

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA CONSERVAÇÃO E  
BIOLOGIA EVOLUTIVA**

**Análise do transcrito de etiquetas de sequências  
expressas da hipófise e parte do cérebro do tambaqui  
(*Colossoma macropomum*) e expressão do cDNA do  
hormônio de crescimento em *Pichia pastoris***

**Alexandra Regina Bentes de Sousa**

**Manaus – Amazonas**

**Setembro, 2009**

**ALEXANDRA REGINA BENTES DE SOUSA**

**Análise do transcrito de etiquetas de sequências expressas da hipófise e parte do cérebro do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e expressão do cDNA do hormônio de crescimento em *Pichia pastoris***

**Orientador: Dr. Jorge Ivan Rebelo Porto**

**Co-orientador: Dr. Spartaco Astolfi-Filho**

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

**Manaus, Amazonas**

**Setembro, 2009**

S725 Sousa, Alexandra Regina Bentes de  
Análise transcriptômica de etiquetas de sequências expressas da hipófise e parte do cérebro do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e expressão do hormônio de crescimento em *Pichia pastoris*. / Alexandra Regina Bentes de Sousa.--- Manaus : [s.n.], 2009.  
x, 77 f. : il.

Tese (doutorado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2009  
Orientador: Jorge Ivan Rebelo Porto  
Co-orientador: Spartaco Astolfi-Filho  
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva  
1. Tambaqui. 2. cDNA. 3. ESTs. 4. Hormônio de crescimento. 5. Expressão heteróloga. 6. *Pichia pastoris*. I. Título.

CDD 19. ed. 597.50415

**Sinopse:**

Analisou-se ESTs de uma biblioteca de cDNA da hipófise e parte do cérebro de tambaqui, importante peixe de valor comercial da bacia amazônica, onde foi possível identificar transcritos de importância biotecnológica, como o hormônio de crescimento (GH). Este gene foi posteriormente isolado e subclonado num sistema de expressão utilizando a levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, que expressou e secretou o tGH recombinante.

**Palavras-chave:** tambaqui, cDNA, ESTs, hormônio de crescimento,, Expressão heteróloga, *Pichia pastoris*.

Dedico essa tese aos meus pais, Benigna Bentes e Antonio Sousa, aos meus irmãos e sobrinhos pelo incentivo na realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A todos que direta e indiretamente ajudaram na realização desse trabalho:

A Deus, por ser meu guia, pela força espiritual e luz suficiente para o término desse trabalho.

Aos meus orientadores e mentores Dr. Jorge I. R. Porto e Spartaco Astolfi Filho, pelo imenso apoio, diálogos, incentivo nesta pesquisa, pelas lições e sugestões, sem vocês não seria possível seguir firme na execução dessa tarefa.

Ao Dr. Edmar, pelo apoio no laboratório de proteômica, amizade e ensinamentos sobre proteoma.

A minha família, que na ausência e na presença sempre esteve do meu lado me apoiando e acreditando no meu sucesso.

Aos meus pais, pelas orações, incentivo, por me permitirem dar continuidade aos meus estudos, vocês são muito importantes na minha vida!

As minhas irmãs, irmãos e sobrinhos, pela força, por entenderem minha ausência, pela torcida e por rezarem por mim. Muito obrigada.

À Gabriela Müller, pela ajuda e orientação com a parte da expressão heterológa e sugestões do trabalho.

Ao meu colega e amigo de curso Edson do Carmo Jr., no auxílio prestado, apoio, sugestão e conversas nos experimentos sobre indução gênica, que contribuiu bastante na segunda etapa desta tese.

Ao LTBM do INPA, particularmente, Jacqueline Batista e Kyara Formiga, pelo apoio na infraestrutura, ajuda na utilização dos equipamentos, pela minha estadia nesses 4 anos de laboratório, aos pirados (Giselle, Naiara, Rosa, Fabíola, Iamile, Andréa, Iolanda, Adriel, Larissa e Luci) pelos bons e descontraídos momentos no LTBM.

Ao Laboratório de Tecnologias de DNA da UFAM, nas pessoas de Enedina e Jonson, pela ajuda no sequenciamento dos clones no sequenciador MegaBace, a utilização do laboratório, e aos colegas (Listik, Rogério, Tiago, Juliana, Mirna, Carol, Lívio e Márcia). Aos colegas do Laboratório de Proteoma da UFAM (Anita, Belle, Marcelo e Dr. Edmar) pela ajuda e apoio na montagem do sistema de géis, sou muito grata a vocês.

Ao Laboratório de Citogenética do INPA em especial ao Carlos, Cláudia, Leandra, Eliane e Dra. Eliana, que sempre me auxiliaram em reagentes tirando minha dúvidas e pelas festinhas.

Aos companheiros do curso de genética: Fabíola, Letícia, Mauro, Mariana, Bárbara, Deyla, Edson, Mauro, Suzana (minha amiga dos momentos finais), Carol e outros.

Ao Dr. Sérgio Nozawa, pelo auxílio nas análises e pela utilização da infraestrutura do Laboratório de Bioinformática do Centro Universitário Uninilton Lins.

As minhas amigas da UFAM pelos bons e descontraídos momentos, Andréa Amâncio, Aldi, Francisca, Mika e Duca.

Aos amigos santarenos, em especial as “finas” que sempre me incentivaram e cuidaram de mim nos fins de semana, Andrea, Paula, Adriana, Adriele, Lígia. Também ao Wagner e Everlane, estão para sempre em meu coração!

Aos professores do curso de genética, pelos ensinamentos que contribuíram na minha formação;

À Secretaria da Genética, em especial a Hercília, Alessandra e as coordenadoras do GCBEV, pelo apoio durante o curso.

A Capes pela bolsa concedida.

Ao CNPq e FAPESP, pelo apoio e financiamento ao projeto.

A SEDUC pela minha liberação para fazer este doutorado.

Sou muito grata a todos, perdão se esqueci de citar alguém

**...Valeu a pena! Pois a meta não é prever o futuro, é torná-lo possível.**

A sequência produzida deve ter os quatro A:  
A sequência deve ser Accurate (precisa);  
A sequência deve estar Assembled (montada);  
A sequência deve ser Affordable (de custo exequível);  
A sequência deve ser Accessible (acessível).  
(Francis Collins).

## RESUMO

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, é um peixe de grande valor comercial para região amazônica e representa uma espécie modelo para a região em vista dos inúmeros estudos a seu respeito, quer seja pela biologia, fisiologia e genética. Devido a sua grande importância, o objetivo desse trabalho foi construir e caracterizar uma biblioteca de cDNA mista de hipófise e partes do cérebro, identificar transcritos através de anotação genômica utilizando ferramentas de bioinformática, para categorização dos transcritos e posteriormente identificação de genes de interesse biotecnológico, seguido da expressão e secreção de um deles na forma recombinante. A biblioteca gerada foi sequenciada e como resultado foi obtido 1728 clones que resultaram em 1060 ESTs agrupados em 184 contigs e 12 singlets. A maioria dos genes conhecidos, encontrados na presente análise, está relacionada com os genes ribossomais, seguido dos genes mitocondriais. Além desses, outros transcritos importantes foram identificados e o índice de novidade foi de 43%. Nessas análises, foi possível identificar e isolar o gene do hormônio de crescimento (GH) e logo iniciar o estudo de expressão e secreção do hormônio de crescimento recombinante do tambaqui (tGH) no sistema *Pichia pastoris*. A partir da sequência de cDNA do tambaqui, a região estrutural do gene do hormônio de crescimento foi construída por síntese química e introduzida no “cassete de expressão/ secreção” do vetor pPIC9. O plasmídeo recombinante denominado tGH foi introduzido em células de *P. pastoris* por eletroporação, os clones recombinantes foram selecionados pelo marcador genético auxotrófico *HIS4*. A maior expressão do tGH pela *P. pastoris* GS115 foi alcançada após 72 h de cultivo. A massa molecular estimada em gel de SDS-PAGE 15% revelou que o tamanho do tGH era de 22 kDa, similar ao tamanho do hormônio de crescimento de outras espécies de vertebrados descritos na literatura. Dessa forma, o tGH dessa importante espécie para aquicultura local poderá ser posteriormente aplicado em ensaios experimentais, visando o futuro uso como fator de aceleração do crescimento de peixes de interesse comercial. Tais resultados abrem perspectivas para um estudo mais amplo tanto na área genômica quanto na aplicação do hormônio de crescimento recombinante na piscicultura.



## ABSTRACT

The tambaqui, *Colossoma macropomum*, is a fish of great commercial value to the Amazon region and represents an emblematic species taking into account the studies carried out on its biology, physiology and genetics. Due to its importance, the aim of this study was to construct and characterize a cDNA library of mixed parts of the hypophysis and the brain in order to identify transcripts by genome annotation using bioinformatics tools for categorization of the transcripts. Genes of biotechnological interest, followed by the expression and secretion of one of them in recombinant form were also identified. A total of 1728 clones were sequenced that resulted in 1060 ESTs grouped into 184 contigs and 12 singlets. Most of the known genes found in this analysis is related to the ribosomal genes, followed by mitochondrial genes. In addition, other important transcripts were identified and the novelty index was 43%, it was possible to identify and isolate growth hormone gene (GH) and then start the study of expression and secretion of recombinant growth hormone in tambaqui (tGH) in the *Pichia pastoris*. The structural gene region of growth hormone was constructed by chemical synthesis and inserted into pPIC9. The recombinant plasmid named tGH was introduced into cells of *P. pastoris* by electroporation, recombinant clones were selected by auxotrophic marker gene *His4*. The highest expression of tGH by *P. pastoris* GS115 was reached after 72 h of culture. The molecular mass estimated by SDS-PAGE 15% revealed that the size of tGH was 22 kDa, similar to the size of the growth hormone of other species of vertebrates described in the literature. Thus, the tGH of this important species for aquaculture can then be applied in experimental tests in the near future as a factor for accelerating the fish growth. These results open perspectives for a broader study, both in the genome and in the application of recombinant piscine growth hormone in fish farming.

