

Hormônio de crescimento (GH) altera o padrão de resistência à hipoxia em peixes geneticamente modificados.

BRUM, Rayanne Johan¹; ALMEIDA, Daniela Volcan²; MARINS, Luis Fernando^{2,3}

¹Universidade Federal de Rio Grande - FURG, Ciências Biológicas- Bacharelado; ²Universidade Federal de Rio Grande - FURG, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas:Fisiologia Animal Comparada; ³ Universidade Federal de Rio Grande - FURG, Instituto de Ciências Biológicas. dqmluf@furg.br

1 INTRODUÇÃO

O hormônio do crescimento (GH), também denominado de somatotropina, é um hormônio polipeptídico, produzido e secretado na adenohipófise, o qual intensifica praticamente todos os aspectos da captação de aminoácidos e da síntese de proteínas pelas células, reduzindo ao mesmo tempo a degradação das proteínas. Esse hormônio também afeta o metabolismo de gorduras e carboidratos exercendo suas funções tanto diretamente sobre os órgãos quanto na estimulação da produção de fatores de crescimento. Em peixes, os efeitos do GH são conhecidos através dos estudos de administração direta do hormônio ou transferência do gene por manipulação genética (Macleán et al. 2002). Esses estudos mostram que os principais efeitos do GH afetam não somente o crescimento, mas também características fisiológicas e comportamentais como eficiência na conversão alimentar, apetite, composição corporal, imunidade além de estar envolvido nos processos de reprodução, osmorregulação e tolerância à hipoxia (Hallerman et al. 2007).

A hipoxia (baixa concentração de oxigênio no ambiente) é um fator ambiental importante, a qual pode promover uma rápida alteração adaptativa na organização metabólica dos organismos. Sabe-se que os peixes, são animais os quais sobrevivem a variáveis níveis de oxigênio, característica essa que provém da capacidade de adaptações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais destes organismos. Uma vez que o ambiente onde esses indivíduos habitam sofra essa alteração, ocorrem mudanças em suas principais vias metabólicas (ciclo de Krebs e glicólise), as quais fornecem ATP para o mesmo. Na glicólise aeróbica, em condições normais de suprimento de oxigênio (normoxia), o principal produto é o piruvato, o qual é destinado ao ciclo de Krebs para que se torne acetil-CoA e, posteriormente em citrato, nas mitocôndrias por ação da enzima citrato sintase. Em condições de baixo suprimento de oxigênio (hipoxia) ou em células sem mitocôndrias, o produto final da glicólise, denominada anaeróbica, é o lactato. Este é produzido pela ação da enzima lactato desidrogenase (Lehninger, 2008).

Desta forma, o presente estudo busca esclarecer se o excesso de GH produzido pela transgenia afeta a resistência dos paulistinhas (*Danio rerio*) à hipoxia.

2 METODOLOGIA

O laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Rio Grande – FURG, onde este estudo foi desenvolvido, possui a aprovação do CQB No. 0112/99, seguindo as normas determinadas pela Instrução Normativa no. 12 (DOU 28/05/98).

O modelo utilizado neste estudo foi peixe transgênico da linhagem de paulistinha (*Danio rerio*) F0104 desenvolvida por (Figueiredo, et al. 2007), a qual carrega o transgene contendo o cDNA do GH do peixe-rei (*Odontesthes argentinensis*) sobre controle transcricional do promotor da β -actina de carpa (*Cyprinus carpio*) (Marins, et al. 2002). Todos os exemplares, transgênicos (T) e não transgênicos (NT), foram provenientes do biotério aquático do Laboratório de Biologia Molecular- ICB/FURG, onde já existe um cultivo estabelecido. Os peixes não-transgênicos (controles), foram obtidos por meio do cruzamento de animais transgênicos com animais não-transgênicos reprodutores.

