescimento (GH) PI3K/Akt.

Embora a manipulação do gene do GH tenha mostrado resultados promissores com relação ao crescimento em peixes, o seu excesso pode acarretar em efeitos colaterais indesejados. É sabido que o GH atua em vários processos além do

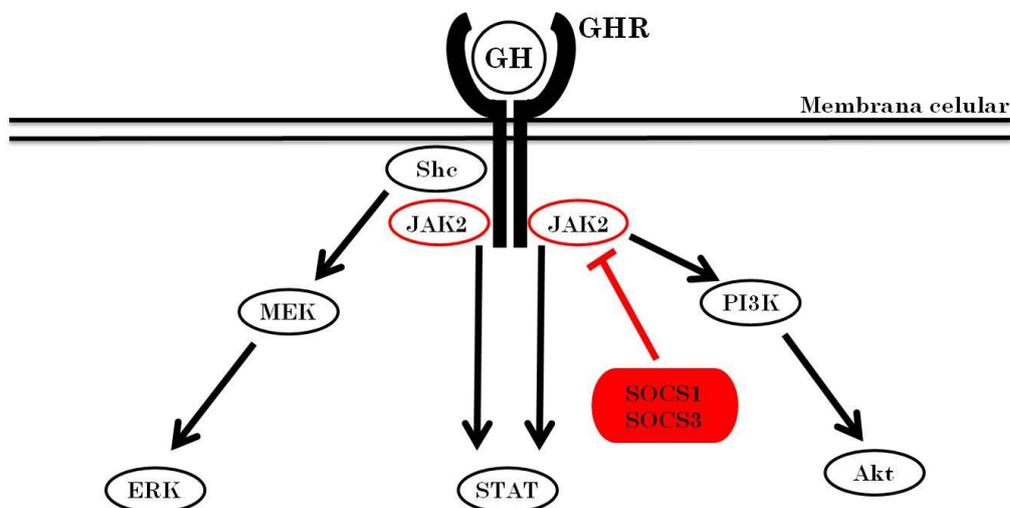
crescimento, produzindo efeitos pleiotrópicos sobre a morfologia, fisiologia, metabolismo, imunologia e comportamento (Devlin *et al.*, 2006). Portanto, é óbvio que a manutenção deste hormônio em níveis supra-fisiológicos pode acarretar numa série de efeitos indesejados sobre outros sistemas dentro do organismo. Mori *et al.* (2007) observaram alterações na expressão de genes do fígado, imunológicos, reprodutivos e relacionados ao crescimento em salmão amargo (*Oncorhynchus masou*). Como resultado da superexpressão do GH ou de sua administração, um aumento significativo nas taxas metabólicas e no consumo de oxigênio também foram observados no salmão do Atlântico (Cook *et al.*, 2000; Herbert *et al.*, 2001) e na tilápia (McKenzie *et al.*, 2000; 2003). Em camundongos foi comprovado que o excesso de GH produz uma redução na expectativa de vida (Bartke *et al.*, 2002).



**Figura 4:** Via de sinalização intracelular do hormônio do crescimento (GH) MEK/ERK.

Com o objetivo de estudar os efeitos colaterais do excesso de GH, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo de peixe transgênico (zebrafish - *Danio rerio*) que superexpressa o GH do peixe rei marinho (*Odonthestes argentinensis*), sendo a primeira linhagem de peixes transgênicos produzida no Brasil (Figueiredo *et al.*, 2007a). Esta linhagem, denominada F0104, já é reconhecida internacionalmente e integra o “The Zebrafish Model Organism Database” (ZFIN - <http://zfin.org>). Estudos com diferentes genótipos da linhagem F0104 reportam um aumento significativo na taxa de crescimento de indivíduos hemizigotos e, também, no nível de expressão dos genes do GHR e do IGF-I no fígado. Entretanto, para os homozigotos que expressam o dobro do

GH em relação aos hemizigotos, o crescimento não foi diferente dos controles não transgênicos, o que sugere um nível ótimo do hormônio em condições de alimentação controlada, sendo que o seu excesso não produz efeito sobre o crescimento (Figueiredo *et al.*, 2007b). Em estudos mais recentes com esta linhagem, Rosa *et al.* (2010) observaram envelhecimento acelerado, causado provavelmente pela diminuição das defesas antioxidantes, enquanto que Studzinski *et al.* (2009) demonstraram que a falta de crescimento proporcional ao GH produzido em indivíduos homozigotos pode estar relacionada com o custo energético da ativação de um mecanismo de regulação negativa do eixo somatotrófico baseado no aumento da expressão hepática de proteínas bloqueadoras da sinalização intracelular do GH, as SOCS (supressores da sinalização de citocinas). Estas proteínas atuam regulando a ativação das vias de sinalização intracelular JAK/STAT e PI3K/Akt (Fig. 5) (Himpe & Kooijman, 2009). Outros efeitos adversos da superexpressão do GH foram observados nos indivíduos desta linhagem, como aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo uma consequência do aumento do consumo de oxigênio e da taxa metabólica (Rosa *et al.*, 2008; 2011).



**Figura 5:** Ação regulatória das proteínas da família dos supressores da sinalização de citocinas, SOCS 1 e SOCS 3.

Todas estas informações apontam para uma série de efeitos fisiológicos colaterais causados pelo excesso de GH, os quais podem ter implicações importantes na aplicação desta tecnologia para aquicultura. Além disso, uma questão importante que ainda não foi esclarecida é a possibilidade do GH que está em excesso no peixe

transgênico exercer um efeito no consumidor da sua carne. Embora este hormônio seja uma proteína que poderia ser digerida no trato digestório, Liu *et al.* (2008) demonstraram que linguados (*Paralichthys olivaceus*) após serem alimentados com a cianobactéria *Synechocystis sp.* transgênica para o GH do próprio linguado, cresceram quase 50% a mais do que os controles. Outros experimentos com peixes demonstraram que o fornecimento via oral do GH resulta em um aumento significativo no crescimento (Tsai *et al.*, 1997, Jeh *et al.*, 1998). Estas observações apontam para a necessidade de uma alternativa para a aplicação da transgenia na aquicultura, de forma que o aumento no crescimento seja obtido sem efeitos colaterais negativos sobre o peixe e, também, sem qualquer risco para o consumidor final.

Uma alternativa para a manipulação do crescimento pode ser a aplicação da transgenia para aumentar os níveis de GHR em um tecido alvo, ao invés de aumentar os níveis do hormônio circulante. Este novo paradigma da manipulação genética traz duas possibilidades interessantes. Primeiro, o animal teria condições de regular os níveis de hormônio conforme suas necessidades momentâneas, possibilitando a utilização adequada da energia disponível. Isto é importante, pois no caso dos modelos transgênicos correntemente utilizados, o excesso de GH circulante não pode ser regulado pelo organismo, o que implica em um crescimento obrigatório, mesmo em condições desfavoráveis, acarretando em efeitos metabólicos indesejados. Em segundo lugar, a utilização de promotores (sequências regulatórias) tecido-específicos, pode direcionar o efeito do GH circulante para aqueles tecidos de maior interesse para o incremento da produtividade do organismo a ser cultivado. Dentre os tecidos, o músculo aparece como principal candidato para o desenvolvimento destes novos transgênicos. Um peixe transgênico com estas características poderia, em tese, regular os seus níveis de GH circulante de forma a manter seu equilíbrio metabólico sem originar os efeitos colaterais negativos e, ao mesmo tempo, maximizar a utilização do hormônio circulante produzido naturalmente no tecido-alvo através de um aumento na quantidade de receptores nas membranas celulares. Neste exemplo, o resultado esperado seria um peixe com maior quantidade de tecido muscular, porém com os níveis normais de GH ou IGF-I circulante.

A manipulação genética em receptores de GH não é novidade em mamíferos. Isto já foi obtido em camundongos, nos quais o GHR foi nocauteado e obteve-se uma linhagem resistente ao GH a qual mostrou uma maior longevidade em relação aos animais controle (Zhou *et al.*, 1997). Recentemente, Ishtiaq Ahmed *et al.* (2011)

observaram crescimento acelerado em zebrafish transgênico superexpressando GHR ativado constitutivamente devido a introdução de zíperes de leucina na estrutura da molécula. Porém, estes autores utilizaram uma construção direcionada pelo promotor CMV, o qual levou à expressão do GHR em todos os tecidos. É provável que a criação de um modelo de peixe transgênico superexpressando o GHR somente no tecido muscular esquelético, produza IGF-I com ação parácrina e autócrina e não afete os níveis de IGF-I circulante normalmente produzido pelo fígado. Estes animais representariam um novo modelo de hipersensibilidade tecido-específica ao hormônio, com a possibilidade de não apresentar os efeitos adversos decorrentes do excesso de GH circulante.

No caso de uma linhagem transgênica superexpressando o GHR em tecido muscular, os fatores miogênicos seriam bons marcadores para avaliar o efeito da transgenia neste modelo. O crescimento da musculatura esquelética em peixes se faz pela proliferação e diferenciação das células progenitoras miogênicas, também conhecidas como mioblastos adultos ou células mio-satélites, responsáveis pelo crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Rowlerson & Veggetti, 2001; Johansen & Overturf, 2005, Johnston *et al.*, 2011). A hiperplasia e a hipertrofia são reguladas pelos fatores reguladores miogênicos (MRFs) MyoD, Myf5, miogenina, e MRF4 (Watabe, 1999; 2001). Os MRFs possuem um domínio central conservado conhecido como E-box, o qual é importante para que os MRFs reconheçam uma sequência no DNA presente na região promotora da maioria dos genes músculo-específicos (Lassar *et al.*, 1989; Murre *et al.*, 1989; Blackwell & Weintraub, 1990). Kuradomi *et al.* (2011) trabalhando com animais hemizigotos da linhagem F0104 demonstraram que a hipertrofia observada nos transgênicos é independente da ação do IGF-I muscular e pode estar relacionada com a miogenina, sugerindo um efeito direto do GH circulante sobre o desenvolvimento muscular e expressão de fatores miogênicos.

Portanto, o objetivo desta tese foi superexpressar o gene do GHR no tecido muscular esquelético do zebrafish e estudar os efeitos desta manipulação sobre os mecanismos envolvidos na regulação gênica do crescimento muscular. No primeiro capítulo foi produzida a linhagem estável, denominada MYO-GHR, e realizados os experimentos de crescimento, análise histológica do tecido muscular esquelético e análises de expressão de genes. No segundo capítulo foi estudado como a superexpressão do GHR ativou a expressão dos MRFs, através de análise de expressão de genes de proteínas que poderiam estar relacionadas a este processo. Como modelo

experimental para este trabalho foi escolhido o zebrafish (Fig. 6), por este apresentar uma série de características que o torna especialmente adequado para estudos genéticos, como baixo custo de manutenção, pequeno espaço exigido, rápido ciclo de gerações (dois a três meses), grande número de descendentes, estágios de desenvolvimento bem caracterizados e ovos com córion relativamente fino e translúcido, sendo adequados para os procedimentos de manipulação e microinjeção (Udvardia & Linney, 2003). Ainda, o zebrafish tem sido citado como um excelente modelo genético com possibilidade de extrapolação dos resultados obtidos para espécies comercialmente importantes na aquicultura (Dahn & Geisler, 2006). Cabe ressaltar que o genoma completo do zebrafish já foi sequenciado e encontra-se disponível no Banco Mundial de Genes (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o que facilita sobremaneira os estudos envolvendo a manipulação genética.



**Figura 6:** Modelo experimental utilizado na presente tese, zebrafish (*Danio rerio*).

### **Objetivo Geral**

Superexpressar o gene do GHR no tecido muscular esquelético do zebrafish e estudar os efeitos desta manipulação sobre os mecanismos envolvidos na regulação gênica do crescimento muscular.

## Referências

- Bartke, A., Chandrashekar, V., Bailey, B., Zaczek, D., Turyn, D., 2002. Consequences of growth hormone (GH) overexpression and GH resistance. *Neuropeptides* 36, 201-208.
- Blackwell, T., Weintraub, H., 1990. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250, 1104-1110.
- Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., Yancopoulos, G.D., 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo*. *Nat. Cell Biol.* 3, 1014-1019.
- Butler, A.A., Le Roith, D.L., 2001. Control of growth by the somatotrophic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 141-164.
- Chiou, M.-J., Wang, Y.-D., Kuo, C.-M., Chen, J.-C., Chen, J.-Y., 2007. Functional analysis of mitogen-activated protein kinase-3 (MAPK3) and its regulation of the promoter region in zebrafish. *DNA Cell Biol.* 26(11), 781-790.
- Clemmons, D.R., 2009. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol. Metab.* 20(7), 349-356.
- Cook, J.T., McNiven, M.A., Richardson, G.F., Sutterlin, A.M., 2000. Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 188, 15-32.
- Coolican, S.A., Samuel, D.S., Ewton, D.Z., McWade, F.J., Florini, J.R., 1997. The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 272(10), 6653-6662.
- Dahm, R., Geisler, R., 2006. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar. Biotechnol.* 8, 329-345.
- Delgado, C., Rosegrant, M., Meijer, S., Wada, N., Ahmed, M., 2002. Fish as food: projections to 2020. The Biennial Meeting of International Institute for Fisheries Economics and Trade (IIFET), Wellington, New Zealand.
- 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.

- Devlin, R.H., Sundstrom, L.F., Muir, W.M., 2006. Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. **Trends Biotechnol.** 24, 89-97.
- Dunham, R.A., 2004. Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches. Cambridge, Mass.: CABI Publishing p 372.
- FAO, 2010. The state of the world fisheries and aquaculture (SOFIA). FAO, Rome. Available from: <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e00.htm>.
- Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Marins, L.F.F., 2007a. Improving the production of transgenic fish germline: *in vivo* mosaicism evaluation by GFP transgene co-injection strategy. *Genet. Mol. Biol.* 30, 31-36.
- Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Proietti, M.C., Marins, L.F., 2007b. The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 2, 228-233.
- Glass, D.J., 2003. Signaling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell Biol.* 5, 87-90.
- Glass, D.J., 2005. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1974-1984.
- Hallerman, E.M., McLean, E., Fleming, I.A., 2007. Effects of growth hormone transgenes on the behavior and welfare of aquacultured fishes: a review identifying research needs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 104, 265-294.
- Herbert, N.A., Armstrong, J.D., Björnsson, B.T., 2001. Evidence that growth hormone-induced elevation in routine metabolism of juvenile Atlantic salmon is a result of increased spontaneous activity. *J. Fish Biol.* 59, 754-757.
- Herrington, J., Carter-Su, C., 2001. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* 12(6), 252-257.
- Himpe, E., Kooijman, R., 2009. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors.* 35(1), 76-81.
- Hodgson, E., 2001. Genetically modified plants and human health risks: can additional research reduce uncertainties and increase public confidence? *Toxicol. Sci.* 63, 153-156.
- Ihle, J.N., 1996. STATs: Signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84, 331-334.

- Ishtiaq Ahmed A.S., Xiong F., Pang S.-C., He M.-D., Waters M.J., Zhu Z.-Y., Sun Y.-H., 2011. Activation of GH signaling and GH-independent stimulation of growth in zebrafish by introduction of a constitutively activated GHR construct. *Transgenic Res.* 20, 557-567.
- Jeh, H.S., Kim, C.H., Lee, H.K., Han, K., 1998. Recombinant flounder growth hormone from *Escherichia coli*: overexpression, efficient recovery, and growth-promoting effect on juvenile flounder by oral administration. *J. Biotechnol.* 60, 183-193.
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol.* 7, 576-587.
- Johnston, I.A., Bower, N.I., Macqueen, D.J., 2011. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *J. Exp. Biol.* 214, 1617-1628.
- Kuradomi, R.Y., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Rosa, C.E., Almeida, D.V., Maggioni, R., Silva, M.D.P., Marins, L.F., 2011. GH overexpression causes muscle hypertrophy independent from local IGF-I in a zebrafish transgenic model. *Transgenic Res.* 20, 513-521.
- Lassar, A., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D., Weintraub, H., 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58, 823-831.
- Liu, S., Zhang, X., Zang, X., Liu, B., Arunakumara, K.K.I.U., Xu, D., Zhang, X., 2008. Growth, feed efficiency, body muscle composition, and histology of flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed GH transgenic *Synechocystis*. *Aquaculture* 277, 78-82.
- Maclean, N., Talwar, S., 1984. Injection of cloned genes into rainbow trout eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 82, suppl. 136.
- Marris E., 2010. Transgenic fish go large. *Nature* 467, 259.
- McKenzie, D.J., Martinez, I.R., Morales, A., Acosta, J., Taylor, E.W., Steffensen, J.F., Estrada, M.P., 2000. Metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance of growth hormone transgenic tilapia (*Oreochromis sp.*). *Comp. Biochem. Physiol.* 126, S66.
- McKenzie, D.J., Martínez, R., Morales, A., Acosta, J., Morales, R., Taylor, E.W., Steffensen, J.F., Estrada, M.P., 2003. Effects of growth hormone transgenesis on

- metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance in tilapia hybrids. *J. Fish Biol.* 63, 398-409.
- Mori, T., Hiraka, I., Kurata, Y., Kawachi, H., Mano, N., Devlin, R.H., Nagoya, H., Araki, K., 2007. Changes in hepatic gene expression related to innate immunity, growth and iron metabolism in GH-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou*) by cDNA subtraction and microarray analysis, and serum lysozyme activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151, 42-54.
- Moriyama, S., Ayson, F.G., Kawauchi, H., 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64, 1553-1562.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
- 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.
- Rasmussen, R.S., Morrissey, M.T., 2007. Biotechnology in aquaculture: transgenics and polyploidy. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 6, 2-16.
- Robinson, M.J., Cobb, M.H., 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180-186.
- Rommel, C., Bodine, S.C., Clarke, B.A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J., 2001. Mediator of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat. Cell Biol.* 3, 1009-1013.
- Rosa, C.E., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Monserrat, J.M., Marins, L.F., 2008. Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 149, 209-214.
- Rosa, C.E., Kuradomi, R.Y., Almeida, D.V., Lanes, C.F.C., Figueiredo, M.A., Dytz, A.G., Fonseca, D.B., Marins, L.F., 2010. GH overexpression modifies muscle expression of anti-oxidant enzymes and increases spinal curvature of old zebrafish. *Exp. Gerontol.* 45, 449-456.
- Rosa, C.E., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Marins, L.F., 2011. Genotype-dependent gene expression profile of the antioxidant defense system

- (ADS) in the liver of a GH-transgenic zebrafish model. *Transgenic Res.* 20, 85-89.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: *Muscle Development and Growth*. (Ed. Johnston, I.A.), pp. 103-140. London: Academic Press.
- Schindler, C., Darnell Jr, J.E., 1995. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 621-651.
- Seger, R., Krebs, E.G., 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9, 726-735.
- Singleton, J.R., Feldman, E.L., 2001. Insulin-like growth factor-I in muscle metabolism and myotherapies. *Neurobiol. Dis.* 8, 541-554.
- Studzinski, A.L., Almeida, D.V., Lanes, C.F., Figueiredo, M.A., Marins, L.F., 2009. SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the somatotrophic axis in liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 67-72.
- Tsai, H.-J., Hsieh, M.-H., Kuo, J.-C., 1997. *Escherichia coli*-produced fish growth hormone as a feed additive to enhance the growth of juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *J. Appl. Ichthyol.* 13, 79-82.
- Udvardi, A.J., Linney, E., 2003. Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* 256, 1-17.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.* 55, 1-18.
- Watabe, S., 2001. Myogenic regulatory factors. In: *Muscle Development and Growth*. (Ed. Johnston, I.A.), pp. 19-41. London Academic Press.
- Wong, A.C., Van Eenennaam, A.L., 2008. Transgenic approaches for the reproductive containment of genetically engineered fish. *Aquaculture* 275, 1-12.
- Wu, G., Sun, Y., Zhu, Z., 2003. Growth hormone gene transfer in common carp. *Aquat. Living Resour.* 16, 416-20.
- Yakar, S., Liu, J., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., Le Roith, D., 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7324-7329.
- Zbikowska, H.M., 2003. Fish can be first – advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Res.* 12, 379-389.
- Zhou, Y., Xu, B.C., Maheshwari, H.G., He, L., Reed, M., Lozykowski, M., Okada, S., Cataldo, L., Coschigano, K., Wagner, T.E., Baumann, G., Kopchick, J.J., 1997. A

mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor binding protein gene (the Laron mouse). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 13215-13220.

Zhu, Z., Li, G., He, L., Chen, S., 1985. Novel gene transfer into the fertilised eggs of goldfish (*Carassius auratus*). J. Appl. Ichthyol. 1, 32-34.

## **Capítulo I**

**Superexpressão músculo-específica do receptor do hormônio do crescimento (GHR) induz hiperplasia, mas não hipertrofia em zebrafish transgênico**

**Co-autores: Edson A. Mareco, Maeli Dal Pai Silva, Luis Fernando Marins.**

**Publicado na revista "Transgenic Research"**

**Superexpressão músculo-específica do receptor do hormônio do crescimento  
(GHR) induz hiperplasia, mas não hipertrofia em zebrafish transgênico**

**Marcio Azevedo Figueiredo<sup>1</sup>, Edson A. Mareco<sup>2</sup>, Maeli Dal Pai Silva<sup>2</sup>, Luis  
Fernando Marins<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

## **Resumo**

Apesar da transgênese para o hormônio do crescimento (GH) ter demonstrado potencial para aumentar o crescimento de espécies comercialmente importantes, o excesso de hormônio pode resultar em efeitos colaterais indesejados. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo modelo de zebrafish (*Danio rerio*) geneticamente modificado, caracterizado por uma superexpressão músculo-específica do gene do receptor do hormônio do crescimento (GHR), avaliando o efeito da transgênese sobre o crescimento, a estrutura muscular e a expressão de genes relacionados com o crescimento. Zebrafish transgênicos superexpressando GHR no músculo esquelético não revelaram diferença significativa no peso total em relação aos não-transgênicos. Isto pode ser explicado por uma redução significativa na expressão de genes relacionados ao eixo somatotrófico, em especial do fator de crescimento tipo insulina I (IGF-I). No mesmo sentido, um aumento significativo na expressão dos supressores da sinalização de citoquinas 1 e 3 (SOCS) foi encontrado em transgênicos. Surpreendentemente, a expressão dos genes que codificam os principais fatores reguladores mio gênicos (MRFs) foi maior nos zebrafish transgênicos do que nos não-transgênicos. Genes que codificam para proteínas musculares não seguiram o perfil dos MRFs, mostrando uma diminuição significativa em suas expressões. Estes resultados foram corroborados pela análise histológica, onde um crescimento muscular hiperplásico foi observado em transgênicos. Em conclusão, nossos resultados demonstraram que a superexpressão do GHR não induz crescimento muscular hipertrófico em zebrafish transgênicos provavelmente devido ao controle das SOCS sobre o eixo GHR/IGF-I, culminando em diminuição na expressão do IGF-I e das proteínas musculares. Portanto, parece que a hipertrofia e hiperplasia seguem dois caminhos distintos para o crescimento muscular completo, ambos desencadeados pela ativação do GHR, mas regulados por mecanismos diferentes.