**SUMÁRIO**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>1</b>  |
| O tabaqui .....  | 3         |
| A aplicabilidade da biotecnologia na piscicultura: genoma funcional, hormônio de crescimento e vetor de expressão..... | 5         |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>  | <b>12</b> |
| Construção do banco de cDNA .....  | 12        |
| Transformação genética em <i>Escherichia coli</i> por eletroporação .....  | 12        |
| Extração de plasmídeos recombinantes.....  | 12        |
| Sequenciamento dos cDNAs clonados.....   | 13        |
| Análise das sequências de ESTs obtidas.....  | 13        |
| Anotação funcional.....  | 14        |
| Linhagem hospedeira e meios de cultura.....  | 15        |
| Vetor de expressão - Plasmídeo pPIC9.....:   | 15        |
| Isolamento do cDNA de tGH.....   | 17        |
| Síntese química da região estrutural do gene do tGH e subclonagem no vetor de expressão .....                          | 17        |
| Transformação da levedura <i>P. pastoris</i> por eletroporação.....  | 17        |
| Expressão do tGH recombinante em <i>P. pastoris</i> .....  | 18        |
| Análise de proteína recombinante em gel desnaturante de SDS-PAGE.....  | 19        |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>  | <b>20</b> |
| Extração do RNAm e construção da biblioteca.....   | 20        |
| Seqüenciamento, anotação funcional e identificação das ESTs.....   | 21        |
| Sequência de cDNA do hormônio de crescimento.....  | 28        |
| Expressão da mensagem genética do de tGH em <i>P. pastoris</i> .....   | 30        |
| Transformação e integração do cassete de expressão em <i>Pichia pastoris</i> ....                                      | 31        |
| Expressão de tGH recombinante em <i>Pichia pastoris</i> .....  | 33        |
| <b>5. DISCUSSÃO.....</b>   | <b>36</b> |
| A biblioteca de cDNA .....   | 36        |
| Clonagem e expressão do hormônio de crescimento .....  | 39        |
| <b>6. CONCLUSÃO.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>8. ANEXOS.....</b>  | <b>59</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 1   | Mapa do plasmídeo pPIC9 utilizado na subclonagem do tGH, apresentando todas as características descritas acima.Fonte: Manual Invitrogen, 2006.....   | 16 |
| Figura 2.  | Perfil eletroforético do RNA total da hipófise e parte do cérebro do tabaqui em gel de agarose 1%.....   | 20 |
| Figura 3.  | Perfil eletroforético em gel agarose 0,8%, dos plasmídeos extraídos dos clones recombinantes.....  | 21 |
| Figura 4.  | Tamanho das sequências obtidas da biblioteca de cDNA de cérebro e hipófise de tabaqui.....   | 22 |
| Figura 5.  | Categorização da biblioteca de cDNA de tabaqui de acordo com o Gene Ontology.....  | 26 |
| Figura 6.  | Distribuição de similaridade das sequências de ESTs de tabaqui com os organismos do <i>Genbank</i> e da Uninilton Lins.....  | 27 |
| Figura 7   | Alinhamento aminoacídico múltiplo do cDNA do hormônio de crescimento de Cypriniformes ( <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Megalobrama amblycephala</i> , <i>Catla catla</i> ) , Siluriformes ( <i>Silurus meridionalis</i> , <i>Ictalurus punctatus</i> , <i>Heteropneustes fossilis</i> , <i>Clarias gariepinus</i> , <i>Rhamdia quelen</i> ) e Characiformes ( <i>Colossoma macropomum</i> e <i>Piaractus mesopotamicus</i> ). A sequência de tabaqui corresponde ao consenso dos três clones e dos produtos de PCR. A região do peptídeo sinal foi omitida pois ela não foi incorporada na síntese química..... | 29 |
| Figura 8.  | Perfil de restrição do vetor pPIC9 com as enzimas de restrição e <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i> . 1- Vetor pPIC intacto; 2: vetor digerido com <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i> ; M: marcador de peso molecular (3000 pb Ladder Genscript).....  | 30 |
| Figura 9.  | Figura esquemática do plasmídeo recombinante pPIC-tGH. A sequência codificadora do GH está em colorido enquanto o restante representa o vetor pPIC9.....   | 31 |
| Figura 10. | Perfil eletroforético do produto de digestão vetor pPIC-tGH  |    |

|            |   |    |
|------------|---|----|
|            | com a enzima <i>SalI</i> .....  | 32 |
| Figura 11. | Seleção dos clones após transformação da <i>P. pastoris</i> com o plasmídeo pPIC-tGH digerido com a enzima <i>SalI</i> , o crescimento homogêneo dos clones em meio MD sem histidina, apresentou o fenótipo Mut <sup>+</sup> .....                                | 33 |
| Figura 12. | Gráfico da cinética de indução do clone 2 de pPIC-tGH durante 96 horas de indução com metanol, à 30° C sob agitação de 200 rpm.....   | 34 |
| Figura 13. | Análise da expressão do tGh recombinante. Sobrenadante das proteínas em gel desnaturante SDS-PAGE 15%. M: Marcador de massa molecular Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); linhas de 1 a 3: clones expressando pPIC-tGH; C: marcador hGH ®..... | 35 |

#### LISTA DE TABELAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Resumo do perfil dos transcritos encontrados no cérebro de hipófise de tabaqui..... | 23 |
|-----------|---|----|

## 1. INTRODUÇÃO

A riqueza da ictiofauna amazônica é conhecida há muito tempo. Porém, o número exato de espécies ainda é desconhecido. Estima-se algo entre 1.500 e 5.000 espécies, a maioria é da super ordem Ostaryophysii, sendo em média 43% de Characiformes, 39% de Siluriformes, 7% de Perciformes, 3% de Gymnotiformes e o restante de outras ordens. A diversidade de peixes também é observada na utilização desse recurso tradicional, seja como alimento, ou na pesca esportiva ou na pesca de peixes ornamentais, tornando-se uma das importantes bases de desenvolvimento regional (Lowe-McConnell, 1987; Ruffino, 2001; Chao, 2001).

O potencial pesqueiro da Amazônia brasileira foi estimado em cerca de 217.000 t/ano (Bayley, 1981; Ruffino, 2002). Alguns registros indicam que o consumo de peixe na região Amazônica, por pessoa, oscila entre 368 e 500g de pescado por dia (Cerdeira *et al.*, 1997; Batista *et al.*, 1998; Ruffino, 2002; Santos, 2004).

A diminuição do pescado associado às pressões de demanda em Manaus tem despertado o desenvolvimento acentuado e desordenado da piscicultura. A criação de espécies em cativeiro tem sido uma estratégia para diminuir a pressão da pesca sobre as populações naturais, satisfazendo as necessidades alimentícias da população local, regional e nacional.

Uma vez que a Amazônia brasileira possui um dos maiores índices de diversidade biológica e genética do planeta, pesquisas que utilizam técnicas moleculares podem auxiliar de uma maneira fundamental o embasamento científico necessário às decisões sobre o melhor uso dessas potencialidades. A introdução de técnicas moleculares na biotecnologia possibilitou um crescimento da aplicação destas ferramentas em diversas áreas da sociedade. Nesse sentido, a identificação de genes relevantes ligados a fenótipos que auxiliem o aumento da produção, resistência a patógenos, controle da reprodução, resistência ao manejo e outras atividades, tem sido cada vez procurada, na associação entre a biotecnologia e a aquacultura (Davis & Hetzel, 2000).

Como exposto anteriormente, a importância da pesca para a região associada às pressões de demanda nas grandes cidades amazônicas, tem despertado para o desenvolvimento da piscicultura. Dentre as espécies existentes destaca-se o *Colossoma macropomum* (tambaqui), por ser uma das maiores peixes dos rios da Bacia Amazônica. Apreciado na culinária regional, o tambaqui também, faz parte da

lista de espécies economicamente mais importantes da região (Araújo-Lima & Goulding, 1998).

Na Amazônia, com o avanço da biologia molecular, tem se tornado uma rotina o uso do DNA para a caracterização da ictiodiversidade amazônica e, dessa forma alguns trabalhos vem sendo publicados quer seja a respeito da estrutura populacional, quer seja sobre a filogenia (Orti *et al.*, 1996; Farias *et al.*, 1999; Porto *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2007; Farias & Hrbek; 2008; Hrbek *et al.*, 2006). Entretanto, são poucos os trabalhos relacionados à biotecnologia sobre os peixes da região, embora essa abordagem tenha iniciado com a clonagem de cDNA do hormônio de carpa na região amazônica, uma espécie exótica muito utilizada na piscicultura (Pedraça, 2000). Tal fato possibilitou a abertura de uma importante porta para o uso da tecnologia do DNA recombinante na piscicultura regional. Atualmente, foram iniciados outros estudos com cDNA e expressão de genes em espécies de peixes amazônicos. Neste aspecto, a clonagem e análise expressão de um gene do tambaqui poderá abrir perspectivas para gerar produtos de interesse biotecnológico.

O estudo aqui apresentado envolve a construção e caracterização da biblioteca de cDNA e a expressão de um gene de interesse biotecnológico para o desenvolvimento da piscicultura regional, enfatizando a construção de uma biblioteca de cDNA a partir do cérebro/hipófise do tambaqui (*Colossoma macropomum*), seguido da anotação parcial dos transcritos presentes na referida biblioteca bem como o uso da levedura metilotrófica, *Pichia pastoris*, para expressão do gene heterólogo codificador do hormônio de crescimento do tambaqui.

Espera-se que algumas das aplicabilidades do uso dessa tecnologia sejam: 1) Adição em rações de peixes de produtos gênicos expressos em sistemas heterólogos, com vistas a um melhor rendimento no crescimento do peixe, diminuição no tempo de espera para comercialização do pescado e redução do tempo de maturação sexual, o que poderá tornar a espécie mais rentável à piscicultura; 2) Desenvolvimento de microchips de DNA, contendo milhares de segmentos de DNA ordenados, os quais permitirão análises simultâneas de milhares de marcadores genéticos ou sequências de cDNA que identificam a intensidade da expressão dos genes; 3) A seleção assistida usando testes de DNA que podem verificar, imediatamente após a eclosão, se os genes de interesse foram eliminados ou adicionados.

## O tambaqui

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) pertence à ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Serrasalminae, é uma espécie endêmica da bacia amazônica ocorrendo no Brasil, Peru, Colômbia, Bolívia e Venezuela. Apresenta 78-107 escamas na linha lateral, nadadeira adiposa óssea com pequenos raios, dorso pardo-escuro e ventre esbranquiçado. Os alevinos têm uma mancha circular preta na nadadeira caudal que desaparece lentamente com o crescimento. Os adultos têm manchas irregulares escuras, no ventre e na nadadeira caudal. O tambaqui realiza movimentos migratórios para a alimentação e reprodução. Na natureza, a alimentação do tambaqui é do tipo onívora e baseia-se, principalmente, no consumo de frutas, sementes e organismos aquáticos de pequeno porte. A reprodução em ambiente natural ocorre na época das chuvas quando já atingiu cerca de 55 cm de comprimento e idade entre 4 e 5 anos. Sua reprodução está associada às planícies de inundação e a desova total ocorre na calha do rio sendo as larvas carregadas rio abaixo para alcançarem as áreas alagadas de várzea onde se desenvolvem. No meio natural alcança peso máximo de aproximadamente 30 Kg. É uma das espécies amazônicas mais bem estudadas no que diz respeito à ecologia, capacidade de produção e ciclo de vida e é umas das espécies alvo para criação em cativeiro (Goulding & Carvalho, 1982; Araújo-Lima & Goulding, 1998; Saint-Paul, 1990; Val & Honczaryk, 1995; Villacorta-Correa & Saint-Paul, 1999).

O tambaqui é uma espécie de água doce, típica de nossa região sendo um dos peixes mais apreciados na culinária amazônica e amplamente aceito em outras regiões, devido ao seu excelente sabor, consistência e coloração branca da carne e facilidade para obtenção de filés.

A exploração do tambaqui em Manaus teve seu ápice em 1976 com o desembarque de 13.314t, diminuindo esta quantidade para 9.030t em 1977 e 8.217t em 1978 (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Nos anos seguintes este desembarque decresceu consideravelmente girando em torno de 4.000 a 6.000t (Merona & Bittencourt, 1988). Na década de 80, o consumo local passou a sustentar a maior parte da atividade pesqueira e o tambaqui havia se tornado a espécie de maior importância econômica para a região (Boischio, 1992), chegando a representar mais de 40% de todos os peixes que foram desembarcados no porto de Manaus (Petrere Jr, 1983). De acordo com os dados mais recentes obtidos no Programa ProVárzea, o desembarque de tambaqui nos principais portos de abastecimento pesqueiro ao longo da calha amazônica (Abaetetuba, Alvarães, Belém, Coari, Fonte Boa,

Itacoatiara, Manacapuru, Manaus, Monte Alegre, Óbidos, Oriximiná, Parintins, Prainha, Santarém, Tabatinga e Tefé), foi de 1.386,21t (Ruffino, 2002).

Considera-se que a pesca nativa do tambaqui tenha atingido níveis de sobreexploração. Entre 1976 e 1986, o desembarque de tambaqui no Mercado Municipal de Manaus oscilou entre 6,42% e 44,73% (Merona & Bittencourt, 1988). Entre 1994 e 1996 oscilou entre 2,6% e 23% (Batista, 1998). Em 2001 este valor não ultrapassou 3,5% (Ruffino, 2002).