No primeiro momento analisou-se a resistência à hipoxia (5% de O₂), de peixes não-transgênicos (NT) e transgênicos (T) juvenis, num período de 12 horas. Foram utilizados sete indivíduos para cada grupo (normoxia e hipoxia). Em recipientes de vidro de 200 mL, em duplicata estes animais foram separados e a concentração de oxigênio foi determinada através de um oxímetro portátil (*Digital Instruments*). A contagem dos indivíduos mortos foi feita a cada 30 minutos e a morte foi considerada apenas quando o peixe perdia o movimento opercular e a sua capacidade de reação ao toque.

Após determinada a resistência de hipoxia destes animais, foi realizado um novo experimento nas mesmas condições, a fim de avaliar o nível de expressão dos genes citrato sintase (CS) e lactato desidrogenase (LDH), envolvidos na tolerância a baixos níveis de oxigênio.

Seis animais de cada grupo foram expostos a seis horas de hipoxia e logo após foram anestesiados com triclaína em concentração letal (0.6 mg/ml) por 5 min. Todos os procedimentos seguem as normas descritas no guia “AVMA Guidelines on Euthanasia”.

Para a análise da expressão dos genes selecionados utilizou-se o método quantitativo de PCR em tempo real. O RNA total foi extraído dos animais inteiros, com Trizol Reagent (Invitrogen, Brasil). Para a confecção do cDNA foi utilizado a Superscript III RNase H⁻ RT (Invitrogen, Brasil). O cDNA sintetizado foi amplificado por PCR utilizando-se *primers* específicos para os genes de interesse (CS- F: 5'-CACCATGCTGGACAACTTTCC-3' e R: 5'-GATGGCGGCGCTGAACT-3'; LDH- F: 5'-AGCGGTTTGCCAGGAA-3' e R: 5'-TCCCAACTTCTCCCATCAA-3'). Os dados de expressão foram normalizados pela expressão dos genes normalizadores β -actina (BAC- 5'-TCTGTCCACCTTCCAGCAGAT-3' e 5'-GATGGACCTGCCTCGTCGTA-3') e o Fator de alongação 1 alfa (EF1a- F: 5'-GGCAAGGGCTCCTTCAA-3' e R: 5'-CGCTCGGCCTTCAGTTTG-3').

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA, seguida por testes de comparação de médias *a posteriori* ($P < 0,05$). Previamente, os pressupostos do teste ANOVA (normalidade e homogeneidade de variâncias) foram determinados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A transgenia para o gene do GH apresenta inúmeros efeitos colaterais, dentre estes está o aumento da taxa metabólica imposto contínuo crescimento (Mckenzie et al., 2003). Neste estudo, os peixes transgênicos juvenis da linhagem F0104 expostos à baixa concentração de oxigênio apresentaram uma menor taxa de sobrevivência (NT:71% a T:7%) em relação aos indivíduos não-transgênicos (Fig. 1). A menor tolerância dos peixes transgênicos à hipoxia deve-se ao fato de que estes animais apresentam uma alta taxa de consumo de oxigênio (Rosa et al., 2008) e uma maior demanda de energia para a manutenção da homeostasia.

Uma das principais vias metabólicas utilizadas para suprir o aumento da demanda energética é dependente do oxigênio (ciclo de Krebs) para a produção de ATP. A citrato sintase (CS) é uma enzima chave nesta via, sendo responsável pela condensação de molécula de acetil-CoA e oxaloacetato para formar citrato. A expressão do gene da CS (Fig. 2), no presente estudo, foi significativamente diminuída (64% e 67%) por efeito de hipoxia tanto nos peixes transgênicos como nos não-transgênicos, respectivamente. Quando analisamos o efeito sinérgico do GH e da hipoxia no grupo transgênico exposto à hipoxia encontramos uma diminuição de 54%. Esses resultados indicam que o estresse causado pela hipoxia altera a via metabólica dependente de oxigênio, desta forma estes organismos podem alterar o substrato energético e ativar a via anaeróbica (Sangiao-Alvarellos et al., 2005). O lactato é sintetizado pela conversão de piruvato através da ação catalítica da lactato desidrogenase (LDH). Neste estudo, os dados de expressão dessa enzima não foram modificados significativamente tanto por efeito da transgenia como por efeito da hipoxia (Fig. 2). No entanto, acredita-se com um aumento do tempo de exposição ao estresse de baixa concentração de oxigênio poderia tornar esta diferença significativa.