## **Palavras-chave**

Zebrafish transgênico; Receptor do hormônio do crescimento; Fator de crescimento tipo insulina I; Supressores da sinalização de citoquinas; Hiperplasia; Músculo esquelético

## **Abstract**

Even though growth hormone (GH) transgenesis has demonstrated potential for improved growth of commercially important species, the hormone excess may result in undesired collateral effects. In this context, the aim of this work was to develop a new model of genetically modified zebrafish (*Danio rerio*) characterized by a muscle-specific overexpression of the growth hormone receptor (GHR) gene, evaluating the effect of transgenesis on growth, muscle structure and expression of growth-related genes. Transgenic zebrafish overexpressing GHR in skeletal muscle revealed no significant difference in total weight in comparison to non-transgenics. This can be explained by a significant reduction in expression of genes related to the somatotrophic axis, in special insulin-like growth factor I (IGF-I). In the same sense, a significant increase in expression of the suppressors of cytokine signaling 1 and 3 (SOCS) was encountered in transgenics. Surprisingly, expression of genes coding for the main myogenic regulatory factors (MRFs) was higher in transgenic than non-transgenic zebrafish. Genes coding for muscle proteins did not follow the MRFs profile, showing a significant decrease in their expression. These results were corroborated by the histological analysis, where a hyperplasic muscle growth was observed in transgenics. In conclusion, our results demonstrated that GHR overexpression does not induce hypertrophic muscle growth in transgenic zebrafish probably because of SOCS impairment of the GHR/IGF-I pathway, culminating in IGF-I and muscle proteins decrease. Therefore, it seems that hypertrophy and hyperplasia follow two different routes for entire muscle growth, both of them triggered by GHR activation, but regulated by different mechanisms.

## **Key words**

Transgenic zebrafish; Growth hormone receptor; Insulin-like growth factor I; Suppressors of cytokine signaling; Hyperplasia; Skeletal muscle.

## Introdução

Os avanços na biotecnologia nas últimas décadas têm fornecido ferramentas importantes para a manipulação de genes e cromossomos em organismos vivos. O desenvolvimento de peixes transgênicos é um tema de grande interesse para a aquicultura devido ao potencial de melhoramento na produção que esta tecnologia pode oferecer (Zbikowska 2003; Dunham 2004). O gene do hormônio do crescimento (GH) tem sido manipulado de forma a aumentar a concentração plasmática do hormônio, induzindo a um aumento no desempenho do crescimento de espécies de peixes comercialmente importantes. De fato, a expressão em nível aumentado deste gene tem levado a resultados expressivos como reportado por Devlin et al. (1994) para o salmão coho (*Oncorhynchus kisutch*), Pitkänen et al. (1999) para o *Salvelinus alpinus* e por Nam et al. (2001) para *Misgurnus mizolepis*. Estes estudos mostraram que níveis supra-fisiológicos do GH podem ser obtidos pela manipulação genética, levando a um incremento significativo nas taxas de crescimento através de um aumento na sinalização intracelular do eixo somatotrófico com seus consequentes efeitos biológicos.

O GH é um hormônio polipeptídeo adenohipofisário que, além do estímulo ao crescimento somático, também está implicado em outros mecanismos fisiológicos em peixes, tais como a mobilização de energia, desenvolvimento gonadal, osmorregulação, apetite, comportamento social, morfologia, e imunologia (Björnsson et al. 2002; Devlin et al. 2006; Canosa et al. 2007). O GH livre na corrente sanguínea pode se ligar a receptores presentes nas membranas de determinadas células, promovendo uma sinalização intracelular constituída por uma série de reações de fosforilação em cascata que efetivam o eixo somatotrófico. Os receptores de membrana que reconhecem o GH, denominados GHR, são membros da família de receptores de citoquinas tipo I (Butler e Le Roith 2001; Waters et al. 2006) que, quando complexados ao hormônio, induzem à fosforilação de enzimas da família Janus kinase (JAK) normalmente associadas à porção intracelular do receptor (Argetsinger et al. 1993; VanderKuur et al. 1994, 1995). Uma vez ativadas, as JAKs fosforilam regiões intracelulares específicas do receptor que funcionam como sítios de ancoragem para fatores de transcrição citoplasmáticos da família das STATs (sinais de tradução e ativadores de transcrição). As STATs, quando fosforiladas, formam dímeros e se translocam para o núcleo ativando a transcrição de genes específicos envolvidos nas respostas biológicas ao GH.

Toda esta via de sinalização desencadeada pelo GH pode ser controlada de diversas maneiras. É necessário manter o hormônio em níveis adequados ou até mesmo

ausente em algumas situações fisiológicas ou metabólicas específicas. A forma mais reconhecida de controle dos níveis de GH circulante está no mecanismo de retroalimentação negativa que o próprio GH e o IGF-I (fator de crescimento tipo insulina I) exercem sobre a secreção do hormônio pela adenohipófise (Björnsson et al. 2002). Isto é importante devido ao fato do GH ter um amplo espectro de atuação sobre diversos mecanismos fisiológicos e seu excesso pode causar efeitos colaterais adversos ao organismo (Devlin et al. 2004).

A forma com que o GH escolhe suas células-alvo também pode ser considerada como um mecanismo de regulação. Sabe-se que as células-alvo são aquelas que apresentam moléculas de GHR disponíveis em suas membranas. Desta forma, se as células têm capacidade de controlar a expressão de seus receptores, elas também podem controlar os níveis de sinalização intracelular de forma independente das concentrações de GH circulante. De fato, os níveis de GHR parecem variar de forma antagônica ao do GH, compensando a sinalização e até mesmo bloqueando a atuação do hormônio em alguns tecidos através de um fenômeno de resistência (Bartke et al. 2002; Figueiredo et al. 2007a).

Os níveis de GH circulante e a quantidade de receptores presentes na membrana das células-alvo são determinantes para o controle da sinalização intracelular. Entretanto, as células dispõem de mecanismos adicionais que podem auxiliar neste processo. Recentemente, a função de controle da sinalização intracelular do GH tem sido atribuída às proteínas da família SOCS (supressores da sinalização de citocinas) (Croker et al. 2008). Estas proteínas podem se ligar aos receptores ou às JAKs impedindo a fosforilação das STATs (Baker et al. 2009) e, conseqüentemente, a sinalização intracelular promovida pelo GH presente na corrente sanguínea.

Quando o eixo somatotrófico não está bloqueado e o GH encontra-se disponível na corrente sanguínea, a sinalização intracelular nas células-alvo culmina com a ativação de uma série de genes relacionados ao crescimento. Entre estes, encontra-se o IGF-I, o qual é considerado como o principal efetor indireto do GH na promoção do crescimento e diferenciação de tecidos (Daughaday 2000; Butler e Le Roith 2001). Embora o IGF-I seja produzido em vários tipos celulares que são alvos para o GH, seu maior sítio de produção é o fígado e a partir daí é exportado para a corrente sanguínea tornando-se, ele próprio, um agente complementar importante para o crescimento somático (Sjögren et al. 2002; Janssen 2009).

Além do fígado, um dos principais alvos do GH circulante é o tecido muscular. Em se tratando de cultivo de peixes, este tecido tem fundamental importância, pois representa, em geral, o produto final a ser comercializado. Sabe-se que o crescimento da musculatura esquelética em peixes se faz pela proliferação e diferenciação das células progenitoras miogênicas, também conhecidas como mioblastos adultos ou células mio-satélites. Estes são responsáveis pelo crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Koumans e Akster 1995; Johansen e Overturf 2005). A hiperplasia e a hipertrofia são reguladas por fatores reguladores miogênicos (MRFs) que incluem myod, miogenina (myog) e myf5 (Watabe 1999; 2001). Os MRFs reconhecem sequências nucleotídicas específicas no DNA que estão presentes nas regiões promotoras da maioria dos genes músculo-específicos, influenciando sua transcrição (Lassar et al. 1989; Murre et al. 1989; Blackwell e Weintraub 1990).

O avanço no conhecimento sobre os mecanismos de sinalização e regulação do GH permite deduzir que o seu excesso pode acarretar em efeitos colaterais indesejados. O próprio desenvolvimento de vários mecanismos de controle da sinalização intracelular deste hormônio pelos organismos constitui-se em evidência de que o controle rigoroso de seus níveis é absolutamente necessário. Desta forma, parece óbvio que a manutenção deste hormônio em níveis supra-fisiológicos através da manipulação genética pode acarretar numa série de alterações metabólicas com resultados imprevisíveis sobre outros sistemas fisiológicos em que o GH tem ação reconhecida (Devlin et al. 2006). Mori et al. (2007) observaram alterações na expressão de genes do fígado, imunológicos, reprodutivos e relacionados ao crescimento, em salmão amargo (*Oncorhynchus masou*). Como resultado da superexpressão do GH ou de sua administração, um aumento significativo nas taxas metabólicas e no consumo de oxigênio também foram observados no salmão do Atlântico (Cook et al. 2000; Herbert et al. 2001), na tilápia (McKenzie et al. 2000; 2003) e no zebrafish (Rosa et al. 2008; 2011).

Uma alternativa possível para a manipulação do crescimento pode ser a aplicação da transgenia para aumentar os níveis de GHR em um tecido alvo, ao invés de aumentar os níveis do hormônio circulante. Este novo paradigma da manipulação genética traz duas possibilidades interessantes. Primeiro, o animal terá condições de regular os níveis de hormônio conforme suas necessidades momentâneas, possibilitando a utilização adequada da energia disponível. Em segundo lugar, a utilização de promotores tecido-específicos, pode direcionar o efeito do GH circulante para aqueles

tecidos de maior interesse para o incremento da produtividade do organismo a ser cultivado. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo modelo de peixe geneticamente modificado que se caracteriza por uma superexpressão músculo-específica do gene do GHR, avaliando o efeito da transgenia sobre o crescimento, estrutura muscular e expressão de genes relacionados ao crescimento. Como modelo experimental para este trabalho foi utilizado o zebrafish, o qual tem sido citado como um modelo genético com possibilidade de extrapolação dos resultados obtidos para espécies comercialmente importantes na aquicultura (Dahn e Geisler 2006).

## **Material e Métodos**

### **Produção das construções genéticas**

Para a produção dos peixes transgênicos foram utilizadas duas construções genéticas co-injetadas em ovos recém-fertilizados no estágio de uma célula. Estas construções tiveram como base o plasmídeo comercial pDsRed-Express-DR (Clontech Laboratories, Inc.), que codifica uma variante desestabilizada da proteína vermelha fluorescente de *Discosoma sp.* (DsRed), e permite a inserção de promotores para direcionar a sua expressão. Foi utilizado um fragmento de 2.582 pares de bases do promotor da miosina de cadeia leve 2 (*myl2*) do zebrafish, o qual foi amplificado através de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers MYO-FOR (5'-CGAATTCGGATATTTTCAAAGCCAATCG-3') e MYO-REV (5'-CGGATCCGTCGAGACGGTATGTGTGAAG-3'). Para o isolamento do gene do GHR, PCR por transcrição reversa (RT-PCR) foram realizadas com os primers zfGHR2-FOR (5'-CGGATCCATGGCTCACTCGCTCTCTCTCGA-3') e zfGHR3-REV (5'-GCGGCCGCAGCTTTTAATAGTCCCCTCATGG-3'). Ambas PCRs foram realizadas em reações de 25 µL contendo um volume de 2,5 µL de 10× PCR buffer, 0,2 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 unidades de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brasil) e 1 µL de solução de DNA. As reações foram incubadas a 94 °C por 1 min, seguida por 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 57 °C e 2,5 min a 72 °C, com um passo de extensão final de 10 min a 72 °C. Os fragmentos foram purificados do gel de agarose através do kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Brasil), conforme recomendação do fabricante.

O fragmento do promotor da *myl2* foi inserido no plasmídeo pDsRed-Express-DR através do acréscimo, em suas extremidades 5' e 3', de sítios de restrição para as endonucleases de restrição *EcoR* I e *BamH* I, respectivamente, produzindo a construção denominada pMYO-Red (Fig. 1c). Para a substituição da DsRed pelo cDNA do GHR, foi inserido, nas extremidades 5' e 3' deste último, os sítios de restrição para as endonucleases de restrição *BamH* I e *Not* I, respectivamente, sendo obtida a construção pMYO-GHR (Fig. 1b). Para a linearização das construções, os primers MCS-FOR (5'-GACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTT-3') e Bgl II-PA (5'-CAGATCTTGAGTTTGGACAAACCACAAC-3') foram utilizados. A PCR foi realizada em reações de 25 µL conforme descrito anteriormente. As reações foram incubadas a 94 °C por 1 min, seguida por 37 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 60 °C e 4 min a 72 °C, com um passo de extensão final de 10 min a 72 °C. Os fragmentos foram purificados do gel, conforme descrito anteriormente. Após este processo, as construções foram denominadas de MYO-RED e MYO-GHR.

### **Manutenção dos peixes e produção dos transgênicos**

Os peixes foram cultivados em um sistema de cultivo de circulação de água fechada de acordo com Westerfield (1995). Aproximadamente 500 embriões no estágio de uma célula foram microinjetados seguindo o protocolo geral recomendado por Vielkind (1992) utilizando um picoinjetor motorizado IM-30 (Narishige, Japão) para injetar aproximadamente 300 pL de solução de DNA, representando um número final de 10<sup>6</sup> cópias de cada transgene por embrião. Embriões microinjetados foram incubados a 28 °C até a eclosão, quando foram analisados em microscópio de epifluorescência (excitação = 557 nm; emissão = 579 nm). Larvas foram classificados através dos padrões de expressão da DsRed, conforme Figueiredo et al. (2007a).

Aproximadamente 50 larvas F0 DsRed positivas foram obtidas, mas somente quatro indivíduos com expressão forte de DsRed foram cultivadas até a maturidade e reproduzidas separadamente com peixes não transgênicos (tipo selvagem). Para confirmar a presença da construção MYO-GHR nos peixes da F1, um pequeno pedaço da nadadeira caudal dos peixes positivos para a DsRed foi retirado para a extração do DNA genômico (Sambrook et al. 1989). O gene MYO-GHR foi amplificado por PCR utilizando os primers zfGHR2-FOR e Bgl II-PA e os primers MYO-FOR e zfGHR3-REV, como descrito anteriormente. As PCRs foram realizadas em reações de 12,5 µL

contendo um volume de 1,25  $\mu$ L de 10 $\times$  PCR buffer, 0,2  $\mu$ M de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP, 0,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 unidade de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Brasil) e 0,5  $\mu$ L de solução de DNA. As reações foram incubadas a 94 °C por 1 min, seguida por 33 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 60 °C e 2 min a 72 °C, com um passo de extensão final de 10 min a 72 °C. Após, os peixes F1 foram individualizados e reproduzidos com animais não transgênicos. Cinco larvas positivas para DsRed e cinco negativas (F2), filhas de cada um dos peixes reproduzidos, foram sacrificadas e o DNA genômico extraído. Este DNA foi utilizado como molde para amplificação por PCR do transgene MYO-GHR, utilizando os primers zfGHR2-FOR e Bgl II-PA, para verificação da presença deste.

### **Análise de crescimento**

Peixes transgênicos e seus irmãos não transgênicos da F2 foram cultivados até três meses de idade em um sistema de circulação de água fechado composto de aquários com capacidade de 15 L. Foram utilizados 18 peixes de cada grupo. A qualidade da água foi monitorada uma vez ao dia, e temperatura, pH, compostos nitrogenados e fotoperíodo foram mantidos de acordo com os requerimentos para o zebrafish (Westerfield 1995). Os peixes foram alimentados com ração comercial com alto nível protéico (47,5%) duas vezes ao dia, até a saciedade aparente. Aos 45, 60, 75 e 90 dias os peixes foram anestesiados (Tricaína, 0,1 mg/mL) para a realização das biometrias. Infelizmente, os dados de 75 dias foram perdidos e o peso não pode ser analisado neste ponto.

### **Expressão gênica**

Para a análise de expressão de genes foram utilizados animais transgênicos e não transgênicos irmãos com 45 dias de vida. Para a expressão do GH foi extraído o RNA total da hipófise, e para a análise dos demais genes foi utilizado o músculo, usando TRIzol reagent (Invitrogen, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi tratado com DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Brasil), conforme recomendações do fabricante, e utilizado como molde para a síntese de cDNA através do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante.

A expressão foi analisada quantitativamente através de Real Time PCR quantitativa (qPCR). Cada amostra (n = 5) foi analisada em triplicata. Primers específicos para cada gene (Tabela 1) foram desenhados no software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Brasil), a partir de sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As reações de qPCR foram realizadas no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Brasil) utilizando o kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Brasil). Diluições seriadas foram feitas para todos os primers para determinar a eficiência de reação em qPCR. As condições para as PCRs foram 50 °C/2 min, 95 °C/2 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C/15 s e 60 °C/30 s. A expressão dos genes alvos foi normalizada pela expressão do gene do fator de alongação 1 alpha (ef1 $\alpha$ ), o qual não mostrou diferenças significativas entre os grupos experimentais (dados não mostrados). Vale ressaltar, que para diferenciar a expressão do GHR endógeno e exógeno nos animais transgênicos foram desenhados dois pares de primers para este gene, um que amplifica na região não codificante 3' (chamado neste trabalho de GHRa) e que, por este motivo, não amplifica o GHR exógeno, e um outro par que amplifica na região codificante do gene (chamado de GHR).

### **Análise histológica**

Seis peixes transgênicos e não transgênicos de 45 dias de idade foram anestesiados (Tricaína, 0,1 mg/mL) e sacrificados em gelo para coleta de tecido muscular esquelético. As amostras foram imediatamente fixadas em solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, 0,1 M de tampão fosfato, pH 7,2) e preservadas em etanol 70%. As amostras foram desidratadas em séries de concentrações de etanol (80, 95 e 100%) e embebidas em resina (Historesina - Leica Instruments GmbH, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Secções histológicas transversas (4  $\mu$ m) das fibras musculares foram obtidas através de um micrótomo com navalha de vidro. Os cortes foram corados pelo método hematoxilina-eosina (HE). O diâmetro das fibras foi determinado com auxílio de microscópio acoplado a um analisador de imagens. Foi medida a área das fibras do músculo branco e determinado o diâmetro das fibras através da seguinte fórmula:  $D=2 A^{0,5} \pi^{-0,5}$  (Valente et al 1999). As fibras foram classificadas conforme o seu diâmetro como segue: <16  $\mu$ m (fibras finas) e >16  $\mu$ m (fibras espessas).

### **Análise estatística**

Os dados de crescimento foram analisados através de ANOVA de uma via, seguido por teste *post-hoc* de Tukey. Variação das proporções das fibras musculares foi analisada através de uma tabela  $r \times c$  ( $2 \times 2$ ) a um nível de significância de 5%, com um teste de qui quadrado usando correção de Yates. Para a análise de expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa do software REST (Pfaffl et al. 2002), fazendo comparações pareadas entre transgênicos e não transgênicos. As amostras referências em cada comparação pareada foram os não transgênicos. O alfa adotado foi 0,05 e os resultados foram expressos em mediana  $\pm$  erro padrão (SE).

### **Resultados**

Zebrafish transgênicos foram produzidos por co-injeção em ovos recém fertilizados no estágio de uma célula, utilizando as construções MYO-RED e MYO-GHR em uma razão equimolar. Dos quatro indivíduos DsRed positivos da F0 reproduzidos, somente um macho estava transmitindo ambos transgenes para os descendentes de forma mendeliana, provavelmente integradas no mesmo cromossomo. Este peixe foi considerado o transgênico fundador da linhagem. A expressão da proteína vermelha fluorescente no músculo foi observada em microscópio de epifluorescência (Fig. 1a). Já a presença da construção MYO-GHR foi confirmada na F1 por PCR. Após a reprodução dos peixes da F1 com animais não transgênicos foi confirmado que os transgenes estavam sendo transmitidos juntos para a F2, pois todos os animais que apresentaram expressão para a DsRed foram PCR positivos para o transgene MYO-GHR. Ao contrário, os animais sem fluorescência não possuíam o transgene MYO-GHR, indicando que não estava ocorrendo segregação dos dois transgenes.

Na análise do crescimento dos animais transgênicos da F2 não foi encontrada diferença significativa em relação aos não transgênicos (Fig. 2). Entretanto, na análise de expressão foi verificado que o GHR dos peixes transgênicos estava mais de 100 vezes expresso no músculo em relação aos animais não transgênicos ( $n = 5$ ). Não foi observada diferença significativa para a expressão do GH entre transgênicos e não transgênicos (Fig. 3a). Porém, foi observada uma indução significativa de mais de 2,5 vezes na expressão do GHRa nos transgênicos em relação aos não transgênicos de mesma idade (Fig. 3a). Além disso, foi verificada uma redução significativa na expressão dos genes STAT5.1 e IGF-I de mais de 70% e 60%, respectivamente, nos animais transgênicos (Fig. 3a).

Com relação aos genes reguladores do GHR, foi encontrado um aumento significativo na expressão de SOCS1 e SOCS3 de aproximadamente três vezes nos animais transgênicos em relação aos não transgênicos (Fig. 3b). Além disso, a expressão de todos os genes dos MRFs analisados (*myod*, *myf5* e *myog*) estava duas vezes maior nos peixes transgênicos em relação aos não transgênicos (fig. 4a). Entretanto, a expressão dos genes que codificam para as proteínas musculares estava significativamente reduzida nos animais transgênicos (Fig. 4b).

A análise histológica da média dos diâmetros das fibras musculares mostrou que o número de fibras com diâmetro inferior a 16  $\mu\text{m}$  aumentou significativamente nos animais transgênicos em relação aos não transgênicos (Fig. 5), o que aparentemente evidencia crescimento muscular hiperplásico nestes peixes.

## **Discussão**

A produção de modelos de peixes geneticamente modificados, principalmente para o GH, é uma ferramenta importante para o estudo do crescimento. Recentemente, nosso grupo produziu uma linhagem de zebrafish transgênico superexpressando o gene do GH que apresenta crescimento acelerado (Figueiredo et al. 2007a, 2007b). Entretanto, vários estudos realizados sobre esta linhagem demonstraram alterações fisiológicas e bioquímicas importantes, fazendo com que o crescimento acelerado tenha um custo elevado (Rosa et al. 2008, 2010, 2011). Isto também tem sido observado em outros animais transgênicos superexpressando o GH (Cook et al. 2000; Herbert et al. 2001; Bartke et al. 2002; McKenzie et al. 2003). Estas evidências sugerem que, embora maior crescimento possa ser obtido através da superexpressão do GH, é necessário buscar vias alternativas que possibilitem obter o crescimento desejado sem os efeitos colaterais decorrentes do excesso de hormônio circulante.

O aumento do conhecimento sobre a sinalização intracelular do GH tem possibilitado o desenvolvimento de novos paradigmas na manipulação genética com o objetivo da aceleração do crescimento. Com o objetivo de restringir as ações da sinalização do eixo somatotrófico a um tecido de interesse e assim diminuir seus efeitos colaterais, no presente trabalho nós desenvolvemos uma linhagem de zebrafish transgênico superexpressando o GHR de maneira músculo-específica. Para tanto, foi utilizada uma construção genética constituída pelo promotor da *mylz2* direcionando a expressão do GHR do zebrafish. Adicionalmente, foi co-injetada uma segunda construção genética que induziu a expressão de um gene marcador (DsRed) sob controle

do mesmo promotor. Esta estratégia permitiu identificar *in vivo* o efeito músculo-específico do promotor *mylz2* (Fig. 1a). Foi demonstrado, em trabalhos anteriores, que este promotor é eficiente para direcionar especificamente a expressão de genes para o músculo esquelético de zebrafish (Xu et al. 1999; Ju et al. 2003; Funkenstein et al. 2007).