Há indícios que apontam uma diminuição no tamanho dessa espécie nos mercados locais visto que espécimes de grande porte são cada vez mais raros de serem encontrados. Em consequência deste fato há um maior investimento de recursos na pesca e captura do tambaqui em locais pouco explorados, encarecendo o valor do pescado na cidade (Batista, 1998).

Por essa razão o tambaqui vem sendo periodicamente protegido pelo IBAMA, por meio de Portarias, como a de nº 1.534, de 20 de dezembro de 1989, que proíbe a captura e a comercialização de indivíduos de pequeno porte (inferior a 55 cm) e a nº 005 de 1995, que proíbe a pesca, comercialização, beneficiamento e armazenamento nos períodos de reprodução (de 1º de dezembro a 28 de fevereiro) (IBAMA, 2003).

Sabe-se que uma forma de reduzir a pressão sobre as populações naturais e ainda satisfazer a necessidade local de consumo e comercialização é a criação de peixes em cativeiro. Desde o século passado que o tambaqui vem sendo adaptado e criado em cativeiro com sucesso. É a espécie brasileira mais indicada para o policultivo, visto sua capacidade de aproveitar vários tipos de alimentos disponíveis no viveiro, inclusive como filtrador de plâncton. É rústico e tolera baixos teores de oxigênio dissolvido na água. A técnica de reprodução artificial é conhecida, podendo ser efetuada até 2 vezes por ano por fêmea. Em sistemas de cultivo, o tambaqui aceita muitos tipos de alimento como grãos, frutos, batatas, subprodutos agrícolas e rações. Pode chegar a 1 Kg de peso no primeiro ano e de 1,5 a 3 Kg no segundo sendo que para utilização de reprodução artificial utiliza-se tambaquês com idades superiores a 3 anos (Araujo-Lima & Goulding, 1998).

De acordo com os dados estatísticos, o tambaqui é a terceira espécie de peixe de água doce mais cultivada no Brasil, perdendo apenas para as espécies exóticas de tilápias e carpas. Em 2003, a produção estimada de tambaqui em todo o Brasil foi de 20.833 toneladas, sendo o estado do Amazonas o maior produtor com 3.130 toneladas, ou seja, cerca de 15% deste total (IBAMA, 2004). Percebe-se



assim que a estimativa do cultivo de tambaqui ultrapassa a produção pesqueira na natureza.

Estudos genéticos têm sido conduzidos no tambaqui quer sejam de amostras selvagens quanto de pisciculturas: Estudos citogenéticos identificaram o número diplóide e padrão de bandeamentos cromossômicos descritos,  $2n= 54$  cromossomos, dois pares de organizadores nucleolares, padrão de banda C distinto de *Piaractus* (Kossowski *et al.*, 1983; Almeida-Toledo *et al.*, 1987). Estudos protéicos e enzimáticos indicam que o tambaqui está fisiologicamente preparado para enfrentar mudanças nos mais variados parâmetros físico-químico e apto a adotar estratégias contra as mudanças no ambiente aquático, imposto pela natureza ou pelo homem, e demonstraram a existência de integridade genética na população selvagem bem como a perda da variabilidade genética nos estoques cultivados (Almeida-Val *et al.*, 1995; Teixeira & Jamieson, 1985; Leitão, 1998; Calcagnoto & Toledo-Filho, 2000). O íntron 3 do gene do hormônio de crescimento revelou que há 5 haplótipos e uma provável população panmítica ao longo da bacia amazônica (d'Assunção *et al.*, 2003). As análises de RAPD revelaram padrões de bandas distintos entre *C. macropomum* e *Piaractus*, mas somente foi possível discriminar indivíduos provenientes do meio natural dos de cultivo em *P. brachypomus* (Pineda-Santis *et al.*, 2004). As análises do DNA mitocondrial (D-loop) revelaram em indivíduos coletados na natureza, ao longo da bacia amazônica, uma alta diversidade genética, nucleotídica e panmixia (47 haplótipos em 48 indivíduos analisados). (Santos *et al.*, 2007). Marcadores moleculares do tipo microssatélites já foram desenvolvidos para *C. macropomum* e os estudos comparativos encontram-se em andamento (Santos *et al.*, 2009).

Estudos recentes a respeito de transcritos diferencialmente expressos têm sido avaliados nessa espécie, utilizando as ferramentas genômicas recentes tais como biblioteca de cDNA, RT-PCR, qPCR e DD-PCR a fim de identificar os mecanismos de desenvolvimento que possam responder as diferentes condições em que o tambaqui é submetido, gerando dessa forma dados de biomarcadores (Pinheiro, 2007; Añez, 2008; Casanova, 2008). Assim, diante desses estudos citados anteriormente e a importância econômica dessa espécie, o tambaqui tem se tornado um organismo modelo de estudo para a região.

## **A aplicabilidade da biotecnologia na piscicultura: genoma funcional, hormônio de crescimento e vetor de expressão**

Nos últimos anos, os programas de aquicultura têm dado elevada importância às avaliações genéticas, com vistas não somente a ampliar a produção como também a manter a diversidade genética dos estoques (Martins *et al.*, 2002). O conhecimento e a conservação da variabilidade genética mantida nos estoques de peixes são prioridades atuais da piscicultura brasileira (Calcagnoto & Toledo-Filho, 2000).

Os progressos no melhoramento genético de peixes cultivados têm sido foco de discussões e revisões (Hulata, 2001). Os objetivos principais são o aumento da produção de novas linhagens, o desenvolvimento de tecnologias modernas, incluindo manipulação sexual e cromossômica, a criopreservação de gametas, a obtenção de indivíduos transgênicos e o mapeamento genômico (Martins *et al.*, 2002).

Assim, os conhecimentos sobre marcadores de DNA evoluíram do seu estado experimental e gradativamente estão sendo incorporados à aquicultura de forma prática e eficiente (Martins *et al.*, 2002). A riqueza de informações fornecidas por vários projetos genomas, e os avanços na genômica funcional e tecnologia transgênica, têm adicionado novos recursos do campo da biotecnologia para a aquicultura (Melamed *et al.*, 2002). Vale destacar que o uso destas ferramentas moleculares que vem sendo utilizadas na aquicultura não invalida metodologias de melhoramento genético, tais como os estudos dos locos de característica quantitativa (QTL). Na verdade, espera-se um desenvolvimento maior da aquicultura utilizando-se, por exemplo, um estudo denominado marcadores de seleção assistida (MAS), que é o processo de seleção de reprodutores com genótipos desejáveis por meio do uso de marcadores moleculares (Liu & Cordes, 2004).

Após o sequenciamento completo do genoma humano em 2000, outros organismos também tiveram sequenciados seu genoma ou estão em fase de andamento, tendo dessa forma, impulsionado a era genômica. Em peixes, não é diferente. As seguintes espécies já tiveram o seu genoma desvendado: *Takifugu rubripes* (Aparicio *et al.*, 2002), *Tetraodon nigroviridis* (Jaillon *et al.*, 2004) e *Oryzias latipes* (Kasahara *et al.*, 2008), outras espécies de peixes estão em fase de finalização da anotação genômica.

A genômica funcional ou transcrito, por meio da análise de ESTs, tem sido muito utilizada para estudos nas principais espécies de peixes cultiváveis por ser

uma ferramenta eficaz para descoberta de genes, mapeamento genético e geração de perfis de expressão gênica, e também por permitir a avaliação de milhares de genes ao mesmo tempo, de forma paralela (Adams *et al.*, 1991; Telles *et al.*, 2001, Zeng & Gong, 2002). Em peixes teleósteos, vários trabalhos enfocando etiquetas de sequências expressas (ESTs) têm sido descritos, por exemplo, paulistinha-*Danio rerio* (Gong, 1999), carpa - *Cyprinus carpio* (Savan & Sakai, 2002), bagre de canal - *Ictalurus punctatus* (Ju *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2001; Karsi *et al.*, 2002; Kocabas *et al.*, 2002), bagre americano (Liu *et al.*, 1999), truta - *Oncorhynchus mykiss* (Dixon *et al.*, 1998), salmão - *Salmo salar* (Davey *et al.*, 2001, Martin *et al.*, 2002), linguado - *Paralichthys olivaceus* (Inoue *et al.*, 1997; Nam *et al.*, 2000; Kono & Sakai, 2001), tilápia - *Oreochromis niloticus* (Hamilton *et al.*, 2000), robalo - *Lates calcarifer* (Tan *et al.*, 2008).

As ESTs (expressed sequence tags) ou etiquetas de sequências expressa são oriundas do mRNA que são convertidos em cDNA. Esses segmentos de cDNA de tecidos específicos, são sequenciados e então identificados através de ferramentas computacionais (Adams *et al.*, 1991). A abordagem via ESTs (Transcritoma) têm se mostrado como uma ferramenta robusta na identificação, homologia e expressão gênica em células ou tecidos, fornecendo informações significantes a respeito da estrutura e função dos genes (Okubo & Matsubara, 1997; Vettore *et al.*, 2001; Kawano *et al.*, 2003; Shie *et al.*, 2004). Com o advento da tecnologia de sequenciamento, agora é possível a produção em larga escala de ESTs, representando uma grande porção do transcrito, revelando a atividade funcional em nível de transcrição dos genes de um dado organismo (Ju *et al.*, 2000).

O desdobramento da análise desse conjunto de transcritos que estão sendo realizados nos peixes pode permitir o entendimento global e interespecífico de mudanças no RNA mensageiro (mRNA) e proteínas, proporcionando uma avaliação simultânea no nível de expressão gênica. No estudo dos peixes, essa metodologia desponta como uma importante ferramenta em três áreas principais, a saber: a) evolução dos genes; b) entendimento global da expressão gênica nos mecanismos de crescimento, reprodução, patologias, estresse fisiológico; e c) identificação de proteínas (Parrington & Coward, 2002).

Na piscicultura, os genes envolvidos nos processos endócrinos de crescimento, têm um papel de destaque. O hormônio do crescimento (GH) ou somatotropina é um polipeptídeo de 22 kDa, composto de 190 a 204 aminoácidos (incluindo o peptídeo sinal). Sua estrutura protéica é globular sendo constituída de 4

alfa-hélices antiparalelas com 2 pontes dissulfeto entre as cadeias e uma porção aminoterminal invariável (Wallis, 1992). A estrutura tridimensional desse hormônio de carpa da Índia (*Labeo rohita*) foi determinada por Venugopal *et al.* (2002) que propuseram uma estrutura similar já descrita nas outras duas outras espécies indianas de carpa (mrigal e catla), que são similares a estrutura e a estrutura do GH humano que também apresenta uma estrutura antiparalela de 4 alfa-hélices. As moléculas do GH podem existir em isoformas variadas às quais diferem em peso molecular, carga, sequência aminoacídica e nucleotídica (Agellon *et al.*, 1988; Ber & Daniel, 1993; Wallis, 1992; Bernardi *et al.*, 1993).

No caso específico do hormônio de crescimento sua ação anabólica no metabolismo protéico pode promover o crescimento (Rousseau & Dufour, 2007). Vários estudos têm demonstrado que a administração do GH aos peixes aumenta sensivelmente o crescimento, o peso e a conversão alimentar (Ishioka *et al.*, 1992; Cavari *et al.*, 1993; Moriyama *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1994; Melamed *et al.*, 2002).