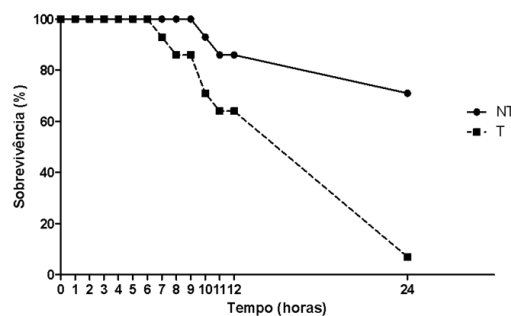


Figura 1- Taxa de sobrevivência (%) de paulistinha (*Danio rerio*) transgênicos (T) e não-transgênicos para o gene do hormônio do crescimento (GH) expostos à hipoxia por 24 horas.

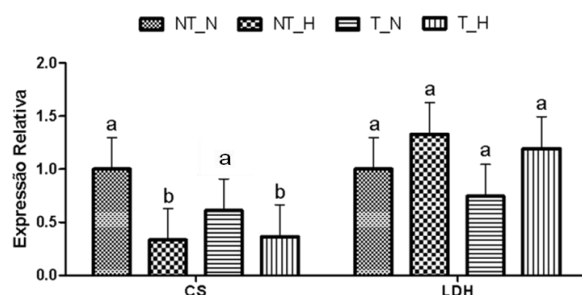


Figura 2 – Expressão relativa dos genes da citrato sintase (CS) e lactato desidrogenase (LDH) em paulistinhas transgênicas para o gene do GH expostas a hipoxia por 6 horas. NT_N: não-transgênicos em condição controle (normoxia); NT_H: não-transgênicos expostos à hipoxia; T_N: transgênicos em condição controle (normoxia); T_H: transgênicos expostos à hipoxia. Letras diferentes indicam diferença estatísticas significantes ($P < 0,05$). Dados são expressos na razão de expressão do gene de interesse pela expressão dos genes normalizadores.

4 CONCLUSÃO

Desta forma concluí-se que o excesso de GH promovido pela transgenia diminui a resistência dos paulistinhas transgênicos para o gene do GH, sugerindo que esses animais não hábeis a alterar o substrato energético, a fim de suprir suas maiores demandas metabólicas.

5 REFERÊNCIAS

1. Maclean, N. *et al.* Transgenic tilapia and the tilapia genome. **Gene** 295, 265-77 (2002).
2. Hallerman, E.M., Mclean, E. & Fleming, I.A. Effects of growth hormone transgenes on the behavior and welfare of aquacultured fishes: A review identifying research needs. **Applied Animal Behaviour Science** 104, 265-294 (2007).
3. Figueiredo, M.D.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V. & Marins, L.F. Improving the production of transgenic fish germlines: in vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. **Genetics and Molecular Biology** 30, 31-36 (2007).
4. Marins, L.F., Iyengar, A., Maclean, N., Levy, J.A. & Sohm, F. Simultaneous overexpression of GH and STAT5b genes inhibits the STAT5 signalling pathway in tilapia (*Oreochromis niloticus*) embryos. **Genetics and Molecular Biology** 25, 293-298 (2002).
5. McKenzie, D.J. *et al.* Effects of growth hormone transgenesis on metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance in tilapia hybrids. **Journal of Fish Biology** 63, 398-409 (2003).
6. Rosa, C.E. *et al.* Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology** 149, 209-14 (2008).
7. Sangiao-alvarellos, S. *et al.* Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus*. **Journal of Experimental Biology** 208, 4291-4304 (2005).
8. Nelson, D.L., Cox, MM. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre-RS: Artmed, 2011.