O crescimento da musculatura esquelética em peixes ocorre através da proliferação e diferenciação das células progenitoras miogênicas, responsáveis pelo crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Johnston 1999; Rowleson e Veggetti 2001), sendo este processo regulado pelos fatores reguladores miogênicos (MRFs) (Sabourin e Rudnicki 2000). Hipertrofia (aumento no tamanho da miofibrila) e hiperplasia (aumento no número de miofibrilas) são os dois principais mecanismos para promoção de um aumento de massa muscular. Estes mecanismos parecem ser regulados pelo GH e IGF-I (Velloso 2008), sendo os efeitos de promoção de crescimento do GH principalmente mediados pelo IGF-I (Le Roith et al. 2001).

Os efeitos do GH e do IGF-I endócrino e/ou autócrino/parácrino podem ter ações distintas na regulação da massa muscular (Velloso 2008). Foi demonstrado em camundongos, que o nocaute do gene do GHR provoca uma redução tanto no peso absoluto do tecido muscular como na relação peso do músculo/peso corporal em comparação com animais não transgênicos (Sotiropoulos et al. 2006). Em outro estudo, Kim et al. (2005) demonstraram que camundongos com receptor de IGF-I (IGF-IR) nocauteado especificamente no tecido muscular apresentam miofibrilas com diâmetro reduzido e músculos menores que os animais não transgênicos, sugerindo que o GH pode não estar envolvido diretamente com o aumento de massa muscular.

No presente estudo, peixes transgênicos para o GHR foram comparados com seus irmãos não transgênicos para o crescimento, estrutura do tecido muscular esquelético e expressão de genes relacionados ao eixo somatotrófico e miogênese. Na análise de crescimento, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (fig. 2), apesar dos transgênicos estarem expressando cerca de 100 vezes mais o gene do GHR em relação aos não transgênicos. Em um estudo similar, Ishtiaq Ahmed et al. (2011) observaram crescimento acelerado em zebrafish transgênicos superexpressando um GHR constitutivamente ativado devido à introdução de zípers de leucina na estrutura da molécula. Neste caso, o eixo somatotrófico permaneceu ativado de forma independente ao GH em todos os tecidos, devido ao promotor ubíquo CMV utilizado. Assim, é provável que o fígado destes animais esteja produzindo maior

quantidade de IGF-I, conforme observado na análise da expressão deste gene em embriões transgênicos. Diferentemente, em nosso modelo a expressão músculo-específica do GHR provavelmente não alterou a concentração de IGF-I plasmático, mantendo o crescimento corporal dentro dos níveis normais.

Com o objetivo de avaliar o nível da sinalização intracelular do GH no tecido muscular de nosso modelo transgênico, nós analisamos a expressão dos principais genes do eixo somatotrófico. Os resultados mostrados na Fig. 3a indicam que a superexpressão músculo-específica do GHR ocasionou, ao contrário do esperado, uma queda significativa da sinalização do eixo somatotrófico, evidenciada pela diminuição da expressão do gene do IGF-I e da Stat5.1. Além disso, foi observado um aumento na expressão do gene do GHRA (endógeno) que pode ser atribuído a uma resposta do tecido a esta queda na sinalização. A questão que surge é: se existe um aumento da expressão do receptor, de que forma a sinalização do eixo somatotrófico foi afetada?

Tem sido demonstrado que proteínas da família SOCS têm função importante na regulação da sinalização intracelular do GH (Herrington e Carter-Su 2001; Zhu et al. 2001; Greenhalgh e Alexander 2004; Croker et al. 2008; Walters e Griffiths 2009). Recentemente, Studzinski et al. (2009) verificaram que SOCS1 e SOCS3 são os principais moduladores do eixo somatotrófico no fígado de zebrafish transgênicos homocigotos da linhagem F0104. Neste sentido, no presente trabalho a expressão de SOCS1 e SOCS3 foi analisada no tecido muscular dos peixes transgênicos para o GHR. Os resultados mostraram um aumento significativo na expressão de ambos os genes (Fig. 3b), indicando que estas proteínas também podem ter função modulatória da via de sinalização intracelular do GH no músculo. A hipótese de Studzinski et al. (2009) para explicar o aumento das proteínas SOCS1 e 3 em transgênicos homocigotos da linhagem F0104 foi que estes, por expressarem o dobro do GH exógeno, ativaram a via de sinalização acima do limite suportado pelo orçamento energético do animal. Este fato pode estar ocorrendo no músculo dos peixes superexpressando o GHR da linhagem transgênica aqui desenvolvida.

O IGF-I tem sido reconhecido como um agente hipertrófico (Glass 2003; Clemmons 2009). DeVol et al. (1990) mostraram que a expressão de IGF-I está aumentada durante a hipertrofia compensatória causada experimentalmente em ratos. IGF-I induz aumento de massa muscular pelo estímulo da via fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K)/proteína quinase B (Akt), resultando em ativação de síntese proteica (Bodine et al. 2001; Rommel et al. 2001, Singleton e Feldman 2001), associada à

hipertrofia (Glass 2005; Clemmons 2009). Para verificar se esta via estava bloqueada foram realizadas análises de expressão de genes que codificam para algumas das principais proteínas musculares. Os resultados obtidos mostraram que os genes da alfa actina 1 (Acta1), miosina de cadeia pesada 4 (myhc4) e mylz2 estão com sua expressão significativamente reduzida (Fig. 4b). Para avaliar se o grau de hipertrofia está realmente alterado nos peixes transgênicos aqui produzidos devido à baixa expressão do gene de IGF-I, foram realizadas análises histológicas do tecido muscular. A Fig. 5 mostra que os peixes transgênicos tiveram um percentual significativamente maior de fibras de menor diâmetro em relação aos não transgênicos. O músculo esquelético consiste de uma mistura de fibras de menor e maior diâmetro, sendo as fibras menores estágios iniciais das maiores, e quando em grande número, utilizadas como diagnóstico de crescimento hiperplásico (Weatherly e Gill 1987). A análise estatística da proporção de fibras pelo teste qui quadrado mostrou uma diferença significativa entre transgênicos e não transgênicos ( $P < 0,01$ ), indicando que o crescimento muscular dos peixes transgênicos produzidos neste trabalho estava alterado para a hiperplasia.

Como já mencionado anteriormente, o crescimento muscular em peixes é regulado pelos MRFs (Hawke e Garry 2001). Myod e myf5, MRFs primários, são responsáveis pela proliferação e diferenciação de mioblastos (Emerson 1990; Watabe 1999; Sabourin e Rudnicki 2000). Já a myog, considerada MRF secundário, controla a diferenciação muscular de forma mais tardia através da regulação da fusão dos mioblastos e consequente formação dos miotubos (Megeny e Rudnicki 1995; Rudnicki e Jaenish 1995). Por estes motivos, e pela tendência de um crescimento hiperplásico observado nos cortes histológicos, foi analisada a expressão dos genes que codificam para myf5, myod e myog. Como resultado, foi observado um aumento significativo na expressão destes genes nos animais transgênicos (Fig. 4a). Isto indica que, de alguma maneira, mesmo sem a ativação do eixo somatotrófico, a superexpressão do GHR muscular levou a um aumento na ativação da expressão dos genes dos MRFs. Cabe ressaltar que, mesmo que os transgênicos superexpressando o GHR tenham a sinalização do eixo somatotrófico diminuída no músculo, é provável que estes animais preservem a produção normal do IGF-I hepático. Assim, surge uma nova questão: poderia o IGF-I circulante estar atuando no músculo e, com isso, compensando a queda do IGF-I produzido de forma autócrina/parácrina?

Sabe-se que, além da via de sinalização intracelular PI3K/Akt, que está mais relacionada ao processo de diferenciação e síntese protéica (Coolican et al. 1997;

Clemmons 2009), o IGF-I ativa a via proteína quinase regulada por mitógeno e sinal extracelular (MEK)/proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), relacionada ao processo proliferativo (Clemmons 2009). Além disso, este hormônio ativa ainda a via STAT3, relacionada ao mecanismo de feedback negativo do próprio IGF-I (Himpe e Kooijman 2009). A via MEK/ERK está presente também como uma via alternativa de sinalização do GH (Herrington e Carter-Su 2001), sendo também relacionada ao processo proliferativo. Existem várias evidências de que a sinalização intracelular do GH utiliza esta via de forma independente de JAK2 (Brooks et al. 2008), não sendo assim, regulada pelas proteínas SOCS. Tem sido demonstrado que as proteínas SOCS1 e 3, além de modularem a sinalização intracelular do GH através da inibição da JAK2, podem regular também a sinalização do IGF-I e da insulina através da ação destas proteínas sobre o substrato do receptor de insulina (IRS) (Dominici et al. 2005) e a JAK2, controlando a via PI3K/Akt e a via JAK/STAT, respectivamente (Himpe e Kooijman 2009). Por outro lado, as proteínas SOCS não regulam a via proliferativa MEK/ERK da sinalização tanto do GH quanto do IGF-I (Himpe e Kooijman 2009). Em nosso modelo, é provável que a via MEK/ERK esteja com um nível de ativação aumentada devido ao provável bloqueio das vias PI3K/Akt e JAK/STAT, causado pelas proteínas SOCS1 e 3. Coolican et al (1997) utilizando inibidores das vias PI3K/Akt e MEK/ERK em mioblastos de rato demonstraram que, quando uma via é bloqueada, aumenta a ativação da outra via. Como a via MEK/ERK é proliferativa, é provável que o aumento de expressão dos genes dos MRFs observado nos peixes transgênicos do presente trabalho esteja relacionado a um possível aumento de ativação desta via.

Baseados em nossos resultados, podemos concluir que o aumento da expressão do GHR no tecido muscular não implica, necessariamente, em aumento na produção de IGF-I autócrino/parácrino. A via PI3K/Akt parece ser regulada pelas proteínas SOCS, que provavelmente regulam também a sinalização intracelular induzida pelo IGF-I circulante. Além disso, a diminuição da sinalização do IGF-I levou a uma redução da síntese de algumas das principais proteínas musculares, ocasionando uma diminuição no diâmetro das fibras musculares, o que caracterizou um crescimento hiperplásico. Assim, fica evidente que o GHR representa um ponto chave no processo de crescimento muscular, sendo em parte utilizado para ativar a via do IGF-I que culmina em síntese de proteínas e crescimento hipertrófico (PI3K) e, por outro lado, utilizado para ativar a via MEK/ERK que culmina na ativação dos MRFs responsáveis pela proliferação de

mioblastos. Neste sentido, hipertrofia e hiperplasia parecem seguir duas vias diferentes, ambas desencadeadas pela ativação do GHR, mas reguladas por mecanismos diferentes.

Para se obter um crescimento muscular hipertrófico/hiperplásico equilibrado, parece ser necessário que ambas as vias PI3K/Akt e MEK/ERK estejam ativadas de forma equivalente. Talvez, como proposto por Ishtiaq Ahmed et al. (2011), uma alternativa interessante seja associar a transgenia com o desenho molecular de proteínas constitutivamente ativadas em tecidos específicos. No caso do tecido muscular, o desenho de receptores de GH ou de IGF-I resistentes à ação modulatória das proteínas SOCS poderia favorecer a proliferação dos mioblastos, acompanhada de uma adequada síntese protéica para sustentar um elevado crescimento hipertrófico.

### **Agradecimentos**

Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, proc. no. 471437/2009-3) e da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

### **References**

- Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C (1993) Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74:237-244
- Baker BJ, Akhtar LN, Benveniste EN (2009) SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. *Trends Immunol* 30:392-400
- Bartke A, Chandrashekar V, Bailey B, Zaczek D, Turyn D (2002) Consequences of growth hormone (GH) overexpression and GH resistance. *Neuropeptides* 36:201-208
- Björnsson BT, Johansson V, Benedet S, Einarsdottir IE, Hildahl J, Agustsson T, Jönsson E (2002) Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiol Biochem* 27:227-242
- Blackwell T, Weintraub H (1990) Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250:1104-1110
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD (2001) Akt/mTOR

- pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3:1014-1019
- Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ (2008) Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1984-1989
- Butler AA, Le Roith DL (2001) Control of growth by the somatotrophic axis: Growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu Rev Physiol* 63:141-164
- Canosa LF, Chang JP, Peter RE (2007) Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *Gen Comp Endocrinol* 151:1-26
- Clemmons DR (2009) Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab* 20(7):349-356
- Cook JT, McNiven MA, Richardson GF, Sutterlin AM (2000) Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188:15-32
- Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ, Florini JR (1997) The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 272(10):6653-6662
- Croker BA, Kiu H, Nicholson SE (2008) SOCS regulation of the JAK/STAT signaling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19:414-422
- Dahm R, Geisler R (2006) Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol* 8:329-345
- Daughaday WH (2000) Growth hormone axis overview-somatomedin hypothesis. *Pediatr Nephrol* 14:537-540
- Devlin RH, Yesaki TY, Biagi CA, Donaldson EM, Swanson P, Chan WK (1994) Extraordinary salmon growth. *Nature* 371:209-210
- Devlin RH, Biagi CA, Yesaki TY (2004) Growth, viability and genetic characteristics of GH transgenic coho salmon strains. *Aquaculture* 236:607-632
- Devlin RH, Sundstro LF, Muir WM (2006) Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. *Trends Biotechnol* 24:89-97
- DeVol DL, Rotwein P, Sadow JL, Novakofski J, Bechtel PJ (1990) Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. *Am J Physiol* 259:E89-E95

- Dominici FP, Argentino DP, Muñoz MC, Miquet JG, Sotelo AI, Turyn D (2005) Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Horm IGF Res* 15:324-336
- Dunham RA (2004) *Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches*. CABI Publishing, Oxford
- Emerson CP (1990) Myogenesis and developmental control genes. *Curr Opin Cell Biol* 2:1065-1075
- Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Proietti MC, Marins LF (2007a) The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2:228-233
- Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Marins LF (2007b) Improving the production of transgenic fish germline: in vivo mosaicism evaluation by GFP transgene co-injection strategy. *Genet Mol Biol* 30:31-36
- Funkenstein B, Skopal T, Rapoport B, Rebhan Y, Du SJ, Radaelli G (2007) Characterization and functional analysis of the 5' flanking region of myosin light chain-2 gene expressed in white muscle of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2:187-199
- Glass DJ (2003) Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol* 5:87-90
- Glass DJ (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1974-1984
- Greenhalgh CJ, Alexander WS (2004) Suppressors of cytokine signalling and regulation of growth hormone action. *Growth Horm IGF Res* 14:200-206
- Hawke TJ, Garry DJ (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91:534-551
- Herbert NA, Armstrong JD, Björnsson BT (2001) Evidence that growth hormone-induced elevation in routine metabolism of juvenile Atlantic salmon is a result of increased spontaneous activity. *J Fish Biol* 59:754-757
- Herrington J, Carter-Su C (2001) Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 12(6):252-257
- Himpe E, Kooijman R (2009) Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors* 35(1):76-81

- Ishtiaq Ahmed AS, Xiong F, Pang S-C, He M-D, Waters MJ, Zhu Z-Y, Sun Y-H (2011) Activation of GH signaling and GH-independent stimulation of growth in zebrafish by introduction of a constitutively activated GHR construct. *Transgenic Res* 20(3):557-567
- Janssen JAMJL (2009) Advantages and disadvantages of GH/IGF-I combination treatment. *Rev Endocr Metab Disord* 10:157-162
- Johansen KA, Overturf K (2005) Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Biotechnol* 7:576-587
- Johnston IA (1999) Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177:99-115
- Ju B, Chong SW, He J, Wang X, Xu Y, Wan H, Tong Y, Yan T, Korzh V, Gong Z (2003) Recapitulation of fast skeletal muscle development in zebrafish by transgenic expression of GFP under the mylz2 promoter. *Dev Dyn* 227:14-26
- Kim H, Barton E, Muja N, Yakar S, Pennisi P, LeRoith D (2005) Intact insulin and insulin-like growth factor-I receptor signaling is required for growth hormone effects on skeletal muscle growth and function in vivo. *Endocrinology* 146(4):1772-1779
- Koumans JTM, Akster HA (1995) Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 110:3-20
- Lassar A, Buskin JN, Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD, Weintraub H (1989) MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58:823-831
- Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A (2001) The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 22(1):53-74
- McKenzie DJ, Martinez IR, Morales A, Acosta J, Taylor EW, Steffensen JF, Estrada MP (2000) Metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance of growth hormone transgenic tilapia (*Oreochromis sp.*). *Comp Biochem Physiol* 126:S66
- McKenzie DJ, Martínez R, Morales A, Acosta J, Morales R, Taylor EW, Steffensen JF, Estrada MP (2003) Effects of growth hormone transgenesis on metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance in tilapia hybrids. *J Fish Biol* 63:398-409
- Megeney LA, Rudnicki MA (1995) Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* 73:723-732

- Mori T, Hiraka I, Kurata Y, Kawachi H, Mano N, Devlin RH, Nagoya H, Araki K (2007) Changes in hepatic gene expression related to innate immunity, growth and iron metabolism in GH-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou*) by cDNA subtraction and microarray analysis, and serum lysozyme activity. *Gen Comp Endocrinol* 151:42-54
- Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB (1989) Interactions between heterologous helix–loop–helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544
- Nam YK, Noh JK, Cho YS, Cho HJ, Cho KN, Kim CG, Kim DS (2001) Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res* 10:353-362
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36
- Pitkänen TI, Krasnov A, Teerijoki H, Mölsä H (1999) Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). I. Growth response to various GH constructs. *Genet Anal* 15:91-98
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001) Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3:1009-1013
- Rosa CE, Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Monserrat JM, Marins LF (2008) Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 149:209-214
- Rosa CE, Kuradomi RY, Almeida DV, Lanes CFC, Figueiredo MA, Dytz AG, Fonseca DB, Marins LF (2010) GH overexpression modifies muscle expression of antioxidant enzymes and increases spinal curvature of old zebrafish. *Exp Gerontol* 45:449-456
- Rosa CE, Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Marins LF (2011) Genotype-dependent gene expression profile of the antioxidant defense system (ADS) in the liver of a GH-transgenic zebrafish model. *Transgenic Res* 20:85-89

- Rowlerson A, Veggetti A (2001) Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Muscle Development and Growth. (Ed. Johnston IA), pp. 103-140. London: Academic Press
- Rudnicki MA, Jaenish R (1995) The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioessays* 17:203-209
- Sabourin LA, Rudnicki MA (2000) The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 57:16-25
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Singleton JR, Feldman EL (2001) Insulin-like growth factor-I in muscle metabolism and myotherapies. *Neurobiol Dis* 8:541-554
- Sjögren K, Jansson J-O, Isaksson OGP, Ohlsson C (2002) A model for tissue-specific inducible insulin-like growth factor-I (IGF-I) inactivation to determine the physiological role of liver-derived IGF-I. *Endocrine* 19(3):249-256
- Sotiropoulos A, Ohanna M, Kedzia C, Menon RK, Kopchick JJ, Kelly PA, Pende M (2006) Growth hormone promotes skeletal muscle cell fusion independent of insulin-like growth factor 1 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7315-7320
- Studzinski AL, Almeida DV, Lanes CF, Figueiredo MA, Marins LF (2009) SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the somatotrophic axis in liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Gen Comp Endocrinol* 161:67-72
- Valente LMP, Rocha E, Gomes EFS, Silva MW, Oliveira MH, Monteiro RAF, Fauconneau B (1999) Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. *J Fish Biol* 55:675-691
- Vanderkuur JA, Wang X, Zhang L, Campbell GS, Allevato G, Billestrup N, Norstedt G, 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, 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

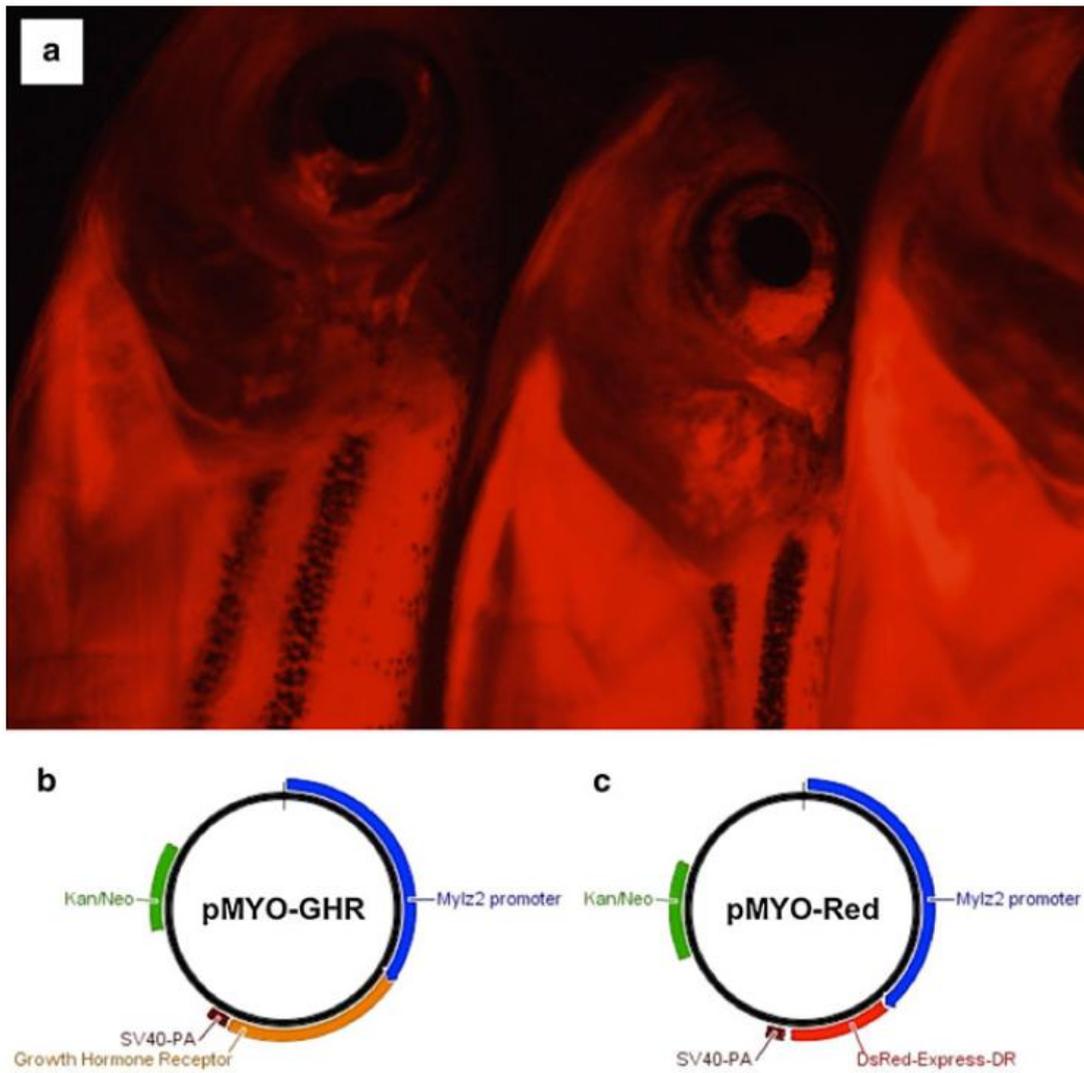
- Velloso CP (2008) Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *Br J Pharmacol* 154:557-568
- Vielkind JR (1992) Medaka and zebrafish: Ideal as transient and stable transgenic systems. In: Hew CL, Fletcher GL (eds) *Transgenic Fish*. World Scientific, Singapore
- Walters TD, Griffiths AM (2009) Mechanisms of growth impairment in pediatric Crohn's disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6:513-523
- Watabe S (1999) Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J Fish Biol* 55:1-18
- Watabe S (2001) Myogenic regulatory factors. In: *Muscle Development and Growth*. (Ed. Johnston IA), pp. 19-41. London: Academic Press
- Waters MJ, Hoang HN, Fairlie DP, Pelekanos RA, Brown RJ (2006) New insights into growth hormone action. *J Mol Endocrinol* 36:1-7
- Weatherly AH, Gill HS (1987) *The Biology of Fish Growth*. London: Academic Press
- Westerfield M (1995) *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish *Danio rerio**, 3rd edn. University of Oregon Press, Eugene
- Xu Y, He J, Tian HL, Chan CH, Liao J, Yan T, Lam TJ, Gong Z (1999) Fast skeletal muscle-specific expression of a zebrafish myosin light chain 2 gene and characterization of its promoter by direct injection into skeletal muscle. *DNA Cell Biol* 18:85-95
- Zbikowska HM (2003) Fish can be first - advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Res* 12:379-38
- Zhu T, Goh ELK, Graichen R, Ling L, Lobie PE (2001) Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal* 13:599-616