O GH pode promover o crescimento, através da sua ação anabólica no metabolismo protéico, quando a energia está disponível (Rousseau & Dufour, 2007). No entanto, GH é um fator pleiotrópico endócrino e tem importantes efeitos metabólicos tais como a utilização de energia e de mobilidade (Sheridan, 1986; Mommsen, 2001). Esse hormônio desempenha um papel importante na reprodução (Björnsson, 1997; Hull & Harvey, 2002), osmorregulação (Sangiao-Alvarellos *et al.*, 2005; Varsamos *et al.*, 2005; Sakamoto & McCormick, 2006), apetite (Johnsson & Björnsson, 1994) e no comportamento (Jönsson & Björnsson, 2002) em todos os vertebrados. Além disso, várias evidências têm demonstrando que hormônios hipofisários, incluindo o GH, são importantes moduladores no sistema imunitário em peixes (Balm, 1997; Weyts *et al.*, 1999; Yada & Nakanishi, 2002). No que diz respeito à sua promoção e o efeito no crescimento, o GH atua em diferentes níveis, diretamente nos tecidos, como músculos ou do sistema nervoso central e endócrino ou indiretamente, através de uma produção do fator I de crescimento ligada a insulina (IGF-I) (Rousseau & Dufour, 2007). A importância do GH como um agente que promove o crescimento tem sido reconhecido há algum tempo, e a administração do GH tem demonstrado que acelera a taxa de crescimento em vários animais, principalmente peixes (Cavari *et al.*, 1993; McLean *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1994; Agellon, 1998).

Dessa forma, é certo que a administração do GH em peixes aumenta sensivelmente o crescimento, o peso e a conversão alimentar (Ishioka *et al.*, 1992;

Cavari *et al.*, 1993; Moriyama *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1994; Melamed *et al.*, 2002). Dentre as várias maneiras pela qual o GH recombinante pode ser administrado ao peixe, a administração oral através de rações parece ser a mais promissora na piscicultura, com base no fato de que as células epiteliais do trato intestinal dos peixes absorvem o GH e o mesmo logo é detectado no plasma sanguíneo (Moriyama *et al.*, 1993). Além disso, a administração oral evita o manuseio intensivo do peixe (Le Bail, 1989; Melamed *et al.*, 2002). Outras formas de se administrar o GH recombinante para promover o crescimento peixes são a imersão em água contendo este hormônio (Agellon *et al.*, 1988; Moriyama & Kawauchi, 1990; Acosta *et al.*, 2007), ou através de injeção intramuscular do GH.

Sequências do cDNA do hormônio de crescimento (GH) têm sido caracterizadas em várias espécies de peixes (Lee *et al.*, 2001; Tse *et al.*, 2003; Calduch-Giner *et al.*, 2003; Saera-Vila *et al.*, 2005; Kajimura *et al.*, 2004; Ozaki *et al.*, 2006; Very *et al.*, 2005; Gabillard *et al.*, 2006; Jiao *et al.*, 2006); incluindo de uma espécie de Characiformes, o *Piaractus mesopotamicus* (Pinheiro *et al.*, 2008), muito próxima filogeneticamente do tambaqui, a espécie do presente estudo.

Nas últimas décadas, algumas espécies de leveduras têm sido utilizadas como sistemas alternativos de expressão por apresentarem vantagens sobre *Saccharomyces cerevisiae*. Dentre esses novos sistemas, destaca-se a *Pichia pastoris* (Torres & Moraes, 2000).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem sido amplamente descrita como um sistema adequado de expressão de proteínas heteróloga devido algumas propriedades favoráveis como: altos níveis de expressão sob o controle do promotor AOX1 que permite a transcrição dos produtos gênicos a ele fusionados sob regulação de metanol, integração do cassete de expressão no genoma da levedura de forma estável (Cereghino & Cregg, 2000). Este sistema de expressão heteróloga e pode ser utilizado tanto em pesquisas básicas, quanto em produção em escala industrial (Cereghino *et al.*, 2002).

A forma com a qual o cassete de expressão se integra no genoma de *P. pastoris* possibilita caracterizar três fenótipos diferentes, que se relacionam com a habilidade da levedura em metabolizar metanol. Tais fenótipos são o Mut<sup>+</sup> (*Methanol Utilization Plus*), nos quais as linhagens de hospedeira apresentam os genes *AOX1* e *AOX2* funcionais no seu genoma e possuem crescimento que aproxima daquele apresentado pela levedura selvagem, o fenótipo Mut<sup>S</sup> (*Methanol Utilization Slow*), dependente da fraca transcrição do gene *AOX2* uma vez que possui o gene *aox1*

não funcional, e por fim o fenótipo Mut<sup>-</sup> (*Methanol Utilization Minus*) que possui os dois genes *aox* inativos impossibilitando a metabolização de metanol, e, não crescendo na ausência de outras fontes de carbono. Os mecanismos pelos quais ocorrem a transformação e a integração em *Pichia pastoris* são por adição ou por substituição gênica (Cregg *et al.*, 1993; Tuite *et al.*, 1999).

*P. pastoris* não é considerada uma forte fermentadora, as leveduras do gênero *Pichia* têm uma forte preferência pelo crescimento respiratório, conseqüentemente não produzem etanol em níveis tóxicos, quando comparada com muitas espécies do gênero *Saccharomyces*, e podem crescer em grandes densidades celulares em altas concentrações de etanol. Algumas características fazem com que *P. pastoris* tenha se tornado um sucesso como sistema heterólogo de expressão, além da fácil manipulação: produz e secreta altos níveis de proteínas e faz as modificações pós-traducionais no polipeptídeo nascente, como glicosilação, formação de pontes dissulfeto e processamento proteolítico (Cereghino *et al.*, 2002). Ao contrário de outras leveduras utilizadas para expressão de genes heterólogos como *S. cerevisiae*, a *P. pastoris* não realiza hiperglicosilação da proteína secretada, não interferindo, portanto nos processos de enovelamento e dobramento finais da proteína madura (Cregg *et al.*, 1989). Devido a esses fatores citados acima, *P. pastoris* tornou-se uma hospedeira de uso popular, sendo que em 2007 mais de 600 genes foram clonados e expressos utilizando este microrganismo (Zhang *et al.*, 2008). Devido a esses fatores citados anteriormente, *P. pastori* foi o organismo hospedeiro escolhido para presente trabalho, pois além da fácil manipulação, os protocolos encontram-se padronizados no laboratório onde foi feita a pesquisa de expressão gênica.

Avanços biotecnológicos na piscicultura de carpa, tilápia, salmão, entre outros, associados à expressão heteróloga do hormônio de crescimento (GH) já são realidade. O GH tem sido expresso em vários sistemas heterólogos utilizando microorganismos como *Escherichia coli*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*.

Esse trabalho, a exemplo do que tem sido feito em carpa, tilápia e salmão (Agellon *et al.*, 1988; 1990; Acosta *et al.*, 2007; Pierce, 2004), foi realizado com intuito de construir uma biblioteca de cDNA de cérebro e hipófise, identificar genes associados ao crescimento, e proceder à expressão do hormônio de crescimento em *P. pastoris*.

## **2. OBJETIVOS**

### **Geral**

O objetivo geral deste trabalho é a obtenção de etiquetas de sequências expressas (ESTs - expressed sequence tags) do cérebro e na hipófise de tabaqui para rastrear genes de crescimento e de interesse biotecnológico e proceder à expressão de um desses genes em sistema heterólogo.

### **Específicos**

Construir e caracterizar uma biblioteca de cDNA mista da hipófise e parte do cérebro de tabaqui.

Determinar as sequências ESTs a partir da biblioteca de cDNA.

Proceder com a anotação funcional dos genes.

Categorizar funcionalmente as ESTs de acordo com o Gene Ontology.

Clonar e expressar a região estrutural do gene do hormônio de crescimento recombinante de tabaqui (tGH) em *Pichia pastoris*.

Analisar a expressão gênica do hormônio de crescimento recombinante do tabaqui.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### Construção do banco de cDNA

Foram coletados tecidos da hipófise e da massa cerebral circunvizinha de 12 tambaquis juvenis (*Colossoma macropomum*), com cerca de 15 cm cada, provenientes da estação de piscicultura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). A massa cerebral circunvizinha coletada foi necessária pelo fato do tecido da hipófise ser de tamanho pequeno, e também para obtermos material suficiente para a obtenção da biblioteca. O RNA total foi extraído de cérebro e hipófise, pelo método do isotiocianato de guanidina, utilizando-se o Kit TRIZOL de acordo com as recomendações do fabricante (cod.: 15596-026, Invitrogen). Para o isolamento e a purificação dos RNA foi utilizado o FastTrack 2.0 Kit (Invitrogen™). A fração poli(A)<sup>+</sup> (contendo os RNAs) foi isolada através de cromatografia-centrifugação de afinidade em coluna de celulose-oligo-(dT)<sub>n</sub>, utilizando-se kit FastTrack 2.0 (cód.: K1593-02, Invitrogen). Para a construção da biblioteca de cDNA seguiu-se o protocolo da SuperScript® Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning Kit. As fitas duplas de cDNA resultantes constituem um pool de moléculas de diversos tamanhos, denominado perfil de cDNA. O vetor utilizado para clonagem dos fragmentos de cDNA fracionados foi o pCMVSPORT6-SuperScript™ (Invitrogen) (anexo A).

#### Transformação genética em *Escherichia coli* por eletroporação

Para o processo de transformação foram utilizadas as células eletrocompetentes de *E. coli* linhagem XL1 Blue. A transformação genética foi realizada por eletroporação com pulso de 1,8 KV (Eletroporador *BioRad*®, cubetas com passagem de 1,0 cm e capacidade de 80µL de células competentes) que garantiu a inserção do sistema de ligação na hospedeira. As células transformadas foram ressuspensas em 1mL de meio LB e mantidas a 37°C por 1 hora, sem agitação. Procedeu-se a semeadura e incubação em placas de *petri* em meio LB agar 1,5% contendo o agente seletivo ampicilina na concentração de 100µg/mL e incubadas a 37°C *overnight*. Posteriormente, fez-se o repique e crescimento das bactérias transformadas em meio LB líquido a 37°C com posterior estocagem em placas de 96 poços (COSTAR®), contendo glicerol (16%) a -20°C.



### **Extração de plasmídeos recombinantes para sequenciamento**

As colônias bacterianas geneticamente transformadas foram cultivadas em meio com antibiótico em placas tipo *deep well overnight* a 37° C em agitador (C-25 Incubator Shaker) com velocidade de 150 rpm por 22 h. Após esse período foi feita a extração do DNA plasmidial, seguindo o protocolo de extração de plasmídeos *miniprep*, pelo método de lise alcalina (anexo B). Os plasmídeos oriundos das *minipreps* foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, e fotografado no fotodocumentador *EagleEye*<sup>®</sup>.

### **Sequenciamento dos cDNAs clonados**

A quantidade de DNA utilizada na reação de sequenciamento foi estimada pelo perfil eletroforético, e foi utilizado aproximadamente 200ng de DNA plasmidial (como recomendado pelo fabricante) e o *kit* de sequenciamento (DYEnamic ET TERMINATOR™ GE-Healthcare) com 1,0µL de iniciador SP6 ou T7 (5 picoMoles/µL) por reação a partir da extremidade 5'ou 3' respectivamente. Após a reação de sequenciamento foi feita a precipitação e o produto analisado nos sequenciadores automáticos MegaBace 1000 (GE-Healthcare) do Laboratório Temático de Biologia Molecular (INPA) e do Laboratório de Tecnologias de DNA (UFAM).

### **Análise das Sequências de ESTs obtidas**

A nomenclatura de cada placa foi estabelecida da seguinte forma: nome do organismo, seguida pela numeração da placa estoque e o iniciador utilizado: Ex: Cm01\_R. (*Colossoma macropomum* – placa01 primer Reverse).

O processo de anotação foi sequencial e automatizado, englobando as seguintes etapas: 1) Validação da entrada do sistema e 2) Identificação de regiões de alta qualidade. A validação da entrada do sistema refere-se a validação do arquivo que contém os cromatogramas compactados no formato ESD (Megabace). A seguir o programa *Phred* lê os dados de saída do sequenciador, que possui um formato ESD (Megabace) e converte em formato texto atribuindo um valor de qualidade a cada base de acordo com a sua resolução, junto a isto ele identifica regiões de alta qualidade. Nesta análise foram consideradas somente as sequências acima de 100 pb, e com *Phred* (> 15).

## Anotação Funcional

Para esta etapa foi utilizado o programa *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990) uma vez que este programa é o mais usado para a comparação rápida de sequências (Prosdosimi *et al.*, 2003). Os *scores* representam a quantificação do grau de similaridade entre duas sequências, funcionando como pontuação. As sequências foram comparadas em bancos de dados não redundantes do NCBI, em todos os genomas registrados, para a determinação das possíveis funções dos transcritos enviados. A anotação de proteínas utiliza ferramentas do NCBI como o BLASTP ou PSI-BLAST frente aos diferentes bancos de dados de proteínas existentes. As sequências dos “uniques” (*contigs* mais *singlets*) foram comparadas com as disponíveis no banco *nr* (banco não redundante) do *GenBank*, utilizando-se o programa BlastX e classificadas em categorias funcionais, segundo o GO - *Gene Ontology* ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)), seguindo as etapas abaixo.

Cada sequência foi amplamente analisada por meio de ferramentas de bioinformática disponíveis no Centro Universitário da Uninilton Lins. Para a caracterização e classificação das *ESTs*, seguiu-se a seguinte etapa: as sequências obtidas do sequenciador foram aplicadas nos softwares para atribuição de qualidade (*Phred*), agrupamento (*Phrap*) e geração de *contigs* (*CAP3*). Os *contigs* foram enviados para o programa BLAST2GO para busca de homologia e similaridade, através da ferramenta BLAST. Os resultados foram automaticamente submetidos para análise por GO (*Gene Ontology*) onde as sequências foram categorizadas por processo biológico (P), função molecular (F) e componente celular (C). O valor de ponto de corte foi de  $e\text{-value}10^{-6}$ . Em seguida, todos os resultados obtidos nas etapas, foram comparados com aqueles disponíveis no banco público de sequências do NCBI por meio do algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990) e com as sequências do banco de dados do Centro Universitário Nilton Lins, que possui um banco de dados desenvolvido para comparar todas as informações obtidas com aproximadamente 1.500.000 *ESTs* (*Expressed Sequence Tags*) de peixes existentes em outros bancos de dados da *web*. As comparações foram realizadas utilizando-se o programa BLAST2GO (Conesa *et al.*, 2005), contra o banco não redundante (BlastX) e contra os bancos de EST's (BlastN) do NCBI dos seguintes peixes: *Danio rerio* (paulistinha), *Salmo salar* (salmão), *Oncorhynchus mykiss*, *Oreochromis niloticus* (tilápia).

## **Linhagem hospedeira e meios de cultura**

### **1. *Escherichia coli***

TOP 10: F<sup>-</sup>*mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1**deoR* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU* *gal* K *rpsL* (Str®) *ENDa1* *nupG* (Invitrogen™ - TOPO TA Cloning). Esta linhagem possibilita a realização de manipulações genéticas, como a propagação e multiplicação de DNA plasmidial provenientes da ligação do fragmento gênico no vetor de clonagem.

### **2. *Pichia pastoris***

A Linhagem de *P. pastoris* utilizada foi a GS115, esta cepa é originária da linhagem selvagem NRRL Y-11430, apresentando o genótipo *his4* o fenótipo Mut<sup>+</sup> e His<sup>-</sup> (Cregg *et al.*, 1985). Para o cultivo da linhagem GS115 foram utilizados os meios YPD líquido e YPD Agar. O meio mínimo MD Agar sem histidina foi utilizado para a seleção das células transformantes de *P. pastoris*. Para a indução da expressão heteróloga do GH de tabaqui, tanto em meio sólido como em meio líquido, foi utilizado meio com glicerol BMGY-U para ganho de massa celular e o meio com metanol BMMY-U para induzir o promotor *AOX1*. Os meios de cultura utilizados no presente trabalho estão descritos em anexo A.

## **Vetor de expressão - plasmídeos pPIC9**

Para expressão do cDNA de tGH em *P. pastoris* foi utilizado o vetor pPIC9 (Figura 1) (Invitrogen) que possui 8,3 kb, o promotor *AOX1* regulável por metanol, o terminador de transcrição do gene *AOX1* (TT), a sequência codificadora do peptídeo sinal do gene do fator –  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, a origem de replicação e o gene de resistência a ampicilina funcionais em *E. coli*, os sítios para integração no genoma de *P. pastoris* em *HIS4* ou *AOX1*, numa região de múltiplos sítios de clonagem e a marca de seleção auxotrófica para leveduras (*HIS4*).

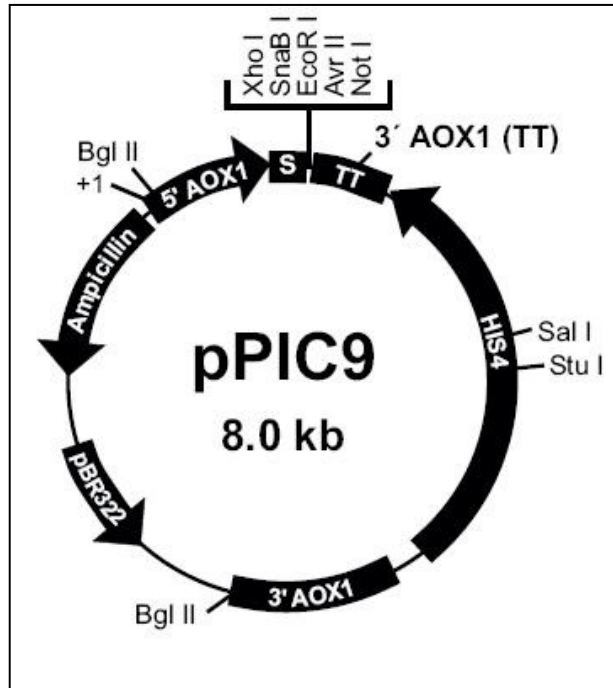


Figura 1. Mapa do plasmídeo pPIC9 utilizado para expressão/secreção do tGH. Fonte: Manual Invitrogen, 2006.

### **Isolamento do cDNA de tGH**

O cDNA do hormônio de crescimento do tabaqui tGH foi isolado a partir do sequenciamento e caracterização da biblioteca de cDNA. Dentre os clones seqüenciados parte do peptídeo sinal e do sinal maduro do tGH não foi acessada devido a baixa qualidade do sequenciamento. Assim, tendo como molde o cDNA do tabaqui parte da região que faltava foi amplificada com os iniciadores *GHP-F*: TCA GAC AAC CAG CGG CTC TTC e *GHP-R*: CAG GGT GCA GTT GGA ATC CAG (Pinheiro *et al.*, 2008). Para confirmar que todo o sinal maduro do GH foi obtido, as seqüências dos clones e do produto amplificado por PCR foram alinhadas e comparadas com seqüências de GH já descritas. O consenso de todas as seqüências obtidas serviu de base para se proceder à síntese química do tGH.

### **Síntese química da região estrutural do gene do tGH e subclonagem no vetor de expressão**

Para expressão em alto nível em *P. pastoris*, foi construída por síntese química a região estrutural do cDNA do tGH, sem a região codificadora do peptídeo sinal de forma a conter os códons mais utilizados por esta levedura. O gene sintetizado continha no início e no final de sua seqüência os sítios de restrição *EcoRI* e *NotI*, respectivamente para permitir a subclonagem em fase no vetor de expressão/secreção Ppic 9. Após a subclonagem, os plasmídeos recombinantes foram extraídos pelo método de lise alcalina utilizando o *Kit FlexiPrep* (Amersham Biosciences, GE Healthcare). O DNA plasmidial extraído foi analisado em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e a subclonagem confirmada por análise de restrição (*EcoRI* e *NotI*). Os plasmídeos recombinantes contendo a seqüência do tGH foram denominados de pPIC-tGH.

### **Transformação da levedura *P. pastoris* por eletroporação**

Para preparação de células eletrocompetentes de *P. pastoris* GS115 as mesmas foram inoculadas em erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio YPD. e cultivados a 30°C por 24 horas. Cerca de 150 µL deste pré-inóculo foi adicionado a 500 mL de meio YPD em erlenmeyer de 1L, e a cultura incubada a 30°C sob agitação de 200 rpm até atingir uma densidade óptica (D.O) em 600nm entre 1,3 e 1,5. As células foram coletadas por centrifugação a 250g/5 min. a 4°C, e resuspendidas em 600 mL de água gelada esterilizada. Em seguida, foi realizada outra centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente e as células

foram resuspendidas em 25 mL de sorbitol 1M gelado e novamente centrifugadas e resuspendidas em 2,5 mL também em sorbitol (1M) gelado. As células foram preparadas de acordo com o protocolo descrito no Manual de Expressão Gênica em *Pichia* (INVITROGEN, 2006).

No processo de transformação, foram utilizadas 80  $\mu$ L de células eletrocompetentes homogeneizadas com 10  $\mu$ g do DNA linearizado. A mistura foi transferida para uma cubeta de 2mm e incubada em gelo por 5 minutos. As células foram a seguir submetidas a eletroporação a uma voltagem de 1500 V. Em seguida foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M gelado, e o conteúdo da cubeta foi transferido para um microtubo. Foram semeados volumes de 100, 150 e 200  $\mu$ L em placas de petri contendo meio MD. O crescimento das colônias ocorreu por volta de 3 a 5 dias. Para transformação das células de *P. pastoris* com o vetor pPIC-tGH foi utilizada a estratégia de adição gênica do cassete de expressão no genoma da levedura, para isso a linearização do plasmídeo foi realizada através da digestão com a enzima de restrição *Sall*, que contém um único sítio de clivagem no interior do gene *HIS4*. A integração no genoma da hospedeira *P. pastoris* GS115 ocorre por eventos únicos de recombinação homóloga (adição) não alterando o seu fenótipo Mut<sup>+</sup>.

### **Expressão do tGH recombinante em *P. pastoris***

Os clones transformantes selecionados foram inoculados em 25 mL de meio de cultura BMGY-U em erlenmeyer de 250 mL e incubados a 30°C sob agitação de 200 rpm, até a cultura atingir uma D.O.<sub>600</sub>= 2-6, por um tempo aproximado de 18 – 24 horas, após o que, as células foram centrifugadas 300g por 15 min. e resuspendidas em 100 mL de meio BMMY-U de modo que a cultura apresentasse uma D.O.<sub>600</sub>= 1,0. A cada 24 horas, foi adicionado metanol 0,5% à cultura celular. A indução da expressão gênica foi realizada durante 72 horas a 30°C sob agitação. Para a determinação da cinética do crescimento da linhagem recombinante de *P. pastoris* e análise da secreção da proteína heteróloga, foram realizadas coletas dos sobrenadantes das culturas nos intervalos de 24h, 48h, 72h e 96h, que foram estocadas a -20°C para posteriores análises. A curva de crescimento da levedura durante a indução foi realizada coletando-se as células em cada tempo e medida a D.O. no comprimento de onda de 600nm. A massa celular obtida foi convertida para g/L utilizando a fórmula (g/L) = 0,22 X D.O. (600 nm) (Nakano *et al.*, 2006).

### **Análise de Proteína Recombinante em Gel Desnaturante de SDS-PAGE**

A proteína recombinante foi analisada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli (1970). Alíquotas de 600µL dos sobrenadantes obtidos durante a cinética de indução foram precipitadas com TCA 10%, e em seguida lavadas com acetona gelada e deixadas para secar em temperatura ambiente. Os precipitados foram ressuspendidos em tampão de eletroforese 1X (200mM Tris pH 6,8; 0,1% (p/v) azul de bromofenol; 4% (v/v) SDS; 5% β-mercaptoetanol; 20%(v/v) glicerol) e as amostras foram fervidas em banho - maria por 5 minutos e incubadas imediatamente no gelo até o momento de aplicação no gel. As amostras foram aplicadas em um sistema de gel concentrador de 4% e separador de 15%. A eletroforese foi realizada por 3 a 5 horas em voltagem de 250 V. O marcador molecular utilizado foi o GH de humano, gentilmente cedido pela Cristalia- Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.