**Tabela 1**

Primers gene específicos desenhados usando sequências disponíveis no banco mundial de genes, GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

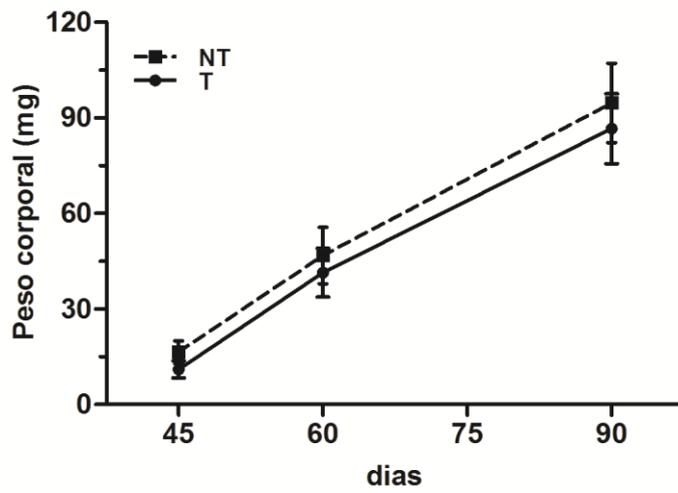
<b>Gene</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverso</b>	<b>GenBank</b>
<b>GH</b>	5'-aagatcagtggtcaaagggttact-3'	5'-ttaaggcaagaatctatcagacagaca-3'	<b>NM001020492.2</b>
<b>GHRa</b>	5'-tgctgtgcgctacaaaatgg-3'	5'-gcttctgcaaaggctgatagaaa-3'	<b>EU649774.1</b>
<b>JAK2</b>	5'-ctacccgccccgaagtg-3'	5'-cgtagtcctgcagctgttga-3'	<b>NM131087.1</b>
<b>STAT5.1</b>	5'-aaattggcggcatcactatagc-3'	5'-ccttcccctgcttgttagg-3'	<b>NM194387.1</b>
<b>IGF-I</b>	5'-caggcaaatctccacgatctc-3'	5'-tttggtgtcctggaatatctgt-3'	<b>NM131825.2</b>
<b>SOCS1</b>	5'-ctccgttttaggatgcaggaat-3'	5'-cattgtgcagtggtcaagtctgata-3'	<b>BC077158.1</b>
<b>SOCS3</b>	5'-ctggtacgatcgtgatcca-3'	5'-ggcaagaatggcgcttca-3'	<b>NM_199950.1</b>
<b>myf5</b>	5'-tccaatgggcctgcaaa-3'	5'-cggcgggtccaccgtact-3'	<b>AF270789.1</b>
<b>myod</b>	5'-ggagcgaattccacagagact-3'	5'-gtgccctccggtactga-3'	<b>BC114261.1</b>
<b>myog</b>	5'-ggccgctacctgagagaga-3'	5'-gagcctcaaaggcctcgtt-3'	<b>AF202639.1</b>
<b>Acta1</b>	5'-tctgtccacctccagcagat-3'	5'-gatggacctgctctcgtga-3'	<b>AF180887.1</b>
<b>mylz2</b>	5'-tggaggccatgatcaaggaa-3'	5'-tggtgaggaaaacggtgaagt-3'	<b>BC045520.1</b>
<b>myhc4</b>	5'-gcgcgctgacatttctga-3'	5'-cagcgtcacggcttttg-3'	<b>AY921650.1</b>
<b>GHR</b>	5'-ttccggtcgcgctagct-3'	5'-gggaagccaagtctcaggat-3'	<b>EU649774.1</b>
<b>DsRed</b>	5'-ctggacatcacctcccacaac-3'	5'-ctcggcgcgctcgtact-3'	
<b>ef1<math>\alpha</math></b>	5'-gggcaagggtcctctcaa-3'	5'-cgctcggccttcagttg-3'	<b>NM131263.1</b>

**Figura 1**



**a** Expressão músculo específica da proteína vermelho fluorescente (DsRed) direcionada pelo promotor da mylz2 (miosina de cadeia leve 2) em zebrafish (*Danio rerio*) transgênico sob luz UV. **b** Plasmídeo pMYO-GHR. **c** Plasmídeo pMYO-Red

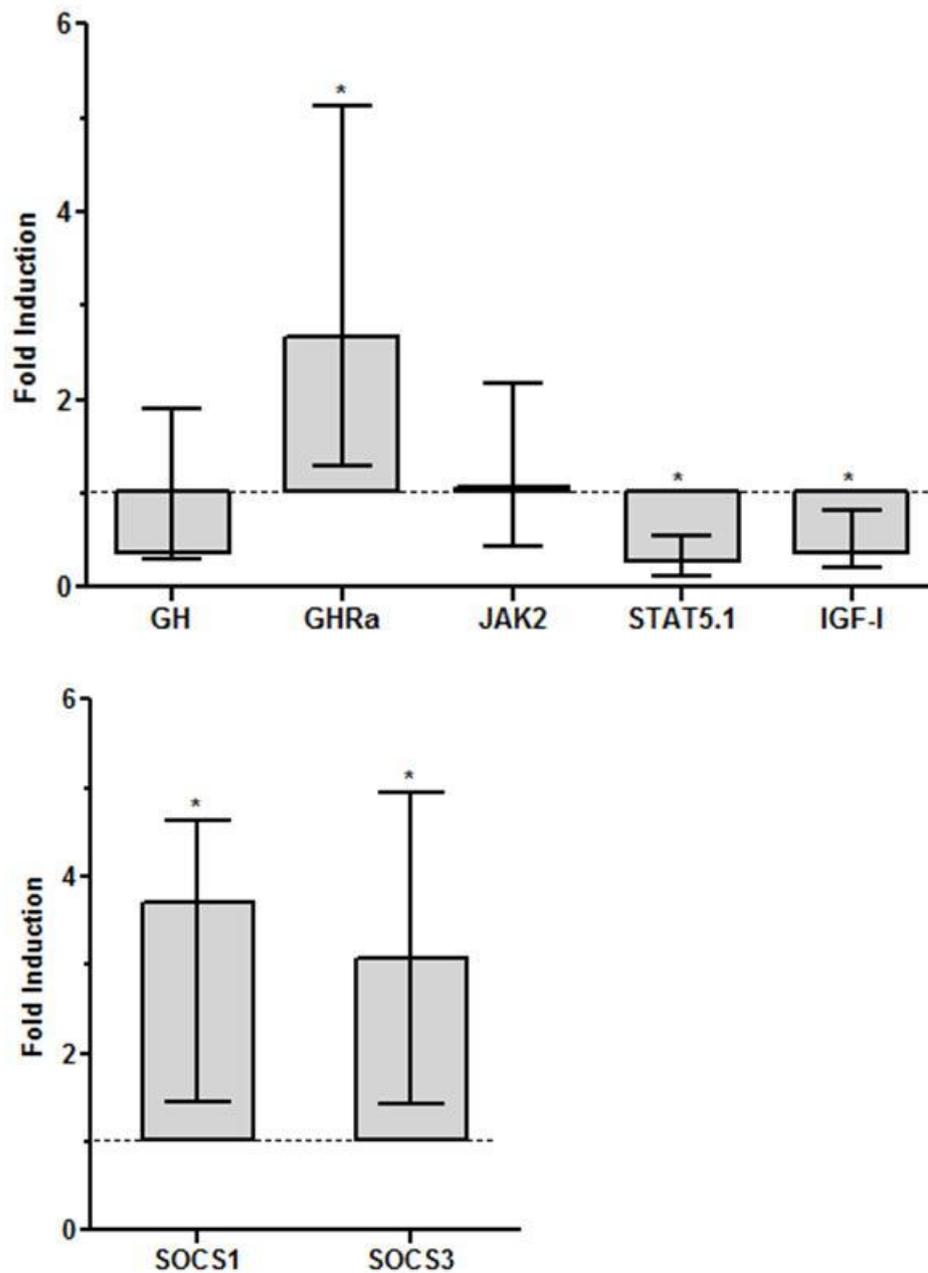
**Figura 2**



Crescimento de zebrafish (*Danio rerio*) transgênico (T) e não transgênicos (NT)

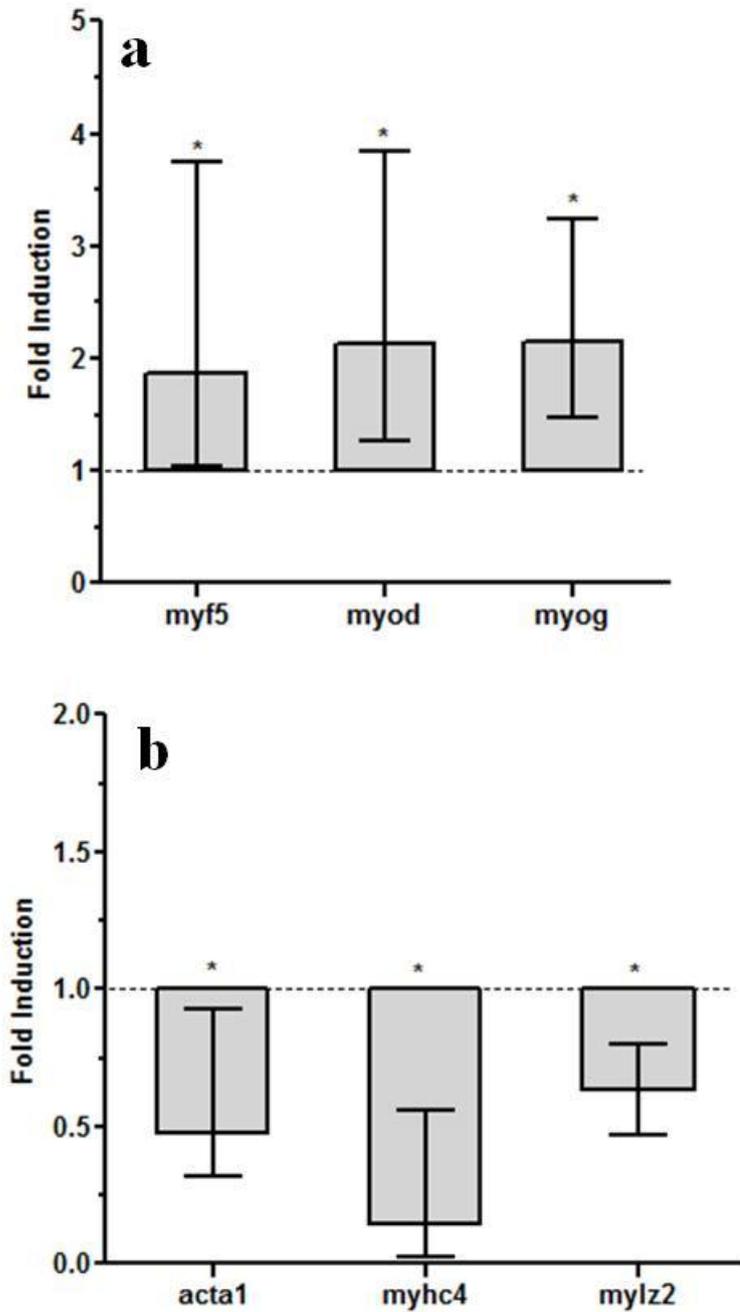
Growth of transgenic (T) and wild type (WT) zebrafish (*Danio rerio*)

**Figura 3**



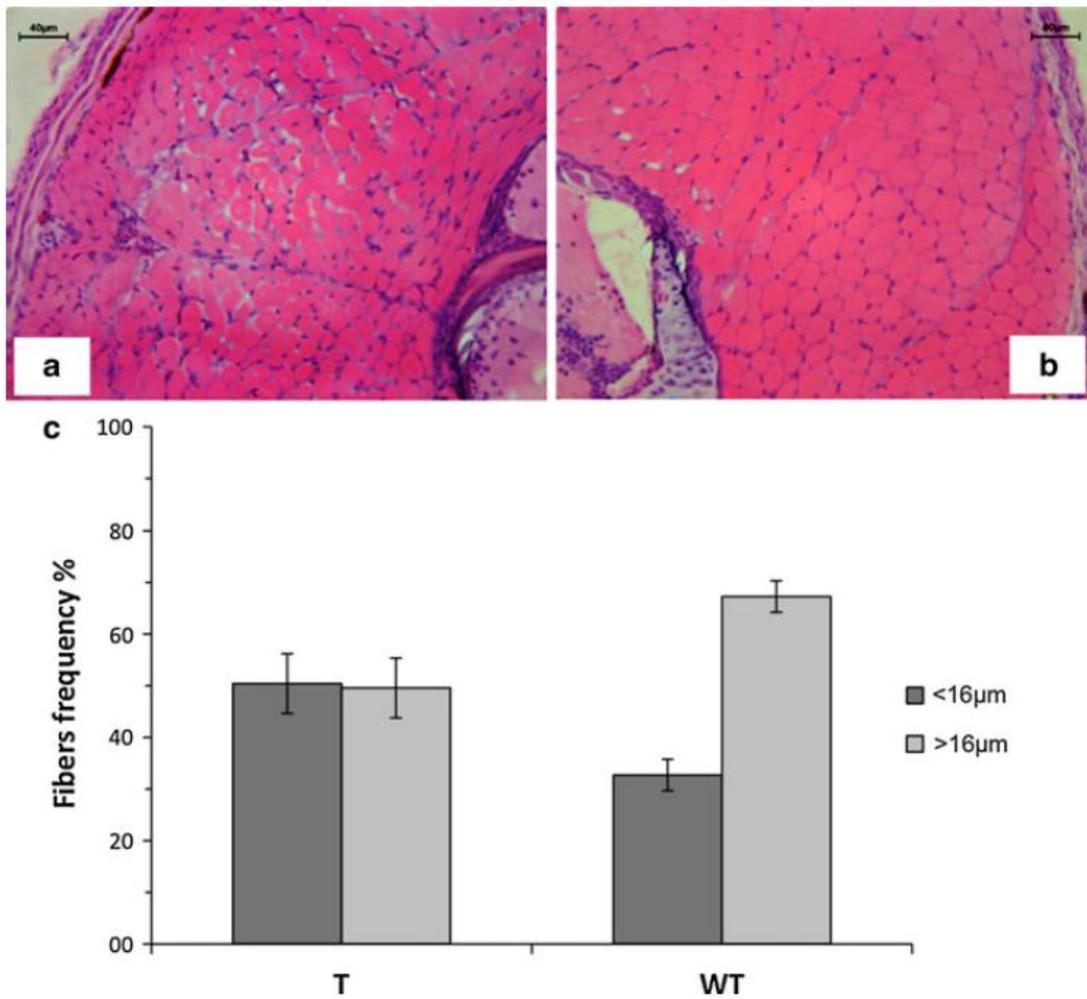
Expressão relativa de genes comparando zebrafish (*Danio rerio*) transgênicos e não transgênicos. **a** Genes relacionados ao eixo somatotrófico. **b** Genes das proteínas SOCS1 e SOCS3. Não transgênicos foram considerados controles, com expressão dos genes = 1 (linha tracejada). Asteriscos representam diferenças significativamente significativas ( $P < 0.05$ ). Em todos os casos  $n = 5$

Figura 4



Expressão relativa de genes comparando zebrafish (*Danio rerio*) transgênicos e não transgênicos. **a** Genes dos fatores reguladores miogênicos. **b** Genes codificando para proteínas musculares estruturais. Não transgênicos foram considerados controles, com expressão dos genes = 1 (linha tracejada). Asteriscos representam diferenças significativamente significativas ( $P < 0.05$ ). Em todos os casos  $n = 5$

**Figura 5**



**a** Corte histológico do músculo de zebrafish transgênico. **b** Corte histológico do músculo de zebrafish não transgênico. **c** Proporção fibras musculares finas (< 16 µm) e espessas (> 16 µm) de zebrafish (*Danio rerio*) transgênicos (T) e não transgênicos (WT). Teste qui quadrado com correção de Yates = 12.62, df = 1 ( $P < 0.01$ )

## **Capítulo II**

**Superexpressão do GHR causa hiperplasia via transporte nuclear e ativação dos genes dos MRFs no músculo esquelético de um modelo de zebrafish transgênico?**

**Co-autor: Luis Fernando Marins.**

**Submetido à revista "Gene"**

**Superexpressão do GHR causa hiperplasia via transporte nuclear e ativação dos genes dos MRFs no músculo esquelético de um modelo de zebrafish transgênico?**

**Marcio Azevedo Figueiredo<sup>a</sup>, Luis Fernando Marins<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brasil.

## **Resumo**

O receptor do hormônio do crescimento (GHR) é um receptor de citocina classe I que apresenta várias vias de sinalização que mediam suas ações como regulador chave do crescimento pós-natal e do metabolismo. Porém, trabalhos recentes vêm demonstrando que o GHR pode ativar de forma direta o processo proliferativo de algumas células ou tecidos, através de sua translocação para o núcleo. O objetivo deste trabalho foi verificar de que maneira a superexpressão do GHR no tecido muscular de um modelo de zebrafish (*Danio rerio*) transgênico ativou a expressão dos fatores reguladores miogênicos (MRF) e, por consequência, causou hiperplasia. Para tanto, foi analisada a expressão dos genes das vias PI3K/Akt (mTOR e p70S6K) e MEK/ERK (Shc, Raf, MEK e ERK), além dos genes das principais proteínas de transporte nuclear (importinas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$  e  $\beta 2$ ). Ao contrário do esperado, a via proliferativa MEK/ERK não apresentou ativação significativa de seus genes em relação à via hipertrofica PI3K/Akt. Entretanto, foi observado aumento da expressão dos genes das importinas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  e  $\beta 1$  nos peixes transgênicos. Portanto, podemos concluir que o aumento na transcrição dos MRFs encontrado no modelo transgênico aqui estudado, pode estar ocorrendo devido à importação do GHR para o núcleo. Este receptor estaria atuando como um fator de transcrição para a ativação dos MRFs. Ao nosso conhecimento, estas são as primeiras evidências sobre o transporte do GHR para o núcleo e sua ação proliferativa em tecido muscular de peixe.

## **Palavras-chave**

*Danio rerio*, receptor do hormônio do crescimento, PI3K/Akt, MEK/ERK, importinas.

## **Abstract**

Growth hormone receptor (GHR) is a class-1 cytokine receptor presenting many signaling pathways which mediates its actions as a key regulator of postnatal growth and metabolism. However, recent studies have been evidencing that GHR may directly activate the proliferative process in some cells or tissues, by its translocation to nucleus. The present work aimed to verify how muscle-specific GHR overexpression in a transgenic zebrafish (*Danio rerio*) model has activated the expression myogenic regulatory factors genes (MRFs) and, consequently, caused hyperplasia. Considering this, the expression of genes involved in PI3K/Akt (mTOR and p70S6K) and MEK/ERK (Shc, Raf, MEK and ERK) pathways were analyzed, besides the main nuclear transport proteins (importins  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$  e  $\beta 2$ ). Differently from what was expected, MEK/ERK proliferative pathway did not present significant gene activation compared to PI3K/Akt hypertrophic pathway. Nevertheless, a significant increase in expression of genes coding for importins  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  e  $\beta 1$  was observed. Therefore, it may be assumed that MRFs transcription raise could be occurring due to GHR import into the nucleus. This receptor would be playing a role as a transcription factor on MRFs promoters. These evidences, as far as we know, are the first reporting GHR transport to nucleus and its proliferative action in fish muscular tissue.

## **Keywords**

*Danio rerio*, growth hormone receptor, PI3K/Akt, MEK/ERK, importins.

## 1. Introdução

Hormônio do crescimento (GH) é um hormônio pluripotente produzido e secretado pela hipófise de vertebrados. Suas ações são mediadas via receptor do GH (GHR), o qual é amplamente expresso por células alvos do GH. O GHR é o regulador chave do crescimento pós-natal e tem ações importantes sobre o metabolismo, os sistemas reprodutivo, gastrointestinal, cardiovascular, hepato-biliar e renal (Lichanska e Waters, 2008). No tecido muscular o GH, e o principal mediador de suas ações, o fator de crescimento tipo insulina-I (IGF-I) (Le Roith et al., 2001), parecem regular os dois principais mecanismos para promoção de aumento de massa muscular, a hipertrofia e a hiperplasia (Velloso, 2008). O crescimento da musculatura esquelética em peixes ocorre através da proliferação e diferenciação das células progenitoras miogênicas, responsáveis pelo crescimento hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares (Johnston, 1999; Rowleson e Veggetti, 2001), sendo este processo regulado pelos fatores reguladores miogênicos (MRFs) (Hawke e Garry, 2001; Sabourin e Rudnicki, 2000).

Nosso grupo tem desenvolvido modelos de zebrafish (*Danio rerio*) transgênicos para o estudo do eixo somatotrófico e os efeitos da superativação desta via de sinalização (Figueiredo et al., 2007a; 2007b; Kuradomi et al., 2011; Rosa et al., 2008; 2010; 2011; Studzinski et al., 2009). Com o objetivo de estudar as ações do GHR no tecido muscular, desenvolvemos recentemente um novo modelo, aqui denominado MYO-GHR, o qual superexpressa o GHR exclusivamente no tecido muscular esquelético (Figueiredo et al., in press). Foi observado neste modelo um aumento proporcional de fibras musculares de menor diâmetro, caracterizando hiperplasia, provavelmente decorrente do aumento significativo da expressão dos MRFs. Entretanto, apesar da superexpressão do GHR nestes transgênicos, a via de sinalização JAK2/STAT mostrou-se significativamente diminuída nos animais transgênicos, levando a uma queda do nível de expressão do IGF-I. Isto pode ser explicado devido ao aumento da expressão dos supressores da sinalização de citocinas 1 e 3 (SOCS1 e 3). Estas proteínas modulatórias têm sido relacionadas à função de controle da sinalização intracelular do GH (Croker et al., 2008; Studzinski et al., 2009). SOCS1 e 3 podem se ligar aos receptores ou às JAKs impedindo a fosforilação das STATs (Baker et al., 2009). Os resultados observados para a linhagem MYO-GHR indicam que, de alguma forma, a superexpressão do GHR levou a um aumento da expressão dos MRFs sem

ativação da via JAK2/STAT, demonstrando que hiperplasia e hipertrofia podem ser reguladas por rotas de sinalização distintas (Figueiredo et al., in press).