Após a eletroforese, o gel foi corado com nitrato de prata, para melhor visualização e confirmação da proteína expressa, seguindo os mesmos passos da metodologia descrita por Blum, Beier e Gross (1987). O gel foi lavado por 5 minutos em água bidestilada e incubado em solução fixadora que continha metanol 50% (v/v) por 2 horas ou *overnight*. Após esta etapa, a solução foi substituída por solução de etanol 50% e o sistema mantido sob agitação por 20 min. e essa etapa repetida por mais duas vezes. Posteriormente, o gel foi incubado por 1 hora sob agitação com solução de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) e lavado 3 vezes com água bidestilada com agitação. Em seguida, o gel foi incubado por 20 minutos sob agitação com solução de nitrato de prata 0,2% (p/v) e formaldeído 0,008%(v/v), após a incubação o gel foi lavado com água bidestilada por 20 segundos sob agitação e transferido para um recipiente de vidro, onde foi incubado com uma solução reveladora que continha carbonato de sódio 6% (p/v), formaldeído 0,05% (v/v) e tiosulfato de sódio 0,008% (p/v) até o aparecimento de bandas. O processo de coloração foi parado com adição da solução de ácido acético glacial 5% (v/v) por 10 minutos e o gel estocado em ácido acético glacial 1% (v/v).

A quantificação das proteínas totais solúveis foi realizada através do kit de ensaio de proteínas BCA (BioAgency) cuja metodologia foi descrita por Lowry *et al.*,1951. A reação foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante, ou seja, para cada 50µL de produto da proteína era adicionado 1mL de solução A e 40 µL de solução B.

## 4. RESULTADOS

### Extração do RNAm e construção da biblioteca

O RNA total foi isolado e apresentou aparência translúcida. E, quando analisado por eletroforese de gel de agarose, observou-se que as bandas de RNA ribossômico se apresentaram intactas e bem visíveis, indicando que o RNA não estava degradado (Figura 2), conseqüentemente o mRNA também deveria estar intacto e portanto serviria como “template” para a síntese de cDNA.

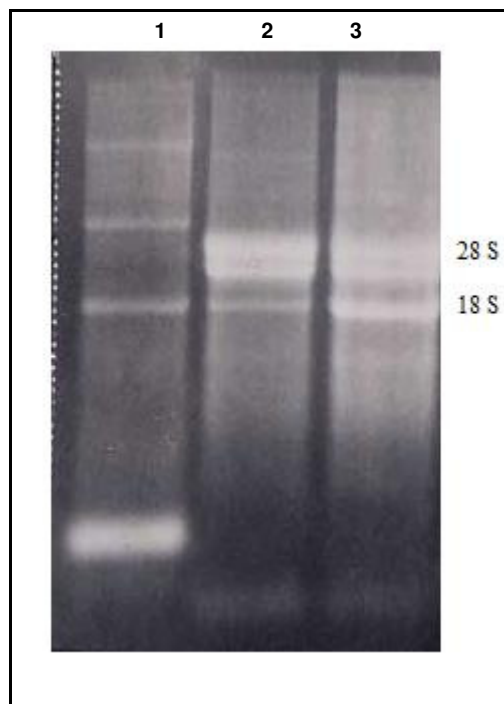


Figura 2. Perfil eletroforético do RNA total do cérebro e hipófise do tabaqui em gel de agarose 1%, em concentrações de 1) 1 µL; 2) 5 µL; 3) 10 µL.

Obteve-se aproximadamente 1000 µg de RNA total, das quais foram utilizados 500µg para o isolamento do mRNA e cerca de 4µg de mRNA para a síntese de cDNA.

A biblioteca produzida apresentou qualidade com cDNAs de tamanhos variados, cujos insertos variaram entre 400 pb e 1Kb. A titulação da biblioteca de cDNA foi estimada em aproximadamente de  $6,0 \times 10^4$  clones recombinantes.



Para o sequenciamento, os plasmídeos foram extraídos dos clones recombinantes em lotes de 96 (em placas) pelo método de lise alcalina. Na Figura 3, é apresentado o resultado da análise de um lote típico por eletroforese em gel de agarose. Pode-se observar plasmídeos de formatos diferentes e que a preparação apresentou-se relativamente homogênea e, portanto, adequada para proceder-se ao sequenciamento.

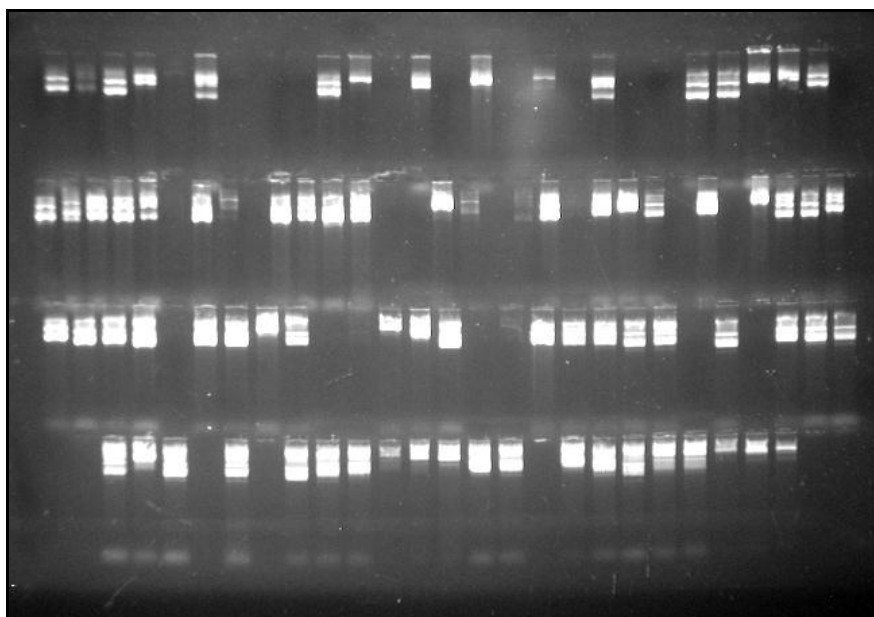


Figura 3. Perfil eletroforético em gel agarose 0,8%, dos plasmídeos extraídos dos clones recombinantes.

### Sequenciamento, anotação funcional e Identificação das ESTs

Foram sequenciados 1.728 clones da biblioteca de cDNA de hipófise/cérebro de tambaquis juvenis. Após a eliminação das sequências de baixa qualidade e dos contaminantes do vetor de clonagem, foram obtidas 1060 (61, 3%) de ESTs válidas, agrupadas em 184 (93, 87%) *contigs* e 12 (6, 13%) *singlets*, apresentando tamanho entre 180 e 1800 pb (Figura 4). Desses 196 agrupamentos “uniques”, 110 agrupamentos apresentaram semelhanças significativas (e-value  $<10^{-6}$ ) com genes presentes no banco não redundante do NCBI e, 85 (43%) sequências não mostraram homologia a qualquer sequência nucleotídica, correspondendo, portanto, a prováveis novidades gênicas. Parte dos 196 transcritos pode ser visualizada na Tabela 1.

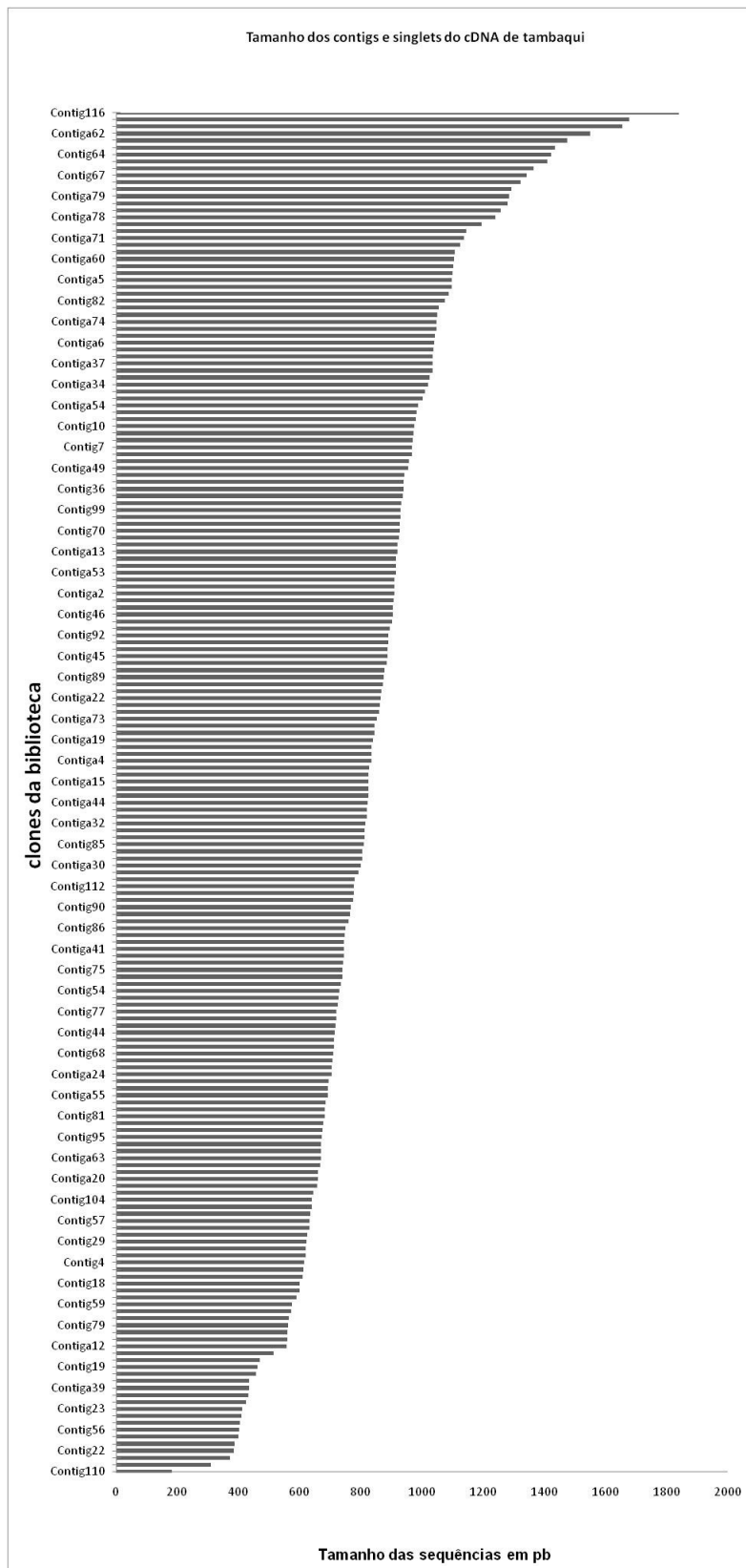


Figura 4. Tamanho das sequências obtidas da biblioteca de cDNA da hipófise e parte do cérebro de tabaqui.

Tabela 1. Resumo do perfil dos transcritos encontrados na hipófise/cérebro do tabaqui.

| Nome       | Gene  | E-value   |
|------------|---|-----------|
| Contig 59  | 40S ribosomal protein S5  | 4,60E-52  |
| Contig 47  | 40S ribosomal protein S5  | 4,35E-106 |
| Contig 24  | 40S ribosomal protein S14   | 2,09E-69  |
| Contig 95  | 40S ribosomal protein S15   | 1,48E-38  |
| Contig 28  | 40S ribosomal protein S17   | 1,31E-48  |
| Contig 37  | 40S ribosomal protein S21   | 1,39E-34  |
| Contig 12  | 40S ribosomal protein S29   | 3,67E-20  |
| Contig 20  | 40S ribosomal protein S7  | 4,60E-81  |
| Contig 5   | 60S ribosomal protein L4  | 1,32E-64  |
| Contig 39  | 60S ribosomal protein L7a   | 5,35E-47  |
| Contig 26  | 60S ribosomal protein L9  | 1,61E-72  |
| Contig 57  | 60S ribosomal protein L11   | 3,11E-92  |
| Contig 31  | 60S ribosomal protein L13   | 4,33E-87  |
| Contig 62  | 60S ribosomal protein L14   | 1,26E-53  |
| Contig 60  | 60S ribosomal protein L18a  | 2,18E-81  |
| Contig 3   | 60S ribosomal protein L18a  | 4,17E-54  |
| Contig 55  | 60S ribosomal protein L21   | 1,55E-74  |
| Contig 55  | 60S ribosomal protein L24   | 2,25E-46  |
| Contig 76  | 60S ribosomal protein L37   | 3,17E-42  |
| Contig 66  | 60S ribosomal protein L37a  | 2,48E-41  |
| Contig 71  | acd protein   | 1,24E-21  |
| Contig 11  | actin-related protein 2 3 complex subunit 4   | 5,21E-04  |
| Contig 46  | alcohol dehydrogenase   | 1,15E-57  |
| Contig 35  | apolipoprotein c-i  | 1,31E-08  |
| Contig 99  | arylsulfatase-activating protein  | 1,08E-97  |
| Contig 53  | atp h+ mitochondrial f0 subunit isoform 1   | 3,17E-26  |
| Contig 102 | beta-2 microglobulin  | 9,79E-31  |
| Contig 86  | beta-globin   | 4,30E-64  |
| Contig 6   | beta-globin   | 5,26E-66  |
| Contig 114 | beta-globin   | 5,36E-67  |
| Contig 70  | Calmodulin  | 6,76E-74  |
| Contig 34  | carnitine palmitoyltransferase 1a   | 5,04E-12  |
| Contig 37  | cathepsin s precursor   | 2,85E-85  |
| Contig 68  | cd209 antigen-like protein d  | 3,93E-25  |
| Contig 109 | cdna sequence isoform cra_a   | 8,89E-50  |
| Contig 29  | cgi-99 protein  | 7,10E-56  |
| Contig 13  | cog1782: metal-dependent consists of a metallo-beta-lactamase domain and an rna-binding kh domain | 3,03E-06  |
| Contig 16  | c-type natriuretic peptide 1 precursor  | 1,35E-11  |
| Contig 111 | cystatin precursor  | 2.18E-32  |
| Contig 28  | cytochrome c oxidase polypeptide mitochondrial precursor  | 9,26E-19  |
| Contig 40  | cytochrome c oxidase polypeptide VI c precursor   | 2,91E-17  |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| Contig 42  | cytochrome c oxidase polypeptide VIII- mitochondrial precursor    | 5,10E-15  |
| Contig 71  | cytochrome c oxidase subunit I                                    | 7,25E-135 |
| Contig 36  | cytochrome c oxidase subunit I                                    | 4,99E-68  |
| Contig 116 | cytochrome c oxidase subunit I                                    | 1,09E-155 |
| Contig 87  | cytochrome c oxidase subunit II                                   | 3,04E-53  |
| Contig 44  | cytochrome c oxidase subunit II                                   | 6,94E-93  |
| Contig 19  | cytochrome c oxidase subunit II                                   | 4,90E-29  |
| Contig 108 | cytochrome c oxidase subunit II                                   | 7,01E-92  |
| Contig 1   | cytochrome c oxidase subunit II                                   | 1,29E-48  |
| Contig 56  | diamine acetyltransferase 1                                       | 6,05E-05  |
| Contig 19  | dna-binding protein inhibitor id-1                                | 1,06E-43  |
| Contig 64  | dna-directed rna polymerase ii largest subunit                    | 3,80E-01  |
| Contig 15  | elongation factor 1-alpha   | 1,05E-64  |
| Contig 17  | elongation factor 1-gamma   | 2,15E-22  |
| Contig 27  | ependymin related protein 1                                       | 1,63E-28  |
| Contig 15  | eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2                 | 3,65E-56  |
| Contig 75  | fatty acid-binding intestinal                                     | 1,85E-51  |
| Contig 82  | fk506-binding protein 2 precursor                                 | 1,74E-58  |
| Contig 74  | fun14 domain containing 2   | 7,79E-40  |
| Contig 101 | glutathione s-transferase   | 4,51E-67  |
| Contig 8   | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                          | 1,21E-71  |
| Contig 63  | growth hormone  | 2,99E-91  |
| Contig 4   | guanine nucleotide binding protein (g protein) beta 5             | 6,02E-73  |
| Contig 54  | h-2 class ii histocompatibility antigen gamma chain               | 4,31E-45  |
| Contig 47  | h-2 class ii histocompatibility antigen gamma chain               | 3,22E-33  |
| Contig 1   | hemoglobin alpha adult-1  | 1,38E-37  |
| Contig 29  | hemoglobin subunit alpha-4  | 7,35E-19  |
| Contig 9   | histone h2av  | 9,45E-30  |
| Contig 25  | homeobox prox 1 variant 3   | 0.0222879 |
| Contig 105 | hyaluronan and proteoglycan link protein 4                        | 4,15E-88  |
| Contig 98  | hypothetical loc792613  | 4,96E-20  |
| Contig 12  | hypothetical protein Abu_1491 [Arcobacter butzleri RM4018]        | 0.0869531 |
| Contig 46  | iclp2 protein   | 3,15E-32  |
| Contig 26  | isoform cra_b   | 8,08E-65  |
| Contig 97  | leucine rich repeat containing 40                                 | 1,81E-90  |
| Contig 30  | leucine rich repeat transmembrane neuronal 2                      | 1,24E-41  |
| Contig 72  | lim domain only 7 <sup>a</sup>                                    | 2,23E-12  |
| Contig 49  | loc495693 protein   | 2,99E-72  |
| Contig 103 | lysosome-associated membrane glycoprotein 1                       | 3,10E-10  |
| Contig 6   | membrane-associated ring finger 7                                 | 6,71E-62  |
| Contig 45  | mitochondrial fission 1 protein                                   | 7,53E-38  |
| Contig 65  | multiple myeloma overexpression gene 2 variant 1                  | 2,22E-10  |
| Contig 67  | Myoglobin   | 9,13E-26  |
| Contig 50  | Myotrophin  | 1,02E-32  |
| Contig 70  | nadh dehydrogenase fe-s protein 75kda (nadh-coenzyme q reductase) | 3,19E-08  |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| Contig 112 | nadh dehydrogenase subunit 1  | 2,91E-65   |
| Contig 21  | nadh dehydrogenase subunit 4  | 1,46E-71   |
| Contig 14  | nadh dehydrogenase subunit 4  | 1,40E-61   |
| Contig 10  | nattectin precursor   | 5,75E-18   |
| Contig 72  | neurofilament I subunit   | 1,99E-09   |
| Contig 93  | nuclear receptor subfamily group member 2   | 7,79E-18   |
| Contig 59  | ornithine decarboxylase antizyme 1  | 4,04E-34   |
| Contig 69  | Prolactin   | 7,12E-50   |
| Contig 90  | protein kinase alpha  | 8,75E-15   |
| Contig 2   | regulator of chromosome   | 0.0600669  |
| Contig 40  | reticulon 3   | 9,56E-54   |
| Contig 18  | reticulon 4b  | 1,08E-04   |
| Contig 67  | s100 calcium binding beta   | 6,52E-20   |
| Contig 3   | s100 calcium binding beta   | 5,22E-01   |
| Contig 33  | sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1 (nuclear structure protein 5) (sperm antigen hcmogt-1) | 6,68E-22   |
| Contig 115 | storkhead box 2   | 4,12E-23   |
| Contig 42  | subfamily member partial  | 0.00161982 |
| Contig 51  | succinate dehydrogenase subunit flavoprotein  | 5,96E-101  |
| Contig 85  | suppressor of ty 4 homolog 1  | 7,56E-44   |
| Contig 58  | thymosin beta-11  | 5,09E-09   |
| Contig 50  | tubulin beta-2c chain   | 9,77E-39   |
| Contig 80  | tyrosine 3-monooxygenase tryptophan   | 1,50E-66   |
| Contig 32  | 5- monooxygenase activation gamma polypeptide   | 1,78E-89   |
| Contig 61  | tyrosine 3-monooxygenase tryptophan   | 1,78E-89   |
| Contig 61  | 5-monooxygenase activation epsilon polypeptide  | 1,78E-89   |
| Contig 61  | ul126_hcmva full=uncharacterized protein ul126  | 7,37E-22   |

---

Para categorização dos genes de cDNA da hipófise e parte do cérebro de tabaqui, foi utilizado o programa Gene Ontology. O resultado da análise indicou que a maioria das ESTs corresponde à categoria de função molecular (63%), seguido das categorias de componente celular (20%), e de processo biológico (17%). Os percentuais podem ser vistos na Figura 5.

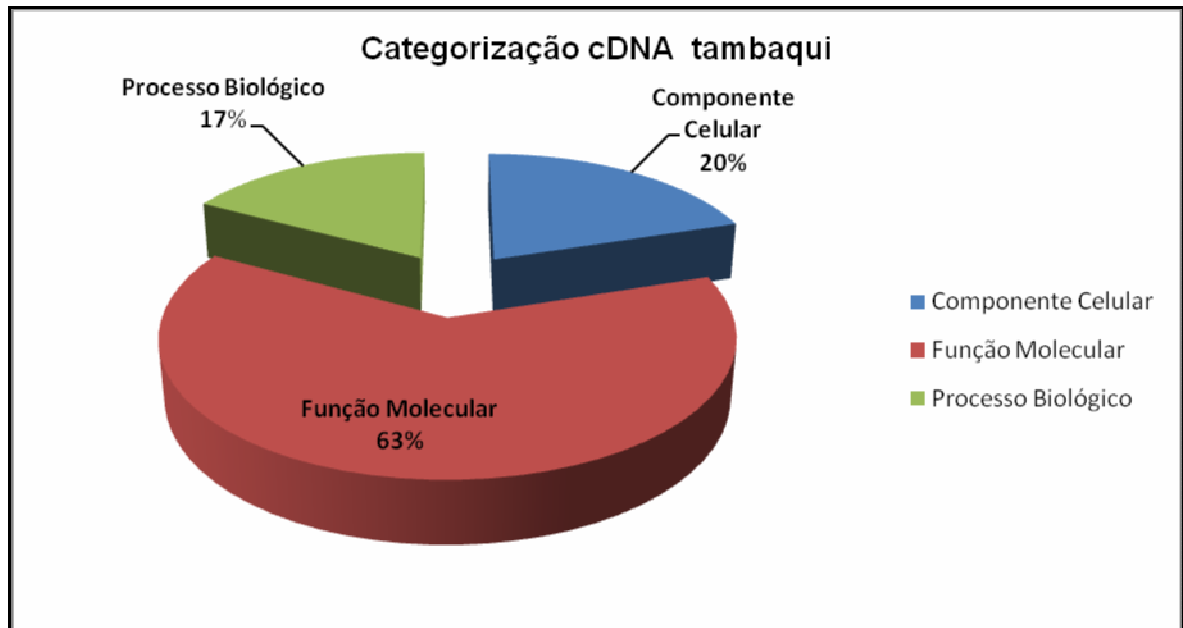


Figura 5. Categorização da biblioteca de cDNA de tabaqui de acordo com o Gene Ontology.