O GHR é um receptor de citocina classe I e, como um receptor de membrana, pensa-se que sinaliza exclusivamente da membrana celular, principalmente através do mecanismo de sinalização JAK2/STAT (Argetsinger e Carter-Su, 1996; Moutoussamy et al., 1998; Waters et al., 2006). JAK2 também fosforila o substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) que, por consequência, ativa a via de sinalização PI3K/Akt (Smit et al., 1999; Yamauchi et al., 1998), sugerindo que sua atividade é importante para a ação diabetogênica do GH (Herrington e Carter-Su, 2001). Entretanto, evidências emergentes têm indicado que o GHR pode sinalizar através de mecanismos adicionais independentes de JAK2 (Barclay et al., 2010; Zhu et al., 2002). A ativação da via de sinalização MEK/ERK através da Lyn quinase, uma tirosina quinase da família Src, é um exemplo de sinalização independente de JAK2 (Ling et al., 2003; Rowlinson et al., 2008; Zhu et al., 2002). Esta via de sinalização está envolvida na proliferação celular induzida pelo GH (Liang et al., 1999). Coolican et al. (1997), utilizando inibidores específicos para as vias PI3K/Akt e MEK/ERK em mioblastos de ratos, demonstraram que quando uma via está bloqueada a sinalização da outra aumenta.

Embora o GHR seja amplamente reconhecido como uma proteína de membrana, esta molécula tem sido encontrada em grande quantidade no interior das células, incluindo a sua intrigante localização no núcleo (Lobie et al., 1991). O uso de anticorpos monoclonais combinados com microscopia multifocal e microscopia eletrônica tem permitido a definição precisa da localização subnuclear do GHR para o interior e o exterior de membranas nucleares, nucleoplasma e cromatina (Lobie et al., 1994; Mertani et al., 2003). O mecanismo pelo qual o GHR é translocado para o núcleo não é bem entendido (Johnson et al., 2004). Acredita-se que o processo que leva à localização nuclear do GHR depende do escape deste receptor dos mecanismos de degradação e de seu transporte para o núcleo pelo mecanismo de importação clássica mediado pelo heterodímero de importinas- $\alpha/\beta$  (Bryant e Stow, 2005; Conway-Campbell et al., 2008; Swanson e Kopchick, 2007).

A via de sinalização intracelular MEK/ERK é ativada de forma independente da ação de JAK2, não sendo regulada pelas proteínas SOCS (Brooks et al., 2008; Himpe e Kooijman, 2009). Como esta via está relacionada ao processo proliferativo, é provável que seja responsável pela expressão dos MRFs. Por outro lado, a localização nuclear do GHR é uma característica comum de tecidos e células que apresentam alto grau

proliferativo (Conway-Campbell et al., 2007). Desta forma, é possível que o crescimento hiperplásico observado no tecido muscular do modelo transgênico aqui estudado esteja relacionado com o transporte nuclear do GHR e sua atuação direta ou indireta no aumento da transcrição de genes que codificam para os MRFs. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi verificar se a hiperplasia observada na linhagem MYO-GHR foi devido ao aumento da expressão dos genes da via MEK/ERK em relação à via PI3K/Akt, ou está relacionada à translocação do GHR para o núcleo através das importinas.

## 2. Material e Métodos

Os zebrafish transgênicos utilizados neste trabalho foram da linhagem MYO-GHR (Figueiredo et al., in press), a qual carrega uma construção genética constituída pelo cDNA do GHR sob o controle transcricional do promotor da miosina de cadeia leve 2 (*mylz2*) do próprio zebrafish. Adicionalmente, esta linhagem carrega um transgene repórter que possui o mesmo promotor direcionando a expressão da proteína vermelho fluorescente de *Discosoma sp.* (DsRed). Esta estratégia permitiu a identificação dos transgênicos sob luz ultravioleta logo após a eclosão. Peixes transgênicos e não transgênicos irmãos foram produzidos através do cruzamento de machos transgênicos com fêmeas não transgênicas. Foram utilizados para a análise de expressão dos genes peixes com 45 dias de vida, dos quais foi extraído RNA total do tecido muscular esquelético utilizando TRIzol reagent (Invitrogen, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi tratado com DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Brasil) e utilizado como molde para a síntese de cDNA através do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Brasil), seguindo os protocolos dos fabricantes.

A expressão dos genes das vias de sinalização PI3K/Akt e MEK/ERK e das proteínas de importação foi analisada quantitativamente através de Real Time PCR (qPCR). Cada amostra foi analisada em triplicata, utilizando sete indivíduos de cada grupo analisado. Primers específicos para cada gene (tabela 1) foram desenhados no software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Brasil), a partir de sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As reações de qPCR foram realizadas na plataforma 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Brasil) utilizando o kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Brasil). Diluições seriadas foram feitas para todos os primers para determinar a eficiência de

reação em qPCR. As condições para as PCRs foram 50 °C/2 min, 95 °C/2 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C/15 s e 60 °C/30 s. A expressão dos genes alvos foi normalizada pela expressão do gene do fator de alongação 1 alpha ( $ef1\alpha$ ), o qual não mostrou diferenças significativas entre os grupos experimentais (dados não mostrados).

Para realização da análise estatística foi utilizado o método de quantificação relativa do software REST (Pfaffl et al., 2002), fazendo comparações pareadas entre transgênicos e não transgênicos. As amostras referências em cada comparação pareada foram os não transgênicos. O alfa adotado foi 0,05 e os resultados foram expressos em mediana  $\pm$  erro padrão (SE).

### **3. Resultados**

Foi realizada análise de expressão gênica de zebrafish transgênicos de 45 dias de vida e seus irmãos não transgênicos para o GHR no tecido muscular. Quando analisada a expressão dos genes da via de sinalização intracelular PI3K/AKT, mTOR (componente do complexo TORC-1 que é ativada pela Akt) e p70S6K (quinase fosforilada pela Akt) não foram encontradas diferenças significativas entre peixes transgênicos e não transgênicos (fig. 1). Da mesma forma, também não houve diferenças significativas entre animais transgênicos e não transgênicos nos genes analisados para a via de sinalização MEK/ERK, Shc, Raf, MEK e ERK (fig. 2). Porém, quando analisada a expressão dos genes das proteínas de transporte nuclear, foi observado que as importinas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  e  $\beta 1$  dos transgênicos apresentaram um nível de expressão duas vezes maior do que os não transgênicos, enquanto que para a importina  $\beta 2$  não houve diferença significativa (fig. 3).

### **4. Discussão**

Os resultados aqui obtidos mostram que as vias MEK/ERK e PI3K/Akt não apresentam alterações significativas na expressão de seus principais genes, indicando que a hiperplasia observada nos transgênicos não foi decorrente da alteração destas vias de sinalização. Em contrapartida, foi observado um aumento significativo na expressão de três das quatro importinas analisadas, sugerindo o transporte de alguma molécula para o núcleo. Uma vez que os transgênicos da linhagem MYO-GHR expressam 100 vezes mais o GHR em relação aos não transgênicos (Figueiredo et al., in press), e que este receptor tem sido localizado no núcleo de células proliferativas de diversas espécies, é

provável que o aumento das importinas aqui observado esteja relacionado com o transporte nuclear do receptor superexpresso em nosso modelo.

Levando em consideração que os peixes transgênicos aqui utilizados apresentam hiperplasia sem a ocorrência de hipertrofia, seria esperado que a via MEK/ERK estivesse aumentada em relação à PI3K/Akt. A primeira via está mais relacionada com o processo proliferativo, enquanto que a segunda à síntese protéica e ao crescimento hipertrófico. A via PI3K/Akt leva ao aumento de massa muscular induzido pelo IGF-I (Rommel et al., 2001; Singleton e Feldman, 2001). A ativação de PI3K leva à fosforilação de fosfolipídios na membrana celular, os quais recrutam e ativam a Akt (Coolican et al., 1997). Uma vez ativada, a Akt atua fosforilando o mTOR (alvo mamífero da rapamicina) e a quinase p70S6K, o que acarreta em aumento de síntese protéica, hipertrofia e inibição de apoptose (Bodine et al., 2001; Clemmons, 2009; Glass, 2003; 2005). A p70S6K atua fosforilando uma importante subunidade ribossomal que é necessária para a tradução de proteínas musculares (Clemmons, 2009). No presente trabalho, não foi observada alteração na expressão dos genes mTOR e p70S6K nos transgênicos da linhagem MYO-GHR (fig. 1). Este dado corrobora os resultados observados por Figueiredo et al. (in press) de ausência de hipertrofia nos peixes transgênicos em relação aos não transgênicos.

Por outro lado, os animais desta linhagem apresentaram aumento da expressão dos genes dos MRFs e hiperplasia muscular. Neste caso, a hiperplasia poderia estar ocorrendo através de dois processos distintos: ativação da via proliferativa MEK/ERK ou pelo transporte nuclear do GHR. A via MEK/ERK está presente como uma via alternativa de sinalização do GH bem como do IGF-I (Herrington e Carter-Su, 2001), estando relacionada ao processo proliferativo e de diferenciação celular (Clemmons, 2009; Coolican et al., 1997). A ativação da via de sinalização MEK/ERK ocorre após a ligação do hormônio ao seu receptor, levando à fosforilação de tirosinas mediada por serina/treonina quinases como Shc, Raf e MAPK (Chiou et al., 2007). Dentre estes fatores, as MAPK são cruciais para a regulação de importantes funções celulares em resposta a estímulos mitóticos (Robinson e Cobb, 1997; Seger e Krebs, 1995). Existem três classes de MAPK, sendo que foram analisadas no presente trabalho a MEK e a ERK. Apesar desta via ser caracterizada como proliferativa, não foi observada alteração na expressão de nenhum dos genes analisados (fig. 2), indicando que a hiperplasia encontrada nesta linhagem não foi devido à ativação desta via de sinalização. Portanto,

a questão principal a ser respondida é como a superexpressão do GHR estaria aumentando a transcrição dos MRFs?

Tem sido demonstrado que após a ligação do GH ao seu receptor na superfície celular, este complexo é internalizado e redistribuído para diferentes compartimentos subcelulares (Roupas e Herington, 1989). O mecanismo pelo qual o complexo GH/GHR é translocado para o núcleo ainda não está bem claro. Porém, esta translocação parece não ser exclusiva do GHR. Outros receptores proximamente relacionados ao GHR são também translocados para o núcleo celular (Bryant e Stow, 2005; Carpenter e Liao, 2009; Krolewski, 2005; Wang e Hung, 2009), sendo que esta translocação tem sido relacionada com proliferação celular (Reilly e Maher, 2001; Wang et al., 2010). Este processo de translocação nuclear em mamíferos requer importina- $\beta$ , como descrito para os receptores FGFR1, EGFR e ErbB-2 (Giri et al., 2005; Lo et al., 2006; Reilly e Maher, 2001). Conway-Campbell et al. (2008) demonstraram que em células hematopoiéticas murina (Ba/F3), o transporte do GHR para o núcleo das células é mediado pelo mecanismo de importação clássico através do heterodímero importina- $\alpha/\beta$ .

Com o propósito de verificar se o aumento na expressão dos MRFs e a hiperplasia encontrada no tecido muscular dos peixes transgênicos da linhagem MYO-GHR poderiam estar relacionadas ao transporte nuclear do GHR, foi analisada a expressão dos genes das proteínas de importação nuclear, importinas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$  e  $\beta 2$ . Como resultado, foi observado um aumento significativo na expressão das importinas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  e  $\beta 1$  (fig. 3). Este resultado indica um aumento na importação de proteínas para o núcleo das células musculares, provavelmente GHR, o que corroboraria com uma ação nuclear proliferativa deste receptor. Portanto, com base em nossos resultados podemos concluir que o aumento na transcrição MRFs, e por consequência a hiperplasia muscular encontrada na linhagem MYO-GHR, ocorre devido à importação do GHR ao núcleo. Este trabalho representa as primeiras evidências de que o transporte nuclear deste receptor pode afetar a transcrição de genes relacionados com a proliferação celular em peixes.

A função nuclear do GHR aparenta ser diferente de suas funções na membrana plasmática (Conway-Campbell et al., 2007; 2008). Segundo Conway-Campbell et al. (2008), o GHR nuclear está envolvido com a regulação transcricional, exibindo muitas propriedades normalmente associadas a fatores de transcrição. Porém, para o GHR

exercer qualquer atividade transcricional é necessário a sua interação com moléculas coativadoras transcricionais, uma vez que este receptor não possui domínios de ligação ao DNA (Conway-Campbell et al., 2008). Dentre estas moléculas, o coativador ativador (CoAA) fornece um mecanismo putativo para a atividade transcricional do GHR nuclear em mamíferos (Conway-Campbell et al., 2008), sendo possível a sua existência também em peixes. Tem sido demonstrado que o CoAA aumenta a atividade transcricional de vários fatores de transcrição (Auboeuf et al., 2004). A identificação do CoAA e a análise da expressão de seu gene poderia auxiliar na determinação do mecanismo de ação do GHR no núcleo celular neste grupo de vertebrados.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, proc. no. 471437/2009-3) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

### **Referências**

- Argetsinger, L.S., Carter-Su, C., 1996. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol. Rev.* 76, 1089-1107.
- Auboeuf, D., Dowhan, D.H., Li, X., Larkin, K., Ko, L., Berget, S.M., O'Malley, B.W., 2004. CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing. *Mol. Cell. Biol.* 24(1), 442-453.
- Baker, B.J., Akhtar, L.N., Benveniste, E.N., 2009. SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. *Trends Immunol.* 30, 392-400.
- Barclay, J.L., Kerr, L.M., Arthur, L., Rowland, J.E., Nelson, C.N., Ishikawa, M., d'Aniello, E.M., White, M., Noakes, P.G., Waters, M.J., 2010. *In vivo* targeting of the growth hormone receptor (GHR) box1 sequence demonstrates that the GHR does not signal exclusively through JAK2. *Mol. Endocrinol.* 24, 204-217.
- Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., Yancopoulos, G.D., 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo*. *Nat. Cell Biol.* 3, 1014-1019.
- Brooks, A.J., Wooh, J.W., Tunny, K.A., Waters, M.J., 2008. Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1984-1989.

- Bryant, D.M., Stow, J.L., 2005. Nuclear translocation of cell surface receptors: lessons from fibroblast growth factor. *Traffic*. 6, 947-954.
- Carpenter, G., Liao, H.-J., 2009. Trafficking of receptor tyrosine kinases to the nucleus. *Exp. Cell Res.* 315, 1556-1566.
- Chiou, M.-J., Wang, Y.-D., Kuo, C.-M., Chen, J.-C., Chen, J.-Y., 2007. Functional analysis of mitogen-activated protein kinase-3 (MAPK3) and its regulation of the promoter region in zebrafish. *DNA Cell Biol.* 26(11), 781-790.
- Clemmons, D.R., 2009. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol. Metab.* 20(7), 349-356.
- Conway-Campbell, B.L., Wooh, J.W., Brooks, A.J., Gordon, D., Brown, R.J., Lichanska, A.M., Chin, H.S., Barton, C.L., Boyle, G.M., Parsons, P.G., Jans, D.A., Waters, M.J., 2007. Nuclear targeting of the growth hormone receptor results in dysregulation of cell proliferation and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(33), 13331-13336.
- Conway-Campbell, B.L., Brooks, A.J., Robinson, P.J., Perani, M., Waters, M.J., 2008. The extracellular domain of the growth hormone receptor interacts with coactivator activator to promote cell proliferation. *Mol. Endocrinol.* 22, 2190-2202.
- Coolican, S.A., Samuel, D.S., Ewton, D.Z., McWade, F.J., Florini, J.R., 1997. The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 272(10), 6653-6662.
- Crocker, B.A., Kiu, H., Nicholson, S.E., 2008. SOCS regulation of the JAK/STAT signaling pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 414-422.
- Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Marins, L.F., 2007a. Improving the production of transgenic fish germline: *in vivo* mosaicism evaluation by GFP transgene co-injection strategy. *Genet. Mol. Biol.* 30, 31-36.
- Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Proietti, M.C., Marins, L.F., 2007b. The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics.* 2, 228-233.
- Figueiredo, M.A., Mareco, E.A., Silva, M.D.P., Marins, L.F., in press. Muscle-specific growth hormone receptor (GHR) overexpression induces hyperplasia but not hypertrophy in transgenic zebrafish. *Transgenic Res.* DOI 10.1007/s11248-011-9546-2.

- Giri, D.K., Ali-Seyed, M., Li, L.Y., Lee, D.F., Ling, P., Bartholomeusz, G., Wang, S.C., Hung, M.-C., 2005. Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol. Cell Biol.* 25, 11005-11018.
- Glass, D.J., 2003. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell Biol.* 5, 87-90.
- Glass, D.J., 2005. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1974-1984.
- Hawke, T.J., Garry, D.J., 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J. Appl. Physiol.* 91, 534-551.
- Herrington, J., Carter-Su, C., 2001. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* 12(6), 252-257.
- Himpe, E., Kooijman, R., 2009. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors.* 35(1), 76-81.
- Johnson, H.M., Subramaniam, P.S., Olsnes, S., Jans, D.A., 2004. Trafficking and signaling pathways of nuclear localizing protein ligands and their receptors. *Bioessays.* 26, 993-1004.
- Johnston, I.A., 1999. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture.* 177, 99-115.
- Krolewski, J.J., 2005. Cytokine and growth factor receptors in the nucleus: whats up with that? *J. Cell Biochem.* 95, 478-487.
- Kuradomi, R.Y., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Rosa, C.E., Almeida, D.V., Maggioni, R., Silva, M.D.P., Marins, L.F., 2011. GH overexpression causes muscle hypertrophy independent from local IGF-I in a zebrafish transgenic model. *Transgenic Res.* 20, 513-521.
- Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.L., Butler, A., 2001. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr. Rev.* 22(1), 53-74.
- Liang, L., Zhou, T., Jiang, J., Pierce, J.H., Gustafson, T.A., Frank, S.J., 1999. Insulin receptor substrate-1 enhances growth hormone-induced proliferation. *Endocrinology.* 140, 1972-1983.
- Lichanska, A.M., Waters, M.J., 2008. New insights into growth hormone receptor function and clinical implications. *Horm. Res.* 69, 138-145.

- Ling, L., Zhu, T., Lobie, P.E., 2003. Src-CrkII-C3G-dependent activation of Rap1 switches growth hormone-stimulated p44/42 MAP kinase and JNK/SAPK activities. *J. Biol. Chem.* 278(29), 27301-27311.
- Lo, H.-W., Ali-Seyed, M., Wu, Y., Bartholomeusz, G., Hsu, S.-C., Hung, M.-C., 2006. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin  $\beta$ 1 and CRM1. *J. Cell. Biochem.* 98, 1570-1583.
- Lobie, P.E., Barnard, R., Waters, M.J., 1991. The nuclear growth hormone receptor/binding protein. Antigenic and physiochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 266, 22645-22652.
- Lobie, P.E., Wood, T.J., Sliva, D., Billestrup, N., Waters, M.J., Enberg, B., Norstedt, G., 1994. The cellular mechanism of growth hormone signal transduction. *Acta Paediatr. Suppl.* 406, 39-46.
- Mertani, H.C., Raccurt, M., Abbate, A., Kindblom, J., Törnell, J., Billestrup, N., Usson, Y., Morel, G., Lobie, P.E., 2003. Nuclear translocation and retention of growth hormone. *Endocrinology.* 144(7), 3182-3195.
- Moutoussamy, S., Kelly, P.A., Finidori, J., 1998. Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. *Eur. J. Biochem.* 255, 1-11.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36.
- Reilly, J.F., Maher, P.A., 2001. Importin  $\beta$ -mediated nuclear import of FGF receptor: role in cell proliferation. *J. Cell Biol.* 152, 1307-1312.
- Robinson, M.J., Cobb, M.H., 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180-186.
- Rommel, C., Bodine, S.C., Clarke, B.A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., Glass, D.J., 2001. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat. Cell Biol.* 3, 1009-1013.
- Rosa, C.E., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Monserrat, J.M., Marins, L.F., 2008. Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 149, 209-214.
- Rosa, C.E., Kuradomi, R.Y., Almeida, D.V., Lanes, C.F.C., Figueiredo, M.A., Dytz, A.G., Fonseca, D.B., Marins, L.F., 2010. GH overexpression modifies muscle

- expression of anti-oxidant enzymes and increases spinal curvature of old zebrafish. *Exp. Gerontol.* 45, 449-456.
- Rosa, C.E., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Marins, L.F., 2011. Genotype-dependent gene expression profile of the antioxidant defense system (ADS) in the liver of a GH-transgenic zebrafish model. *Transgenic Res.* 20, 85-89.
- Roupas, P., Herington, A.C., 1989. Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 61: 1-12.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: *Muscle Development and Growth*. (Ed. Johnston, I.A.), pp. 103-140. Academic Press, London.
- Rowlinson, S.W., Yoshizato, H., Barclay, J.L., Brooks, A.J., Behncken, S.N., Kerr, L.M., Millard, K., Palethorpe, K., Nielsen, K., Clyde-Smith, J., Hancock, J.F., Waters, M.J., 2008. An agonist-induced conformational change in the growth hormone receptor determines the choice of signalling pathway. *Nat. Cell Biol.* 10(6), 740-747.
- Sabourin, L.A., Rudnicki, M.A., 2000. The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.* 57, 16-25.
- Seger, R., Krebs, E.G., 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9, 726-735.
- Singleton, J.R., Feldman, E.L., 2001. Insulin-like growth factor-I in muscle metabolism and myotherapies. *Neurobiol. Dis.* 8, 541-554.
- Smit, L.S., Meyer, D.J., Argetsinger, L.S., Schwartz, J., Carter-Su, C., 1999. Molecular events in growth hormone-receptor interaction and signaling. In: Kostyo, J.L., editor. *Handbook of physiology*. pp. 445-480. Oxford University Press, New York.
- Studzinski, A.L., Almeida, D.V., Lanes, C.F., Figueiredo, M.A., Marins, L.F., 2009. SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the somatotrophic axis in liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 67-72.
- Swanson, S.M., Kopchick, J.J., 2007. Nuclear localization of growth hormone receptor: another age of discovery for cytokine action? *Sci. STKE.* 415, pe69.
- Velloso, C.P., 2008. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *Br. J. Pharmacol.* 154, 557-568.

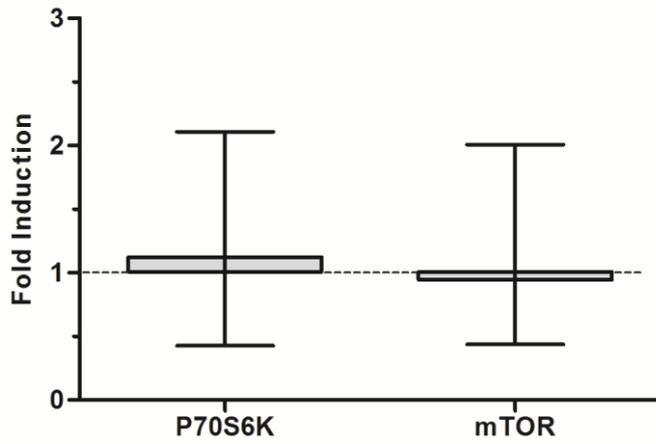
- Wang, S.-C., Hung, M.-C., 2009. Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors. *Clin. Cancer Res.* 15, 6484-6489.
- Wang, Y.-N., Yamaguchi, H., Hsu, J.-M., Hung, M.-C., 2010. Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family. *Oncogene.* 29(28), 3997-4006.
- Waters, M.J., Hoang, H.N., Fairlie, D.P., Pelekanos, R.A., Brown, R.J., 2006. New insights into growth hormone action. *J. Mol. Endocrinol.* 36(1), 1-7.
- Yamauchi, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., Tsuji, Y., Stark, G.R., Kerr, I.M., Tsushima, T., Akanuma, Y., Komuro, I., Tobe, K., Yazaki, Y., Kadowaki, T., 1998. Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 15719-15726.
- Zhu, T., Ling, L., Lobie, P.E., 2002. Identification of a JAK2-independent pathway regulating growth hormone (GH)-stimulated p44/42 mitogen-activated protein kinase activity. GH activation of Ral and phospholipase D is Src-dependent. *J. Biol. Chem.* 277(47), 45592-45603.

**Tabela 1**

Primers gene específicos desenhados usando sequências disponíveis no banco mundial de genes, GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

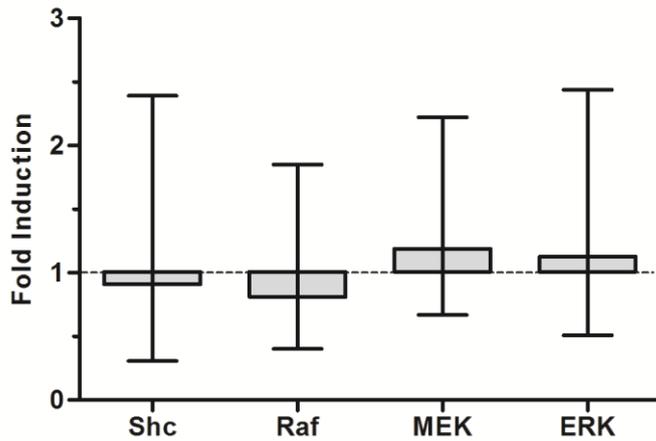
<b>Gene</b>	<b>Primer Foward</b>	<b>Primer Reverso</b>	<b>GenBank</b>
<i>ef1<math>\alpha</math></i>	5'-gggcaagggtccttcaa-3'	5'-cgctcggccttcagttg-3'	<b>NM131263</b>
<i>Shc</i>	5'-aatggccgagtccccacg-3'	5'-cggctcattcggccgtgtac-3'	<b>NM001044973</b>
<i>Raf</i>	5'-aaccagccgaccatccgag-3'	5'-gtggagcgtcatgcctggcc-3'	<b>NM131439</b>
<i>MEK</i>	5'-ccctgcagacagagcggacc-3'	5'-tctcctcacttcggcgcgt-3'	<b>NM001128281</b>
<i>ERK</i>	5'-cccacggcaacttcgcg-3'	5'-agcagcaaccgcagggtctc-3'	<b>XM684744</b>
<i>mTOR</i>	5'-gtatcccaaggcctggcg-3'	5'-atgctgccacgtcgctagc-3'	<b>NM001077211</b>
<i>p70S6K</i>	5'-ccgtcacctcggcgttct-3'	5'-ccggtaagggtggacctcgt-3'	<b>NM213076</b>
<i>Imp<math>\alpha</math>1</i>	5'-cccacactcatctgccttctg-3'	5'-gcaggtgtccgaagca-3'	<b>BC075790</b>
<i>Imp<math>\alpha</math>3</i>	5'-tccttccatccccataactt-3'	5'-ttcggcacaggttgacaatg-3'	<b>BC055253</b>
<i>Imp<math>\beta</math>1</i>	5'-gcacgcaggagatcaaga-3'	5'-ctggccggtatgtctctgt-3'	<b>NM001037702</b>
<i>Imp<math>\beta</math>2</i>	5'-gaccaacacacccaaaactct-3'	5'-cacgtatcccagtcgaccaat-3'	<b>BC080218</b>

**Figura 1**



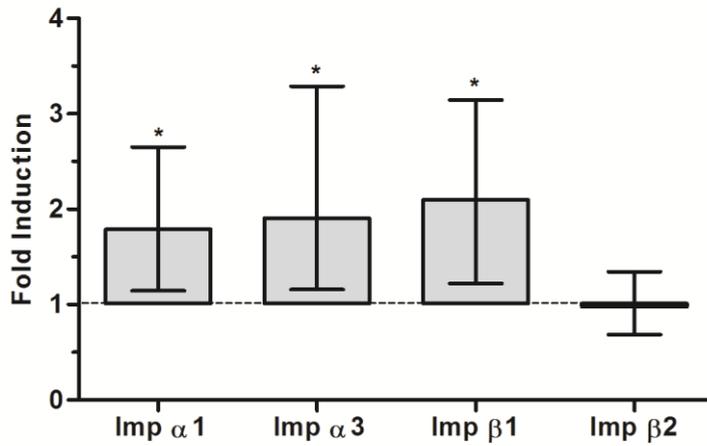
Expressão relativa de genes comparando zebrafish (*Danio rerio*) transgênicos e não transgênicos. Via de sinalização PI3K/Akt. Não transgênicos foram considerados controles, com expressão dos genes = 1 (linha tracejada). Em todos os casos n = 7.

**Figura 2**



Expressão relativa de genes comparando zebrafish (*Danio rerio*) transgênicos e não transgênicos. Via de sinalização MEK/ERK. Não transgênicos foram considerados controles, com expressão dos genes = 1 (linha tracejada). Em todos os casos n = 7.

**Figura 3**



Expressão relativa de genes comparando zebrafish (*Danio rerio*) transgênicos e não transgênicos. Proteínas de transporte nuclear. Não transgênicos foram considerados controles, com expressão dos genes = 1 (linha tracejada). Asteriscos representam diferenças significativas ( $P < 0.05$ ). Em todos os casos  $n = 7$ .

## Discussão Geral

Nas últimas décadas vários estudos sobre o crescimento foram realizados utilizando modelos de animais transgênicos para os mais variados genes. Entretanto, sem a menor dúvida, o GH tem sido o principal alvo destes estudos. Porém, a superexpressão deste hormônio, apesar de na maioria das vezes produzir um crescimento maior, pode gerar também uma série de alterações fisiológicas e bioquímicas (Cook *et al.*, 2000; Herbert *et al.*, 2001; Bartke *et al.*, 2002; McKenzie *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2008; 2010; 2011). Além disso, ainda existem dúvidas com relação à ação do hormônio produzido no animal transgênico sobre o consumidor. A produção de animais transgênicos para outros genes do eixo somatotrófico surge como uma alternativa para se contornar os efeitos indesejados produzidos pela superexpressão do GH. Recentemente, o GHR foi utilizado para produzir um zebrafish transgênico expressando este receptor com uma alteração na sua estrutura tridimensional, a qual permite a sua ativação de forma independente do GH (Ishtiaq Ahmed *et al.*, 2011). Porém, este GHR modificado foi direcionado por um promotor com atuação constitutiva, o que pode levar aos mesmos efeitos colaterais produzidos pelo excesso de GH. Uma maneira de solucionar este problema seria o direcionamento da expressão do GHR utilizando promotores tecido-específicos, o que limitaria a ação do GH. O promotor da *mylz2* tem demonstrado ser eficaz em direcionar a expressão de genes especificamente para o tecido muscular esquelético (Xu *et al.*, 1999; Ju *et al.*, 2003; Funkenstein *et al.*, 2007).

Estes conhecimentos permitiram a produção de construções genéticas que possuem o promotor da *mylz2* do zebrafish, direcionando a expressão do gene do GHR também do zebrafish ou da *DsRed* da *Discosoma sp.*, utilizado como gene marcador. Estas construções foram microinjetadas em ovos recém-fertilizados de zebrafish, produzindo peixes com fluorescência vermelha sob luz UV somente no tecido muscular esquelético, o que permitiu a identificação dos transgênicos *in vivo*. Esta linhagem foi posteriormente denominada MYO-GHR. Os peixes desta linhagem não apresentaram crescimento diferente dos controles não transgênicos, apesar de expressarem 100 vezes mais GHR. Isto ocorreu, provavelmente, devido ao aumento de expressão dos genes das proteínas SOCS. Tem sido comprovado que estas proteínas são capazes de modular a sinalização intracelular do GH (Croker *et al.*, 2008; Baker *et al.*, 2009; Studzinski *et al.*, 2009). Neste trabalho, o aumento de expressão das SOCS levou a uma queda no nível de expressão do gene do IGF-I nos peixes transgênicos. Como se sabe, o IGF-I é o

principal mediador das ações do GH, como promoção de crescimento e diferenciação tecidual (Daughaday, 2000; Butler & Le Roith, 2001). No tecido muscular, o IGF-I é reconhecido como um agente hipertrófico (Glass, 2003; Clemmons, 2009). Portanto, a queda na expressão dos genes das proteínas musculares estruturais (*Acta1*, *myl2* e *myhc4*) é explicada pelo baixo nível de expressão do IGF-I neste tecido. Este fato, explicaria porque os transgênicos não cresceram mais do que os controles não transgênicos. Além disso, tem sido comprovado que as proteínas SOCS podem modular também a sinalização do IGF-I através do controle do IRS-1 e da JAK2, regulando a via de sinalização responsável pela síntese protéica PI3K/Akt e a via JAK/STAT (Dominici *et al.*, 2005; Himpe & Kooijman, 2009).

O crescimento muscular em peixes ocorre através da proliferação e diferenciação de células progenitoras miogênicas, que são responsáveis pelo crescimento hipertrófico e hiperplásico (Koumans & Akster, 1995; Johansen & Overturf, 2005). Hiperplasia e hipertrofia são reguladas pelos MRFs *myod*, *myf5*, *MRF4* e *myog* (Watabe, 1999). Porém, baseado nos resultados obtidos neste trabalho, pode ser observado que hiperplasia e hipertrofia seguem duas vias distintas, ambas desencadeadas pelo GH, mas reguladas por mecanismos diferentes. A hiperplasia encontrada nos peixes transgênicos parece ser regulada pelos MRFs, os quais se apresentaram aumentados em seus níveis de expressão. Por outro lado, a hipertrofia parece ser regulada pelo IGF-I. Os resultados aqui obtidos corroboram o que Kim *et al.* (2005) encontraram quando nocautearam o receptor do IGF-I (IGF-IR) de camundongos, onde as fibras musculares apresentaram diâmetro reduzido e os músculos foram menores do que em animais não transgênicos. Pode-se concluir então, que o IGF-I é fundamental para se obter um crescimento muscular hipertrófico, com conseqüente aumento de massa muscular.

O músculo é importante para a aquicultura, pois geralmente este representa o produto final do cultivo. Tendo em vista o aumento do consumo de peixes devido ao crescimento populacional e das projeções de estagnação de captura de pescados (Delgado *et al.*, 2002; FAO, 2010), a utilização de peixes que produzam mais massa muscular num período de tempo mais curto representa um avanço importante para a aquicultura. Como o eixo somatotrófico está relacionado ao processo de aumento de massa muscular, o maior conhecimento do mecanismo de ação do GH e do IGF-I no músculo, poderia refletir em aplicações que converteriam em maior produção. Os estudos realizados com as linhagens F0104 (Figueiredo *et al.*, 2007a; 2007b) e MYO-GHR sinalizam para algumas proteínas chaves no processo de desenvolvimento da

massa muscular. Dentre estas proteínas, o IGF-I parece ser o primeiro candidato para ser utilizado para a produção de peixes transgênicos. É provável que um animal com aumento de produção desta proteína, especificamente no tecido muscular, apresente um crescimento hipertrófico, culminando com aumento de massa muscular. Tem sido demonstrado que o aumento de IGF-I hepático leva a um crescimento hipertrófico no músculo de zebrafish (Kuradomi *et al.*, 2011). Porém, a geração de camundongos com produção muscular de uma isoforma de IGF-I tem demonstrado desenvolvimento muscular normal e crescimento hipertrófico, sem o aparecimento de efeitos colaterais indesejados (Musarò *et al.*, 2001).

Uma alternativa à transgenia convencional seria a produção de GHR ou IGF-IR com modificações estruturais que permitissem a sua ativação de forma independente dos hormônios circulantes. Neste sentido, Ishtiaq Ahmed *et al.* (2011) introduziram um zíper de leucina na estrutura do GHR com o objetivo de obter um receptor constitutivamente ativado. Os resultados deste trabalho mostraram que isto é possível, embora a utilização de um promotor constitutivo não tenha permitido uma expressão tecido-específica. Outra alternativa para a produção de um peixe com potencial para a aquicultura, é a utilização da tecnologia de RNA de interferência. Porém, devido às dificuldades iniciais de se produzir silenciamento de genes em peixes, poucos trabalhos tem sido conduzidos nestes vertebrados (Schyth, 2008). Entretanto, trabalhos utilizando esta tecnologia tem sido realizados silenciando o gene da miostatina em zebrafish (Acosta *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009), mostrando resultados promissores em relação ao aumento de massa muscular nestes animais. Baseado nos resultados obtidos nesta tese seria interessante a produção de peixes com os genes das proteínas SOCS silenciados. Este silenciamento poderia contornar a regulação produzida por estas proteínas sobre o eixo somatotrófico. Portanto, o conhecimento adquirido com o estudo das linhagens F0104 e MYO-GHR ampliam a possibilidade de produção de alternativas para a obtenção de um peixe que apresente crescimento acelerado e maior massa muscular, sem produzir efeitos negativos, tanto fisiológicos como para o consumidor.

## Referências

- Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O., Estrada, M.P., 2005. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J. Biotechnol.* 119, 324-331.
- Baker, B.J., Akhtar, L.N., Benveniste, E.N., 2009. SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. *Trends Immunol.* 30, 392-400.
- Bartke, A., Chandrashekar, V., Bailey, B., Zaczek, D., Turyn, D., 2002. Consequences of growth hormone (GH) overexpression and GH resistance. *Neuropeptides.* 36, 201-208.
- Butler, A.A., Le Roith, D.L., 2001. Control of growth by the somatotrophic axis: Growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 141-164.
- Clemmons, D.R., 2009. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol. Metab.* 20(7), 349-356.
- Cook, J.T., McNiven, M.A., Richardson, G.F., Sutterlin, A.M., 2000. Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture.* 188, 15-32.
- Crocker, B.A., Kiu, H., Nicholson, S.E., 2008. SOCS regulation of the JAK/STAT signaling pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 414-422.
- Daughaday, W.H., 2000. Growth hormone axis overview-somatomedin hypothesis. *Pediatr. Nephrol.* 14, 537-540.
- Delgado, C., Rosegrant, M., Meijer, S., Wada, N., Ahmed, M., 2002. Fish as food: projections to 2020. The Biennial Meeting of International Institute for Fisheries Economics and Trade (IIFET), Wellington, New Zealand.
- Dominici, F.P., Argentino, D.P., Muñoz, M.C., Miquet, J.G., Sotelo, A.I., Turyn, D., 2005. Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Horm. IGF Res.* 15, 324-336.
- FAO, 2010. The state of the world fisheries and aquaculture (SOFIA). FAO, Rome. Available from: <http://www.fao.org/docrep/013/i1820e/i1820e00.htm>.
- Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Marins, L.F., 2007a. Improving the production of transgenic fish germline: in vivo mosaicism evaluation by GFP transgene co-injection strategy. *Genet. Mol. Biol.* 30, 31-36.
- Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Proietti, M.C., Marins, L.F., 2007b. The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different

- genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*. 2, 228-233.
- Funkenstein, B., Skopal, T., Rapoport, B., Rebhan, Y., Du, S.J., Radaelli, G., 2007. Characterization and functional analysis of the 5' flanking region of myosin light chain-2 gene expressed in white muscle of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*. 2, 187-199.
- Glass, D.J., 2003. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell Biol.* 5, 87-90.
- Herbert, N.A., Armstrong, J.D., Björnsson, B.T., 2001. Evidence that growth hormone-induced elevation in routine metabolism of juvenile Atlantic salmon is a result of increased spontaneous activity. *J. Fish Biol.* 59, 754-757.
- Himpe, E., Kooijman, R., 2009. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors*. 35(1), 76-81.
- Ishtiaq Ahmed, A.S., Xiong, F., Pang, S.-C., He, M.-D., Waters, M.J., Zhu, Z.-Y., Sun, Y.-H., 2011. Activation of GH signaling and GH-independent stimulation of growth in zebrafish by introduction of a constitutively activated GHR construct. *Transgenic Res.* 20(3), 557-567.
- Johansen, K.A., Overturf, K., 2005. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Biotechnol.* 7, 576-587.
- Ju, B., Chong, S.W., He, J., Wang, X., Xu, Y., Wan, H., Tong, Y., Yan, T., Korzh, V., Gong, Z., 2003. Recapitulation of fast skeletal muscle development in zebrafish by transgenic expression of GFP under the mylz2 promoter. *Dev. Dyn.* 227, 14-26.
- Kim, H., Barton, E., Muja, N., Yakar, S., Pennisi, P., Le Roith, D., 2005. Intact insulin and insulin-like growth factor-I receptor signaling is required for growth hormone effects on skeletal muscle growth and function in vivo. *Endocrinology*. 146(4), 1772-1779.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 110, 3-20.
- Kuradomi, R.Y., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Rosa, C.E., Almeida, D.V., Maggioni, R., Silva, M.D.P., Marins, L.F., 2011. GH overexpression causes

- muscle hypertrophy independent from local IGF-I in a zebrafish transgenic model. *Transgenic Res.* 20, 513-521.
- Lee, C.-Y., Hu, S.-Y., Gong, H.-Y., Chen, M.H.-C., Lu, J.-K., Wu, J.-L., 2009. Suppression of myostatin with vector-based RNA interference causes a double-muscle effect in transgenic zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 766-771.
- McKenzie, D.J., Martínez, R., Morales, A., Acosta, J., Morales, R., Taylor, E.W., Steffensen, J.F., Estrada, M.P., 2003. Effects of growth hormone transgenesis on metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance in tilapia hybrids. *J. Fish Biol.* 63, 398-409.
- Mori, T., Hiraka, I., Kurata, Y., Kawachi, H., Mano, N., Devlin, R.H., Nagoya, H., Araki, K., 2007. Changes in hepatic gene expression related to innate immunity, growth and iron metabolism in GH-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou*) by cDNA subtraction and microarray analysis, and serum lysozyme activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151, 42-54.
- Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L., Rosenthal, N., 2001. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.* 27, 195-200.
- Rosa, C.E., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Monserrat, J.M., Marins, L.F., 2008. Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 149, 209-214.
- Rosa, C.E., Kuradomi, R.Y., Almeida, D.V., Lanes, C.F.C., Figueiredo, M.A., Dytz, A.G., Fonseca, D.B., Marins, L.F., 2010. GH overexpression modifies muscle expression of anti-oxidant enzymes and increases spinal curvature of old zebrafish. *Exp. Gerontol.* 45, 449-456.
- Rosa, C.E., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Marins, L.F., 2011. Genotype-dependent gene expression profile of the antioxidant defense system (ADS) in the liver of a GH-transgenic zebrafish model. *Transgenic Res.* 20, 85-89.
- Schyth, B.D., 2008. RNAi-mediated gene silencing in fishes? *J. Fish Biol.* 72, 1890-1906.

- Studzinski, A.L., Almeida, D.V., Lanes, C.F., Figueiredo, M.A., Marins, L.F., 2009. SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the somatotrophic axis in liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 67-72.
- Watabe, S., 1999. Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J. Fish Biol.* 55, 1-18.
- Xu, Y., He, J., Tian, H.L., Chan, C.H., Liao, J., Yan, T., Lam, T.J., Gong, Z., 1999. Fast skeletal muscle-specific expression of a zebrafish myosin light chain 2 gene and characterization of its promoter by direct injection into skeletal muscle. *DNA Cell Biol.* 18, 85-95.

## **Conclusões Gerais**

1. O promotor da *mylz2* direcionou de forma eficaz a expressão da DsRed e do gene do GHR para o tecido muscular.

2. Os peixes transgênicos da linhagem MYO-GHR apresentaram redução da expressão dos genes da via de sinalização JAK/STAT, culminando com redução da expressão do gene do IGF-I, devido ao aumento da expressão das SOCS.

3. A superexpressão do GHR no tecido muscular produziu aumento da expressão dos MRFs, e por consequência hiperplasia muscular.

4. Hiperplasia e hipertrofia seguem duas vias distintas, ambas desencadeadas pelo GH, mas reguladas por mecanismos diferentes.

5. A via de sinalização intracelular proliferativa MEK/ERK não foi a responsável pelo aumento da expressão dos MRFs.

6. A superexpressão do GHR levou a um aumento da expressão dos genes das proteínas de transporte nuclear, importinas, responsáveis pela translocação nuclear de vários receptores de citoquinas, incluindo o GHR.

7. A superexpressão do GHR no tecido muscular esquelético não levou a aumento de crescimento corporal.

## Muscle-specific growth hormone receptor (GHR) overexpression induces hyperplasia but not hypertrophy in transgenic zebrafish

Marcio Azevedo Figueiredo · Edson A. Mareco ·  
Maeli Dal Pai Silva · Luis Fernando Marins

Received: 18 March 2011 / Accepted: 16 August 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** Even though growth hormone (GH) transgenesis has demonstrated potential for improved growth of commercially important species, the hormone excess may result in undesired collateral effects. In this context, the aim of this work was to develop a new model of transgenic zebrafish (*Danio rerio*) characterized by a muscle-specific overexpression of the GH receptor (GHR) gene, evaluating the effect of transgenesis on growth, muscle structure and expression of growth-related genes. In on line of transgenic zebrafish overexpressing GHR in skeletal muscle, no significant difference in total weight in comparison to non-transgenics was observed. This can be explained by a significant reduction in expression of somatotrophic axis-related genes, in special insulin-like growth factor I (IGF-I). In the same sense, a significant increase in expression of the

suppressors of cytokine signaling 1 and 3 (SOCS) was encountered in transgenics. Surprisingly, expression of genes coding for the main myogenic regulatory factors (MRFs) was higher in transgenic than non-transgenic zebrafish. Genes coding for muscle proteins did not follow the MRFs profile, showing a significant decrease in their expression. These results were corroborated by the histological analysis, where a hyperplasic muscle growth was observed in transgenics. In conclusion, our results demonstrated that GHR overexpression does not induce hypertrophic muscle growth in transgenic zebrafish probably because of SOCS impairment of the GHR/IGF-I pathway, culminating in IGF-I and muscle proteins decrease. Therefore, it seems that hypertrophy and hyperplasia follow two different routes for entire muscle growth, both of them triggered by GHR activation, but regulated by different mechanisms.

M. A. Figueiredo · L. F. Marins  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura,  
Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio  
Grande—FURG, Rio Grande, RS, Brazil

E. A. Mareco · M. D. P. Silva  
Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências,  
Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP,  
Brazil

L. F. Marins (✉)  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal  
do Rio Grande—FURG, Av. Itália, Km 8, Rio Grande,  
RS CEP 96201-900, Brazil  
e-mail: dqmluf@furg.br

**Keywords** Transgenic zebrafish · Growth hormone receptor · Insulin-like growth factor I · Suppressors of cytokine signaling · Hyperplasia · Skeletal muscle

### Introduction

The biotechnological advances over the last decades have provided important tools for gene and chromosome manipulation in organisms. Development of transgenic fish is a high-interest topic in aquaculture

due to the potential that this technology can offer for improving production (Zbikowska 2003; Dunham 2004). The growth hormone (GH) gene has been manipulated in order to raise its plasmatic concentration, inducing an increase in growth performance of commercially important fish. In fact, a higher-level expression of this gene has led to significant results, as reported by Devlin et al. (1994) for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), Pitkänen et al. (1999) for Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and Nam et al. (2001) for mud loach (*Misgurnus mizolepis*). These studies demonstrated that supraphysiological GH levels can be obtained by genetic manipulation, leading to a significant increment in growth rates through an increase in intracellular signalling of the somatotrophic axis and its consequent biological effects.

GH is an adenohipophysary polypeptide hormone which, besides stimulating somatic growth, is also implied in other physiological mechanisms of fish such as energy mobilization, gonad development, osmoregulation, appetite, social behavior, morphology and immunology (Björnsson et al. 2002; Devlin et al. 2006; Canosa et al. 2007). Free GH in the blood stream can bind to receptors present in the membranes of target cells, promoting intracellular signalling constituted by a series of cascading phosphorylation reactions that actualize the somatotrophic axis. Membrane receptors that recognize GH, called GHR, are members of the cytokine type I receptor family (Butler and LeRoith 2001; Waters et al. 2006) which, when complexed to the hormone, induce phosphorylation of janus kinase (JAK) enzymes normally associated with the intracellular portion of the receptor (Argetsinger et al. 1993; VanderKuur et al. 1994, 1995). Once activated, JAKs phosphorylate specific intracellular regions of the receptor, which function as anchorage sites for cytoplasmic transcription factors of the STATs (signal transducers and activators of transcription) family. Once phosphorylated, STATs form dimers and translocate to the nucleus, activating the transcription of specific genes involved in GH biological responses.

The entire signalling pathway triggered by GH can be controlled in various manners. It is necessary to maintain the hormone at adequate levels, or even absent in some specific physiological or metabolic situations. A highly recognized form of controlling circulating GH levels is the negative feedback mechanism that GH and IGF-I (insulin-like growth

factor type I) exert on hormone secretion by the adenohipophysis (Björnsson et al. 2002). This is important due to the fact that GH has a broad action spectrum on various physiological mechanisms, and its excess may provoke adverse collateral effects in the organism (Devlin et al. 2004).

The manner in which GH chooses its target cells can also be considered a regulatory mechanism. It is known that target cells present GHR molecules available in their membranes. Therefore, if cells are able to control the expression of their receptors, they can also control the intracellular signalling levels independently of circulating GH concentrations. In fact, GHR levels apparently vary antagonistically to GH levels, compensating signalling and even blocking the hormone's action in some tissues through a resistance phenomenon (Bartke et al. 2002; Figueiredo et al. 2007a).

Circulating GH levels and the amount of receptors present in membranes of target cells are determinant for intracellular signalling control. However, cells have additional mechanisms that may assist in this process. Recently, the control function of GH intracellular signalling has been attributed to proteins of the SOCS (suppressors of cytokine signaling) family (Crocker et al. 2008). These proteins can bind to receptors or JAKs, preventing phosphorylation of STATs (Baker et al. 2009) and, consequently, intracellular signalling promoted by the GH present in the blood stream.

When the somatotrophic axis is not blocked and GH is available in the blood stream, intracellular signalling in target cells culminates with the activation of a series of growth-related genes. Among these is the IGF-I, considered to be the main indirect effector of GH in growth promotion and tissue differentiation (Daughaday 2000; Butler and LeRoith 2001). Although IGF-I is produced in many cell types targeted by GH, its main production site is the liver, from which it is exported to the blood stream and becomes an important complementary agent for somatic growth (Sjögren et al. 2002; Janssen 2009).

Besides the liver, one of the main targets of circulating GH is muscle tissue. In fish aquaculture, this tissue is fundamentally important since it generally represents the final commercialized product. It is known that skeletal muscle growth in fish occurs through proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells, also known as adult myoblasts or

myosatellite cells. These are responsible for hyperplastic and hypertrophic growth of muscle fibers (Koumans and Akster 1995; Johansen and Overturf 2005). Hyperplasia and hypertrophy are regulated by myogenic regulatory factors (MRFs) that include myod, myogenin (myog) and myf5 (Watabe 1999, 2001). MRFs recognize specific DNA nucleotide sequences present at the promoter regions of most muscle-specific genes, influencing transcription (Lassar et al. 1989; Murre et al. 1989; Blackwell and Weintraub 1990).

Advances in knowledge of GH signalling and regulation mechanisms permit deducing that its excess may result in undesired collateral effects. The development of various intracellular signalling control mechanisms in itself indicates that a rigorous control of its levels is absolutely necessary. In this manner, it seems obvious that maintaining this hormone at supraphysiological levels through genetic manipulation may result in a series of metabolic alterations with unpredictable consequences on other physiological systems in which GH acts (Devlin et al. 2006). Mori et al. (2007) observed alterations in liver, immunological, reproductive and growth-related genes expression in the amago salmon (*Oncorhynchus masou*). As a result of GH overexpression or administration, a significant increase in metabolic rates and oxygen consumption were also observed in Atlantic salmon (Cook et al. 2000; Herbert et al. 2001), tilapia (McKenzie et al. 2000, 2003) and in zebrafish (Rosa et al. 2008, 2011).

A possible alternative to growth manipulation may be the application of transgenesis for increasing GHR levels in a target tissue, instead of raising circulating hormone levels. This new paradigm of genetic manipulation brings forth two interesting possibilities. First, the animal will be able to regulate hormone levels according to its momentary needs, permitting an adequate utilization of available energy. Secondly, the use of tissue-specific promoters may direct the effect of circulating GH to the tissues of interest for increasing productivity of the cultivated organism. In this context, the aim of this work was to develop a new model of genetically modified fish characterized by a muscle-specific overexpression of the GHR gene, evaluating the effect of transgenesis on growth, muscle structure and expression of growth-related genes. Zebrafish (*Danio rerio*) was used as experimental model, which has been reported as a genetic

model whose results can be extrapolated to aquaculture species (Dahm and Geisler 2006).

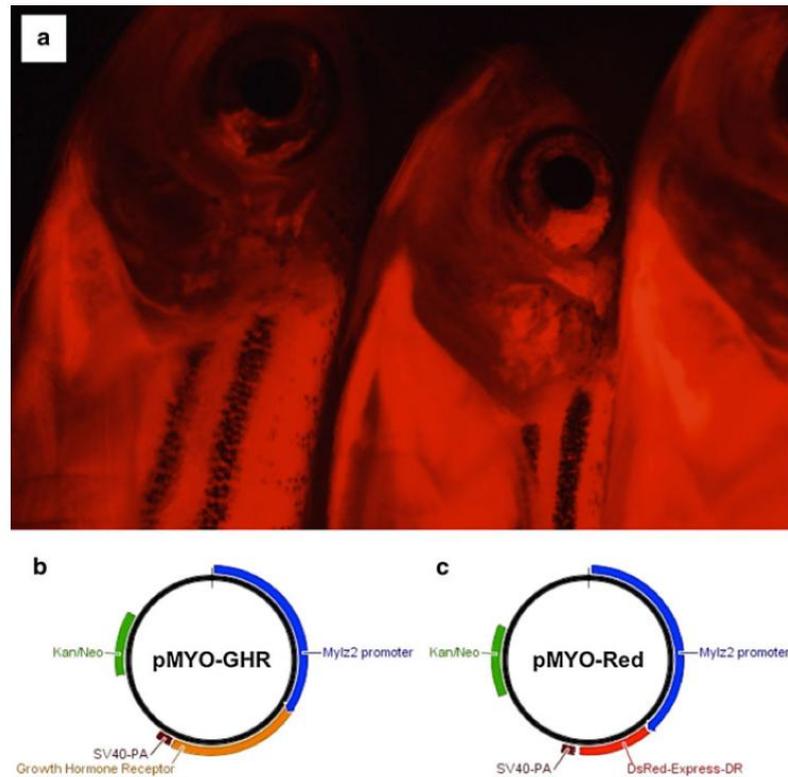
## Materials and methods

### Production of genetic constructs

For the production of transgenic fish, two genetic constructs were co-injected in recently fertilized eggs at the one-cell stage. These constructs were based on the commercial plasmid pDsRed-Express-DR (Clontech Laboratories, Inc.), which codifies a destabilized variant of the red fluorescent protein of *Discosoma* sp. (DsRed), and permits the insertion of promoters for directing its expression. A 2,582 basepair fragment of the zebrafish's myosin light chain 2 (mylz2) promoter was used, amplified through polymerase chain reaction (PCR) using primers MYO-FOR (5'-CGAATTCGGATATTTTCAAAGCCAATCG-3') and MYO-REV (5'-CGGATCCGTCGAGACGGTATGTGTGAAG-3'). For isolation of the GHR gene, reverse transcription PCR (RT-PCR) was performed with primers zfGHR2-FOR (5'-CGGATCCATGGCTCACTCGCTCTCTCTCGA-3') and zfGHR3-REV (5'-GCGGCCGCAGCTTTTAATAGTCCCCTCATGG-3'). Both PCRs were conducted in 25  $\mu$ L reactions containing 2.5  $\mu$ L 10 $\times$  PCR buffer, 0.2  $\mu$ M of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 0.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 units of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil) and 1  $\mu$ L of DNA solution. Reactions were incubated at 94°C for 1 min, followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 57°C, and 2.5 min at 72°C, with a final extension step at 72°C for 10 min. Fragments were purified from gel with Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Brazil), according to the manufacturer's recommendation.

The mylz2 promoter fragment was inserted in the pDsRed-Express-DR plasmid by adding restriction sites at its 5' and 3' extremities for the restriction endonucleases *Eco*R I and *Bam*H I, respectively, producing the construct denominated pMYO-Red (Fig. 1c). For substitution of DsRed by the GHR cDNA, restriction sites were inserted in the 5' and 3' extremities of the latter for the restriction endonucleases *Bam*H I and *Not* I, respectively, obtaining the pMYO-GHR construct (Fig. 1b). For linearizing constructs, primers MCS-FOR (5'-GACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTT-3')

**Fig. 1** a Muscle-specific expression of the red fluorescent protein (DsRed) driven by mylz2 (myosin light chain 2) promoter in transgenic zebrafish (*Danio rerio*) under UV light. **b** Plasmid pMYO-GHR. **c** Plasmid pMYO-Red



and Bgl II-PA (5'-CAGATCTTGAGTTTGGACAA ACCACAAC-3') were used. PCR was performed in 25  $\mu$ L reactions, as described above. Reactions were incubated at 94°C for 1 min, followed by 37 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 60°C and 4 min at 72°C, with a final extension at 72°C for 10 min. Fragments were purified from the gel, as described previously. After this process, constructs were denominated MYO-RED and MYO-GHR.

#### Fish maintenance and transgenics production

Fish were reared in a closed water circulation system according to Westerfield (1995). Approximately five hundred embryos at the one-cell stage were microinjected according to the general protocol suggested by Vielkind (1992) using an IM-30 (Narishige, Japan) motorized pico-injector for injecting approximately 300 pL of DNA solution, representing a final number of  $10^6$  copies of each transgene per embryo. Microinjected embryos were incubated at 28°C until hatching,

when they were analyzed in an epifluorescence microscope (excitation = 557 nm; emission = 579 nm). Larvae were classified by DsRed expression patterns according to Figueiredo et al. (2007b).

About fifty DsRed positive F0 larvae were obtained, but only four individuals with strong DsRed expression were reared until maturity and separately reproduced with non-transgenic (wild type) fish. In order to confirm presence of the MYO-GHR construct in F1 fish, a small portion of the tail fin of DsRed positive fish was removed for genomic DNA extraction (Sambrook et al. 1989). The MYO-GHR gene was amplified via PCR using primers zfGHR2-FOR and Bgl II-PA and primers MYO-FOR and zfGHR3-REV, as previously described. PCRs were performed in 12.5  $\mu$ L reactions containing 1.25  $\mu$ L 10 $\times$  PCR buffer, 0.2  $\mu$ M of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 0.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 units of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil) and 0.5  $\mu$ L of DNA solution. Reactions were incubated at 94°C for 1 min, followed by 33 cycles of 30 s at 94°C,

1 min at 60°C, and 2 min at 72°C, with a final extension step at 72°C for 10 min. Afterwards, F1 fish were individualized and reproduced with non-transgenic fish. Five positive larvae and five negative (F2) for DsRed, offspring of each reproduced fish were sacrificed and genomic DNA was extracted. This DNA was used as a target for PCR amplification of the MYO-GHR gene, using primers zfGHR2-FOR and Bgl II-PA for verification of its presence.

#### Growth analysis

Transgenic fish and their non-transgenic F2 siblings were reared until 3 months of age in a closed water circulation system comprised of 15 L aquariums. Eighteen fish from each group were used. Water quality was monitored once a day, and temperature, pH, nitrogen compounds and photoperiod were maintained according to zebrafish requirements (Westerfield 1995). Fish were fed with high-protein (47.5%) ration twice a day, until apparent satiety. At 45, 60, 75 and 90 days fish were anesthetized (Tricaine, 0.1 mg/mL) for performing weighing. Unfortunately, data from 75 days were lost and weight could not be analysed at this time point.

#### Gene expression

For gene expression analysis, 45-day-old transgenic fish and their non-transgenic siblings were used. For

GH expression, total RNA was extracted from the pituitary, and for analysis of remaining genes extraction was from muscle, using TRIzol (Invitrogen, Brazil) method according to the manufacturer's instructions. Extracted RNA was treated with DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Brazil), according to the manufacturer's recommendations, and used as a target for cDNA synthesis through a High Capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Brazil), following the manufacturer's instructions.

Gene expression was analyzed through quantitative Real Time PCR (qPCR). Each sample ( $n = 5$ ) was analyzed in triplicate. Specific primers for each gene (Table 1) were drawn with software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Brazil), from sequences available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). qPCR reactions were performed in a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Brazil) using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen, Brazil). Serial dilutions were performed for all primers in order to determine the qPCR reaction efficiency. PCR conditions were 50°C/2 min, 95°C/2 min, followed by 40 cycles of 95°C/15 s and 60°C/30 s. Target gene expression was normalized by the expression of the elongation factor 1 alpha ( $ef1\alpha$ ) gene, which did not vary significantly among experimental groups (not showed data). It is worth noting that in order to differentiate endogenous and exogenous GHR expression in transgenic animals, two pairs of primers

**Table 1** Gene-specific primers designed using sequences available at GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

Gene	Forward	Reverse	GenBank
GH	5'-aagatcagtggtcaaaaggttctact-3'	5'-ttaaggcaagaatctatcagacagaca-3'	NM001020492.2
GHRa	5'-tgctgtgcgctacaataatgg-3'	5'-gctctgcgcaaaaggctgatagaaa-3'	EU649774.1
JAK2	5'-ctaccgccccgaagtg-3'	5'-cgtagtccatgagctgtga-3'	NM131087.1
STAT5.1	5'-aaattggcggcatcactatagc-3'	5'-ccttcccctgctttgtagg-3'	NM194387.1
IGF-I	5'-caggcaaatcaccagatctc-3'	5'-tttgggtcctggaatatctgt-3'	NM131825.2
SOCS1	5'-ctccgttttaggatgaggaat-3'	5'-cattgtgcagtggtcaagtctgata-3'	BC077158.1
SOCS3	5'-ctggtacgatcgtgatcca-3'	5'-ggcaagaatggcgctca-3'	NM_199950.1
myf5	5'-tccaatggcctgcaaa-3'	5'-cggcgtccaccgtact-3'	AF270789.1
myod	5'-ggagcgaattccacagagact-3'	5'-gtgccctccgtactga-3'	BC114261.1
myog	5'-ggccgctaccttgagagaga-3'	5'-gagcctcaaaagcctcgtt-3'	AF202639.1
Acta1	5'-tctgtccacctccagagat-3'	5'-gatggacctgcctcgtcga-3'	AF180887.1
myl2	5'-tgagagccatgatcaaggaa-3'	5'-tggtaggaaaacggtgaagt-3'	BC045520.1
myhc4	5'-gcgcgctgacatttctga-3'	5'-cagcgtcacggcttttg-3'	AY921650.1
GHR	5'-ttccgctcgcctagct-3'	5'-gggaaagccaagtctcagat-3'	EU649774.1
DsRed	5'-ctggacatcacctcccacaac-3'	5'-ctcggcgcgctcgtact-3'	
$ef1\alpha$	5'-gggcaaggctcctcaa-3'	5'-cgctcggcctcagttg-3'	NM131263.1

were drawn for this gene, one that amplifies at the non-coding 3' region (referred to in this work as GHRa) and therefore do not amplify exogenous GHR, and another that amplifies at the coding region of the gene (denominated GHR).

#### Histological analysis

Six 45-day-old transgenic and non-transgenic fish were anesthetized (Tricaine, 0.1 mg/mL) and sacrificed in ice for skeletal muscle tissue collection. Samples were immediately fixed in Karnovsky solution (glutaraldehyde 2.5%, paraformaldehyde 2%, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) and preserved in 70% ethanol. Samples were dehydrated with a series of ethanol concentrations (80, 95 and 100%) and soaked in resin (Historesin—Leica Instruments GmbH, Germany), according to the manufacturer's recommendations. Transverse histological sections (4  $\mu$ m) of muscle fibers were obtained through a glass-razor microtome. Sections were stained through the hematoxylin-eosin (HE) method. Fiber diameter was determined using a microscope coupled to an image analyzer. The area of white muscle fibers was measured and fiber diameter determined by the formula  $D = 2 A^{0.5} \pi^{-0.5}$  (Valente et al. 1999). Fibers were classified according to their diameter as follows: <16  $\mu$ m (thin fibers) and >16  $\mu$ m (thick fibers).

#### Statistical analysis

Growth data was analyzed with one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Variation in proportion of muscle fibers was analyzed through  $r \times c$  ( $2 \times 2$ ) table at a 5% significance level, with a Chi-square test using Yates correction. For gene expression analysis, the relative quantification method was used in software REST (Pfaffl et al. 2002), performing paired comparisons between transgenic and non-transgenic fish. Reference samples in each paired comparison were always the non-transgenics. The adopted alpha was 0.05 and results were expressed as median  $\pm$  standard error (SE).

## Results

Transgenic zebrafish were produced by co-injection in recently fertilized eggs at the one-cell stage,

using MYO-RED and MYO-GHR constructs at an equimolar ratio. From four DsRed positive F0 individuals reproduced, only one male was transmitting both constructs to descendants in a Mendelian manner, probably integrated in the same chromosome. This fish was considered the transgenic line founder. Expression of the red fluorescent protein in skeletal muscle was observed under UV light (Fig. 1a). Presence of the MYO-GHR construct in F1 was confirmed by PCR. After reproduction of F1 fish with non-transgenic animals, it was confirmed that the transgenes were being transmitted together to F2, since every animal that presented expression for DsRed was PCR-positive for the MYO-GHR transgene. Animals without fluorescence did not possess the MYO-GHR transgene, indicating that segregation of the two transgenes was not occurring.

Growth analysis of F2 transgenic animals revealed no significant difference in relation to non-transgenics (Fig. 2). However, in the expression analysis it was verified that the GHR of transgenic fish was over 100 times more expressed in muscle when compared to non-transgenic animals ( $n = 5$ ). No significant difference in GH expression was observed between transgenic and non-transgenic fish (Fig. 3a). On the other hand, a significant induction of over 2.5 times in GHRa expression was observed in transgenics when compared to non-transgenics (Fig. 3a). Also, a significant reduction in STAT5.1 and IGF-I gene expression of over 70 and 60%,

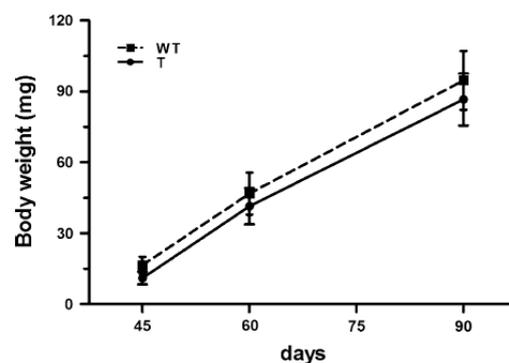
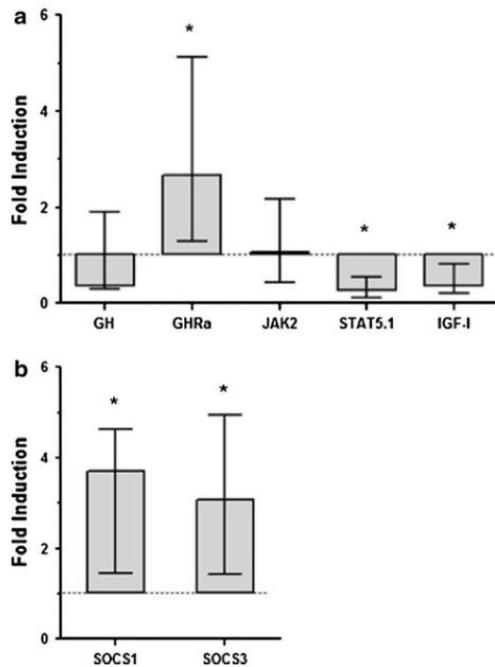


Fig. 2 Growth of transgenic (T) and wild type (WT) zebrafish (*Danio rerio*)

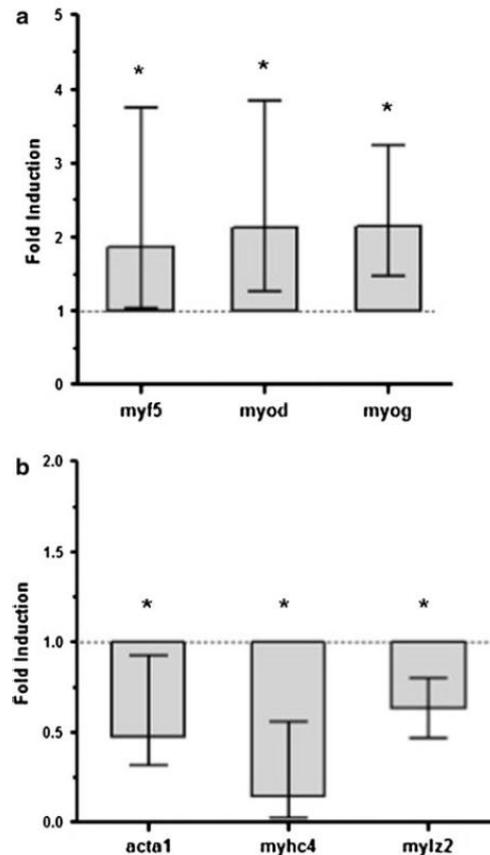


**Fig. 3** Relative gene expression comparing transgenic and wild type zebrafish (*Danio rerio*). **a** Somatotrophic axis-related genes. **b** SOCS1 and SOCS3 genes. Wild type were considered controls, where gene expression = 1 (dashed line). Asterisks represent statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). In all cases  $n = 5$

respectively, was observed in the transgenic animals (Fig. 3a).

Regarding GHR regulator genes, a significant increase of approximately three times in SOCS1 and SOCS3 expression was encountered in transgenic fish when compared to non-transgenics (Fig. 3b). Additionally, the expression of all MRF genes analysed (myod, myf5 and myog) was two times higher in transgenic fish than in non-transgenic animals (Fig. 4a). However, expression of genes coding for muscle proteins was significantly reduced in transgenic animals (Fig. 4b).

Histological analysis of the mean diameter of muscle fibers showed that the number of fibers with diameter inferior to 16  $\mu\text{m}$  significantly increased in transgenic animals in relation to non-transgenics (Fig. 5), which apparently evidences hyperplasic muscle growth in these fish.

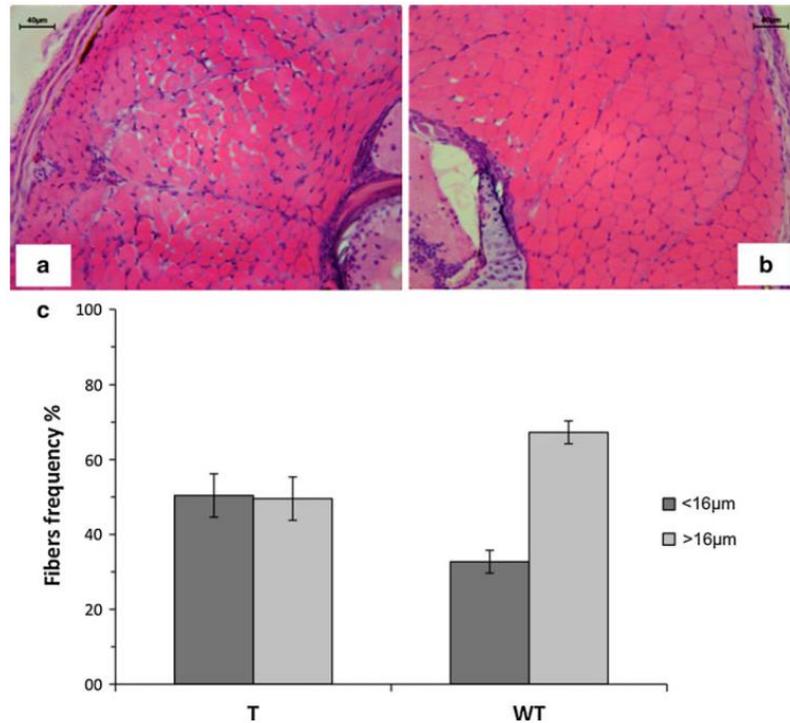


**Fig. 4** Relative gene expression comparing transgenic and wild type zebrafish (*Danio rerio*). **a** Myogenic regulator factor genes. **b** Genes coding for structural muscle proteins. Wild type were considered controls, where gene expression = 1 (dashed line). Asterisks represent statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). In all cases  $n = 5$

## Discussion

The production of genetically modified fish models, especially for GH, is an important tool for growth studies. Recently, our group produced a lineage of transgenic zebrafish overexpressing the GH gene, which presented accelerated growth (Figueiredo et al. 2007a, b). However, many studies performed on this lineage show important physiological and biochemical alterations, demonstrating that accelerated growth comes at a high cost (Rosa et al. 2008, 2010, 2011). This has also been observed in other

**Fig. 5** **a** Muscle histological section from transgenic zebrafish. **b** Muscle histological section from wild type zebrafish. **c** Proportion of thin (<16  $\mu\text{m}$ ) and thick (>16  $\mu\text{m}$ ) muscle fibers from transgenic (*T*) and wild type (*WT*) zebrafish (*Danio rerio*). Chi-square with Yates correction = 12.62,  $df = 1$  ( $P < 0.01$ )



transgenic animals overexpressing GH (Cook et al. 2000; Herbert et al. 2001; Bartke et al. 2002; McKenzie et al. 2003). Although a higher growth can be obtained by GH overexpression, these evidences suggest that it is necessary to pursue alternative methods to obtain the desired growth without the collateral effects of excessive circulating hormones.

The increase in knowledge on GH intracellular signalling has permitted the development of new paradigms in genetic manipulation with the purpose of growth acceleration. With the objective of restraining actions of the somatotrophic axis signalling to a tissue of interest and therefore decrease its collateral effects, in the present work we developed a transgenic fish lineage overexpressing GHR in a muscle-specific manner. For such, we used a genetic construct consisting of the *myl2* promoter directing GHR expression in zebrafish. Additionally, we co-injected a second genetic construct that induced expression of a reporter gene (DsRed) under control of the same promoter. This strategy permitted in vivo identification of the muscle-specific effect of the

*myl2* promoter (Fig. 1a). It has been demonstrated in previous works that this promoter is efficient in directing gene expression specifically to zebrafish skeletal muscle (Xu et al. 1999; Ju et al. 2003; Funkenstein et al. 2007).

Skeletal muscle growth in fish occurs through proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells, responsible for hyperplasic and hypertrophic growth of muscle fibers (Johnston 1999; Rowlerson and Veggetti 2001), being this process regulated by myogenic regulatory factors (MRFs) (Sabourin and Rudnicki 2000). Hypertrophy (increase in myofiber size) and hyperplasia (increase in number of myofibers) are the two main mechanisms that promote augment in muscle mass. These mechanisms are apparently regulated by GH and IGF-I (Velloso 2008), with the effects of GH growth promotion regulated mainly by IGF-I (LeRoith et al. 2001).

The effects of endocrine and/or autocrine/paracrine GH and IGF-I can have distinct actions in the regulation of muscle mass (Velloso 2008). It was demonstrated in mice that knocking out the GHR

gene provokes not only a reduction in absolute weight of muscle tissue but also in the muscle weight/body weight relation, when compared to non-transgenic animals (Sotiropoulos et al. 2006). In another study, Kim et al. (2005) demonstrated that mice with the IGF-I receptor (IGF-IR) knocked out specifically in muscle tissue presented myofibers with reduced diameter and smaller muscles than non-transgenic animals, suggesting that GH may not be directly involved with increase in muscle mass.

In the present study, GHR transgenic zebrafish were compared to their non-transgenic siblings in terms of growth, skeletal muscle structure and expression of genes related to the somatotrophic axis and myogenesis. Growth analysis did not reveal significant differences between experimental groups (Fig. 2), despite the fact that transgenics expressed the GHR gene approximately 100 times more than non-transgenic animals. In a similar study, Ishtiaq Ahmed et al. (2011) observed accelerated growth in transgenic zebrafish overexpressing GHR that had been constitutively activated due to the introduction of leucine zippers in the molecule's structure. In this case, the somatotrophic axis remained activated in a GH-independent manner in all tissues due to the ubiquitous CMV promoter used. Therefore, it is probable that the liver of these animals is producing a higher amount of IGF-I, as observed in the expression analysis of this gene in transgenic embryos. Differently, in our model the muscle-specific expression of GHR probably did not alter plasmatic IGF-I concentration, maintaining body growth at normal levels.

In order to evaluate the intracellular signalling level of GH in muscle tissue of our transgenic model, we analyzed the expression of the main genes of the somatotrophic axis. Results shown in Fig. 3a indicate that the muscle-specific overexpression of GHR caused, by contraries, a significant decrease in signalling of the somatotrophic axis, evidenced by the reduction in IGF-I and Stat5.1. In addition, it was observed an increase in GHRa (endogenous) gene expression, which can be attributed to a tissue response to the signalling decrease. The question that arises here is: if receptor expression increases, in what manner is the somatotrophic axis signalling affected?

It has been demonstrated that proteins of the SOCS family have an important function in the regulation of GH intracellular signalling (Herrington and Carter-Su

2001; Zhu et al. 2001; Greenhalgh and Alexander 2004; Croker et al. 2008; Walters and Griffiths 2009). Recently, Studzinski et al. (2009) verified that SOCS1 and SOCS3 are the main modulators of the somatotrophic axis in the liver of transgenic homozygous zebrafish of the F0104 lineage. In this manner, the present work analyzed SOCS1 and SOCS3 expression in the muscle tissue of GHR-transgenic fish. Results showed a significant increase in the expression of both genes (Fig. 3b), indicating that these proteins may also have a modulatory function in the GH intracellular signalling pathway in muscle. The hypothesis raised by Studzinski et al. (2009) for explaining the increase of SOCS1 and 3 proteins in transgenic homozygotes of the F0104 lineage was that since these animals express twice the amount of exogenous GH, they activated the signalling pathway above the limit supported by their energetic budget. This could be occurring to the transgenic lineage developed here, in the muscle of fish overexpressing GHR.

IGF-I has been recognized as a hypertrophic agent (Glass 2003; Clemmons 2009). DeVol et al. (1990) demonstrated that IGF-I expression increases during compensatory hypertrophy provoked experimentally in rats. IGF-I increases muscle mass by stimulus of the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/kinase B protein (Akt) pathway, resulting in activation of protein synthesis (Bodine et al. 2001; Rommel et al. 2001; Singleton and Feldman 2001) associated with hypertrophy (Glass 2005; Clemmons 2009). In order to verify if this pathway was blocked we analyzed the expression of genes that codify for some of the main structural muscle proteins. The results obtained showed that the alpha actin 1 (Acta1), myosin heavy chain 4 (myhc4) and myl2 genes presented significantly reduced expression (Fig. 4b). For evaluating if the degree of hypertrophy was actually altered in the transgenic fish produced due to the low expression of the IGF-I gene, we performed histological analyses of muscle tissue. Figure 5 shows that transgenic fish presented a significantly higher percentage of smaller diameter fibers in relation to non-transgenics. Skeletal muscle consists of a mixture of smaller and larger diameter fibers, with smaller fibers being initial stages of the larger fibers, and utilized as a diagnosis of hyperplasic growth when present in elevated numbers (Weatherly and Gill 1987). The statistical analysis of fiber proportion by Chi-square

test showed a significant difference between transgenics and non-transgenics ( $P < 0.01$ ), indicating that muscle growth of the transgenic fish produced in this work was altered towards hyperplasia.

As mentioned beforehand, muscle growth in fish is regulated by MRFs (Hawke and Garry 2001). MyoD and myf5, primary MRFs, are responsible for proliferation and differentiation of myoblasts (Emerson 1990; Watabe 1999; Sabourin and Rudnicki 2000). On the other hand myog, considered a secondary MRF, controls muscle differentiation at a later stage through regulation of myoblast fusion and consequent formation of myotubes (Megenev and Rudnicki 1995; Rudnicki and Jaenish 1995). Due to these reasons and the tendency towards hyperplastic growth observed in histological sections, the expression of genes that codify for myf5, myoD and myog was analyzed. As a result, a significant increase in the expression of these genes in transgenic animals was observed (Fig. 4a). This indicates that in some way, even without activation of the somatotrophic axis, overexpression of muscle GHR led to an increased expression of MRF genes. It is worth highlighting that, even GHR-overexpressing transgenics have the somatotrophic axis signalling decreased in muscle, it is probably that these animals preserve a normal production of hepatic IGF-I. Thus, a new question arises: could endocrine IGF-I be acting in muscle and therefore be compensating for decrease in IGF-I produced in an autocrine/paracrine manner?

It is known that besides the PI3K/Akt intracellular signalling pathway, which is more related to the differentiation process and protein synthesis (Coolican et al. 1997; Clemmons 2009), IGF-I also activates the mitogen- and extracellular signal-regulated kinase (MEK)/extracellular-regulated kinase (ERK) pathway, related to the proliferative process (Clemmons 2009). This hormone also activates the STAT3 pathway, associated to the negative feedback mechanism of IGF-I (Himpe and Kooijman 2009). The MEK/ERK pathway is also an alternative GH route (Herrington and Carter-Su 2001), being also related to the proliferative process. There are various evidences that GH intracellular signalling utilizes this pathway independently of JAK2 (Brooks et al. 2008), and therefore is not regulated by SOCS proteins. It has been demonstrated that SOCS1 and 3 proteins, besides modulating GH intracellular signalling by inhibiting JAK2, can also regulate the

signalling of IGF-I and insulin through the action of these proteins on the insulin receptor substrate (IRS) (Dominici et al. 2005) and on JAK2, controlling the PI3K/Akt and the JAK/STAT pathways, respectively (Himpe and Kooijman 2009). On the other hand, SOCS proteins do not regulate the proliferative MEK/ERK signalling pathway for GH, as well as for IGF-I (Himpe and Kooijman 2009). In our model, it is likely that the MEK/ERK pathway presents an increased activation level due to the probable blockage of the PI3K/Akt and JAK/STAT pathways caused by SOCS1 and 3 proteins. Coolican et al. (1997), utilizing inhibitors for the PI3K/Akt and MEK/ERK pathways in rat myoblasts, demonstrated that when one pathway is blocked, activation increases in another. Since the MEK/ERK pathway is proliferative, it is likely that the increase in MRF genes expression observed in transgenics of the present work is related to a possible increase in the activation of this pathway.

Based on our results on one line of transgenic fish, we can conclude that the increase in GHR expression in muscle tissue does not necessarily implies an elevation of autocrine/paracrine IGF-I production. The PI3K/Akt pathway is apparently regulated by SOCS proteins, which most likely also regulate intracellular signalling induced by circulating IGF-I. Furthermore, the decrease in IGF-I signalling led to a reduction in the synthesis of some of the main muscle proteins, causing a diminution in muscle fiber diameter that characterized hyperplastic growth. Therefore, it is evident that GHR represents a key point in the muscle growth process, being partially used to activate the IGF-I pathway that culminates in protein synthesis and hypertrophic growth (PI3K), and partially used to activate the MEK/ERK pathway, which culminates in the activation of the MRFs responsible for myoblast proliferation. In this sense, hypertrophy and hyperplasia seems to follow two different pathways, both of them triggered by GHR activation, but regulated by different mechanisms.

In order to obtain a balanced hypertrophic/hyperplastic muscle growth, it seems to be necessary that both the PI3K/Akt and MEK/ERK pathways be activated in an equivalent manner. Perhaps, as proposed by Ishtiaq Ahmed et al. (2011), an interesting alternative could be to associate transgenics to a molecular design of constitutively activated proteins in specific tissues. In the case of muscle

tissue, the design of GH or IGF-I receptors resistant to the modulatory action of SOCS proteins could favour the proliferation of myoblasts accompanied by an adequate protein synthesis in order to sustain elevated hypertrophic growth.

**Acknowledgments** This work was supported by Brazilian CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, proc. no. 471437/2009-3) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## References

- Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C (1993) Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74:237–244
- Baker BJ, Akhtar LN, Benveniste EN (2009) SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity. *Trends Immunol* 30:392–400
- Bartke A, Chandrashekar V, Bailey B, Zaczek D, Turyn D (2002) Consequences of growth hormone (GH) overexpression and GH resistance. *Neuropeptides* 36:201–208
- Björnsson BT, Johansson V, Benedet S, Einarsdóttir IE, Hildahl J, Agustsson T, Jónsson E (2002) Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiol Biochem* 27:227–242
- Blackwell T, Weintraub H (1990) Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250:1104–1110
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3:1014–1019
- Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ (2008) Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1984–1989
- Butler AA, LeRoith DL (2001) Control of growth by the somatotrophic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu Rev Physiol* 63:141–164
- Canosa LF, Chang JP, Peter RE (2007) Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *Gen Comp Endocrinol* 151:1–26
- Clemmons DR (2009) Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab* 20(7):349–356
- Cook JT, McNiven MA, Richardson GF, Sutterlin AM (2000) Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188:15–32
- Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ, Florini JR (1997) The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 272(10):6653–6662
- Crocker BA, Kiu H, Nicholson SE (2008) SOCS regulation of the JAK/STAT signaling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19:414–422
- Dahm R, Geisler R (2006) Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol* 8:329–345
- Daughaday WH (2000) Growth hormone axis overview-somatomedin hypothesis. *Pediatr Nephrol* 14:537–540
- Devlin RH, Yesaki TY, Biagi CA, Donaldson EM, Swanson P, Chan WK (1994) Extraordinary salmon growth. *Nature* 371:209–210
- Devlin RH, Biagi CA, Yesaki TY (2004) Growth, viability and genetic characteristics of GH transgenic coho salmon strains. *Aquaculture* 236:607–632
- Devlin RH, Sundstro LF, Muir WM (2006) Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments of transgenic fish. *Trends Biotechnol* 24:89–97
- DeVol DL, Rotwein P, Sadow JL, Novakofski J, Bechtel PJ (1990) Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. *Am J Physiol* 259:E89–E95
- Dominici FP, Argentino DP, Muñoz MC, Miquet JG, Sotelo AI, Turyn D (2005) Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Horm IGF Res* 15:324–336
- Dunham RA (2004) Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches. CABI Publishing, Oxford
- Emerson CP (1990) Myogenesis and developmental control genes. *Curr Opin Cell Biol* 2:1065–1075
- Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Proietti MC, Marins LF (2007a) The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2:228–233
- Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Marins LF (2007b) Improving the production of transgenic fish germline: in vivo mosaicism evaluation by GFP transgene co-injection strategy. *Genet Mol Biol* 30:31–36
- Funkenstein B, Skopal T, Rapoport B, Rebhan Y, Du SJ, Radaelli G (2007) Characterization and functional analysis of the 5' flanking region of myosin light chain-2 gene expressed in white muscle of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2:187–199
- Glass DJ (2003) Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol* 5:87–90
- Glass DJ (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1974–1984
- Greenhalgh CJ, Alexander WS (2004) Suppressors of cytokine signalling and regulation of growth hormone action. *Growth Horm IGF Res* 14:200–206
- Hawke TJ, Garry DJ (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91:534–551
- Herbert NA, Armstrong JD, Björnsson BT (2001) Evidence that growth hormone-induced elevation in routine metabolism of juvenile Atlantic salmon is a result of increased spontaneous activity. *J Fish Biol* 59:754–757

- Herrington J, Carter-Su C (2001) Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab* 12(6):252–257
- Himpe E, Kooijman R (2009) Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) pathway. *Biofactors* 35(1):76–81
- Ishiaq Ahmed AS, Xiong F, Pang S-C, He M-D, Waters MJ, Zhu Z-Y, Sun Y-H (2011) Activation of GH signaling and GH-independent stimulation of growth in zebrafish by introduction of a constitutively activated GHR construct. *Transgenic Res* 20(3):557–567
- Janssen JAMJL (2009) Advantages and disadvantages of GH/IGF-I combination treatment. *Rev Endocr Metab Disord* 10:157–162
- Johansen KA, Overturf K (2005) Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar Biotechnol* 7:576–587
- Johnston IA (1999) Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177:99–115
- Ju B, Chong SW, He J, Wang X, Xu Y, Wan H, Tong Y, Yan T, Korzh V, Gong Z (2003) Recapitulation of fast skeletal muscle development in zebrafish by transgenic expression of GFP under the mylz2 promoter. *Dev Dyn* 227:14–26
- Kim H, Barton E, Muja N, Yakar S, Pennisi P, LeRoith D (2005) Intact insulin and insulin-like growth factor-I receptor signaling is required for growth hormone effects on skeletal muscle growth and function in vivo. *Endocrinology* 146(4):1772–1779
- Koumans JTM, Akster HA (1995) Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 110:3–20
- Lassar A, Buskin JN, Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD, Weintraub H (1989) MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58:823–831
- LeRoith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A (2001) The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 22(1):53–74
- McKenzie DJ, Martínez IR, Morales A, Acosta J, Taylor EW, Steffensen JF, Estrada MP (2000) Metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance of growth hormone transgenic tilapia (*Oreochromis sp.*). *Comp Biochem Physiol* 126:S66
- McKenzie DJ, Martínez R, Morales A, Acosta J, Morales R, Taylor EW, Steffensen JF, Estrada MP (2003) Effects of growth hormone transgenesis on metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance in tilapia hybrids. *J Fish Biol* 63:398–409
- Megeney LA, Rudnicki MA (1995) Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* 73:723–732
- Mori T, Hiraka I, Kurata Y, Kawachi H, Mano N, Devlin RH, Nagoya H, Araki K (2007) Changes in hepatic gene expression related to innate immunity, growth and iron metabolism in GH-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou*) by cDNA subtraction and microarray analysis, and serum lysozyme activity. *Gen Comp Endocrinol* 151:42–54
- Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB (1989) Interactions between heterologous helix–loop–helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537–544
- Nam YK, Noh JK, Cho YS, Cho HJ, Cho KN, Kim CG, Kim DS (2001) Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res* 10:353–362
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36
- Pitkänen TI, Krasnov A, Teerijoki H, Mölsä H (1999) Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). I. Growth response to various GH constructs. *Genet Anal* 15:91–98
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001) Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3:1009–1013
- Rosa CE, Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Monserrat JM, Marins LF (2008) Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 149:209–214
- Rosa CE, Kuradomi RY, Almeida DV, Lanes CFC, Figueiredo MA, Dytz AG, Fonseca DB, Marins LF (2010) GH overexpression modifies muscle expression of anti-oxidant enzymes and increases spinal curvature of old zebrafish. *Exp Gerontol* 45:449–456
- Rosa CE, Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Marins LF (2011) Genotype-dependent gene expression profile of the antioxidant defense system (ADS) in the liver of a GH-transgenic zebrafish model. *Transgenic Res* 20:85–89
- Rowlerson A, Veggetti A (2001) Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Johnston IA (ed) *Muscle development and growth*. Academic Press, London, pp 103–140
- Rudnicki MA, Jaenish R (1995) The MyoD family of transcription factors and skeletal muscle myogenesis. *Bioessays* 17:203–209
- Sabourin LA, Rudnicki MA (2000) The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 57:16–25
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Singleton JR, Feldman EL (2001) Insulin-like growth factor-I in muscle metabolism and myotherapies. *Neurobiol Dis* 8:541–554
- Sjögren K, Jansson J-O, Isaksson OGP, Ohlsson C (2002) A model for tissue-specific inducible insulin-like growth factor-I (IGF-I) inactivation to determine the physiological role of liver-derived IGF-I. *Endocrine* 19(3):249–256
- Sotiropoulos A, Ohanna M, Kedzia C, Menon RK, Kopchick JJ, Kelly PA, Pende M (2006) Growth hormone promotes skeletal muscle cell fusion independent of insulin-like growth factor I up-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7315–7320

- Studzinski AL, Almeida DV, Lanes CF, Figueiredo MA, Marins LF (2009) SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the somatotrophic axis in liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Gen Comp Endocrinol* 161:67–72
- Valente LMP, Rocha E, Gomes EFS, Silva MW, Oliveira MH, Monteiro RAF, Fauconneau B (1999) Growth dynamics of white and red muscle fibres in fast- and slow-growing strains of rainbow trout. *J Fish Biol* 55:675–691
- Vanderkuur JA, Wang X, Zhang L, Campbell GS, Allevato G, Billestrup N, Norstedt G, 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, 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
- Velloso CP (2008) Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *Br J Pharmacol* 154:557–568
- Vielkind JR (1992) Medaka and zebrafish: ideal as transient and stable transgenic systems. In: Hew CL, Fletcher GL (eds) *Transgenic fish*. World Scientific, Singapore
- Walters TD, Griffiths AM (2009) Mechanisms of growth impairment in pediatric Crohn's disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6:513–523
- Watabe S (1999) Myogenic regulatory factors and muscle differentiation during ontogeny in fish. *J Fish Biol* 55:1–18
- Watabe S (2001) Myogenic regulatory factors. In: Johnston IA (ed) *Muscle development and growth*. Academic Press, London, pp 19–41
- Waters MJ, Hoang HN, Fairlie DP, Pelekanos RA, Brown RJ (2006) New insights into growth hormone action. *J Mol Endocrinol* 36:1–7
- Weatherly AH, Gill HS (1987) *The biology of fish growth*. Academic Press, London
- Westerfield M (1995) *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish *Danio rerio**, 3rd edn. University of Oregon Press, Eugene
- Xu Y, He J, Tian HL, Chan CH, Liao J, Yan T, Lam TJ, Gong Z (1999) Fast skeletal muscle-specific expression of a zebrafish myosin light chain 2 gene and characterization of its promoter by direct injection into skeletal muscle. *DNA Cell Biol* 18:85–95
- Zbikowska HM (2003) Fish can be first—advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Res* 12:379–389
- Zhu T, Goh ELK, Graichen R, Ling L, Lobie PE (2001) Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal* 13:599–616