Os transcritos da biblioteca de cDNA do tabaqui mostraram alta similaridade com sequências gênicas de *Salmo salar* (Salmão) e de *Danio rerio* (paulistinha), como observado na Figura 6.

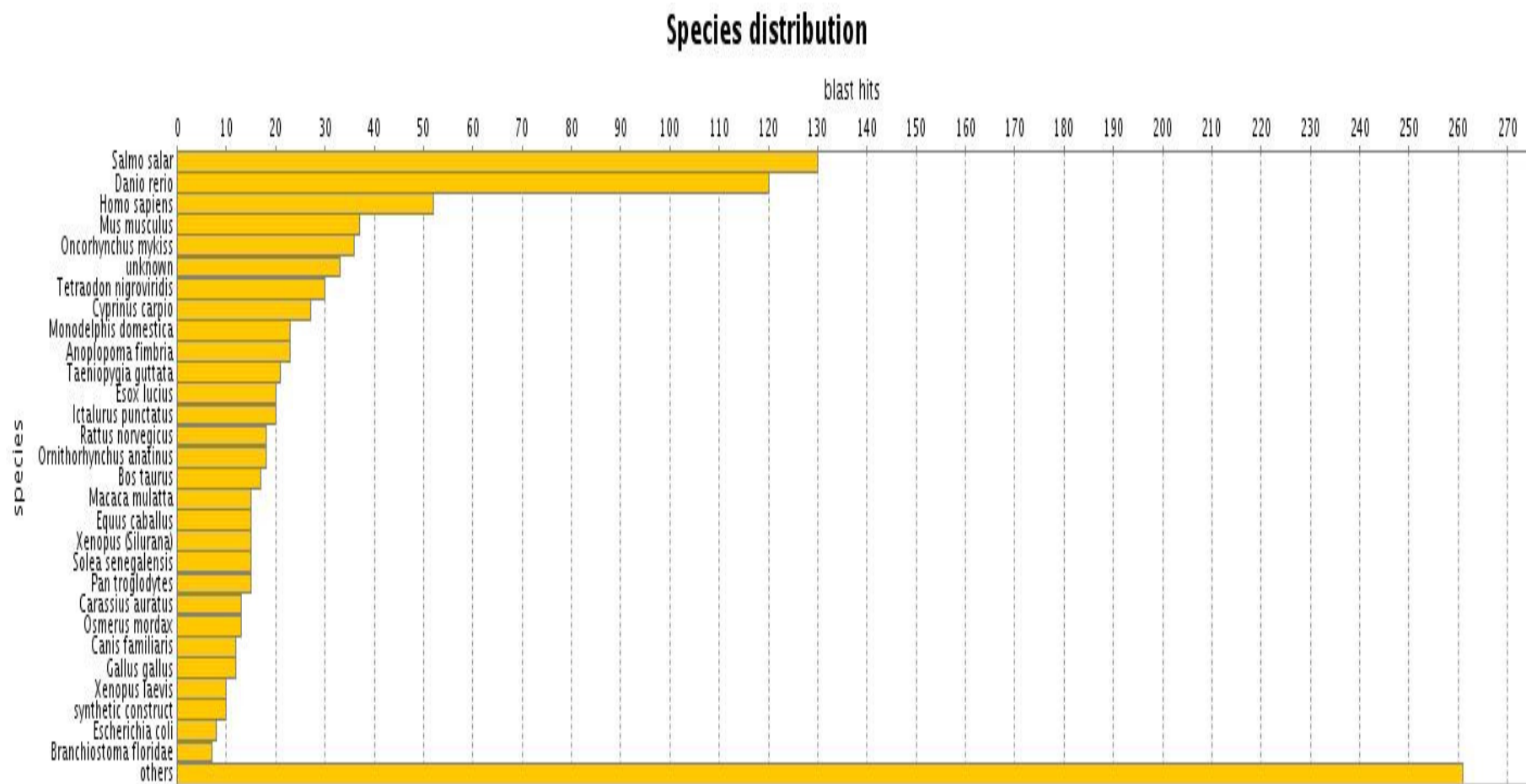


Figura 6. Distribuição de similaridade das seqüências de ESTs de tabaqui com os organismos do banco de dados da Uninilton Lins.

Os transcritos de genes de proteínas ribossomais mostraram-se muito frequentes na presente biblioteca (9.7%). Os mais abundantes da subunidade maior (60S) foram: proteína ribossomal L4, proteína ribossomal L7a, proteína ribossomal L9, proteína ribossomal L11, proteína ribossomal L13, proteína ribossomal L14, proteína ribossomal L18a, proteína ribossomal L21, proteína ribossomal L24, proteína ribossomal L37a e proteína ribossomal L37. Os mais abundantes da subunidade menor (40S) foram: proteína ribossomal S5, proteína ribossomal S7, proteína ribossomal S14, proteína ribossomal S15, proteína S15a, proteína ribossomal S17, proteína ribossomal S21 e proteína ribossomal S29.

O outro grupo de transcrito mais expresso nesta biblioteca foi àquele relacionado à mitocôndria (6,6%), tais como: citocromo b, citocromo c oxidase subunidade I, citocromo c oxidase subunidade II, citocromo c oxidase subunidade IV, NADH subunidade 1, NADH subunidade 4.

A grande abundância de transcritos de genes de proteínas ribossomais e de genes de proteínas da cadeia de transporte de elétrons/fosforilação é indicativo de que os tecidos são muito ativos metabolicamente, o que é compatível com o fato dos tabaquis analisados estarem em plena fase de crescimento.

### **Sequência do cDNA do hormônio de crescimento**

Conforme observado na tabela 2, por meio de análises de bioinformática foi possível identificar o cDNA do hormônio de crescimento (GH). O contig 63, que agrupou sequências de três clones, apresentou 90.5% de similaridade com o GH de *Piaractus mesopotamicus* (pacu), espécie pertencente a mesma família do tambaqui. O GH de tambaqui possui 534 nucleotídeos (178 aminoácidos). Por razões de desenvolvimento tecnológico a sequência nucleotídica foi omitida.

O tambaqui apresentou alta similaridade aminoacídica com o GH de outras espécies de peixes teleósteos (Figura 7). É possível observar no alinhamento múltiplo o gap de 10 aminoácidos (equivalente a 30 nucleotídeos) na região do éxon 4, a qual separa os Characiformes + Siluriformes dos Cypriniformes. O mapa metabólico deste hormônio pode ser visualizado no anexo E.



```

1-----20-----40-----60-----80-----110
Cyprinus      MARVLVLLSVVLVSLLVNQGRASDNQRLFNNNAVIRVQHLHLQLAAKMINDFEDSLLPEERRQLSKIFPLSFCNSDYIEAPAGKDETQKSSMLKLLRISFHILIESWEFPSQS
Megalobrama  MARALVLLSVVLVSLLVNQGTASENQRLFNNNAVIRVQHLHLQLAAKMINDFEDNLLPEERRQLSKIFPLSFCNSDSIEAPTGKDETQKSSMLKLLRISFRILIESWEFPSQT
Catla        MARALVLLSVVLVSLLVNQGRASDNQRLFNNVVRVQHLHLQLAAKMINDFDDNLLPEDRRLLSKTI PMSFCISDYIEAPTGKDEAQRSSMLKLLRISFRILIESWELASQI
Silurus      MARVWVLLSVVLASLFFSQGATFENQRLFNNNAVIRVQHLHLQLAAKMMGDFEALLPEERKQLSKIFPLSFCNSDSIEAPSGKDETQKSSVLKLLHTSYRLIESWEFPSKN
Ictalurus    MARVLVLLSVVVASLFFSQGATFESQRLFNNNAVIRVQHLHLQLAAKMMDDFEEALLPEERKQLSKIFPLSFCNSDSIEAPAGKDEAQQSSVLKLLHTSYRLIESWEFPSRN
Heteropneustes MARVLVLLSVVVASLFFSQGATFENQRLFNNNAVIRVQHLHLQLAAKMMDDFEEALLPEERKQLSKIFPLSFCNSDSIEAPAGKDETQKSSVLKLLHTSYRLIESWEFPSKN
Clarias      MARVLVLLSVVVASLFFNQGATFETQRLFNNNAVIRVQHLHLQLAAKMMDDFEEALLPEERKQLSKIFPLSFCNSDSIEAPAGKDETQKSSVLKLLHTSYRLIESWEFPSKN
Rhamdia      MARVLVLLSLAMASLYVSGSTLESQRLFNNAVARVQHLHLQLAAKMMDDFDEALLPEERKQLGKIFPLSFCNSDSIEAPAGKDETQKSSVLKLLHTSYRLIDSWDFPSRT
Colossoma    -----SENQRLFNNNAVIRVQHLHLQLAAKMITDFEESLLPEERRQLSKIFPLSFCNSDSIEAPTGKDETQKSSVLKLLHISYRLIESWEYPSRI
Piaractus    -----SDNQRLFNNNAVIRVQHLHLQLAAKMITDFEESLLPEERRQLSKIFPLSFCNSDSIEAPTGKDETQKSSVLKLLHISYRLIESWEYPSRI

111-----130-----150-----170-----190-----211
Cyprinus      LSGTVSNSTLVGNPNQLTEKLADLKMGISVLIQACLDGQPNMDDNDSLPLPFEDFYLTMGENNLRRESFRLACFKKDMHKVETYLRVANCRRLDSDNCTL
Megalobrama  LSGAISNSTLVGNPNQITEKLADLKVGISVLIKGCLDGQPNMDDNDSLPLPFEDFYLTMGESSLRESFRLACFKKDMHKVETYLRVANCRRLDSDNCTL
Catla        LSRTVSNSTLVGSPNQINEKLADLEMGISVLTGKCLDGHPNMDDNDSLPLPFEDFYLTSEDNDLTKNFRLLACFKKDMHKVETYLRVANCRRLDSDNCTL
Silurus      LG-----NPNHISEKLADLKMGI GVLIEGCMGQTS LDENDSLAPPFEDFYQTLTEGNLRKSFRLSCFKKDMHKVETYLSVAKCRRSLDSDNCTL
Ictalurus    LG-----NPNHISEKLADLKMGI GVLIEGCVDGQTL DENDSLAPPFEDFYQTLSEGNLRKSFRLSCFKKDMHKVETYLSVAKCRRSLDSDNCTL
Heteropneustes LG-----NPNHISEKLADLKMGI GVLIEGCVDGQTL DENDAFAPPFEDFYQTLSEGNLRKSFRLSCFKKDMHKVETYLSVAKCRRSLDSDNCTL
Clarias      LG-----NPNHISEKLADLKMGI GVLIEGRVDGQTL DENDAFAPPFEDFYQTLSEGNLRKSFRLSCFKKDMHKVETYLSVAKCRRSLDSDNCTL
Rhamdia      LG-----NPNHISDKLADLKVGI SVLIERCVDGQTTL DEIDSLAPPFEDFYQTPSEGNLSKHFRLSCFKKDMHKVETYLSVAKCRRSLDSDNCTL
Colossoma    LG-----NPNQITEKLADLKVGI SVLIKGCLDGQPNMDDNESLPLPFEDFYQTLGDGNLRKSFRLACFKKDMHKVETYLRVANCRRLDSDNCTL
Piaractus    LG-----NPNQITEKLADLKVGI SVLIKGCLDGQPNVDDNESLPLPFEDFYQTLGDGNLRKSFRLACFKKDMHKVETYLRVANCRRLDSDNCTL

```

Figura 7. Alinhamento aminoacídico múltiplo do cDNA do hormônio de crescimento de Cypriniformes (*Cyprinus carpio*, *Megalobrama amblycephala*, *Catla catla*), Siluriformes (*Silurus meridionalis*, *Ictalurus punctatus*, *Heteropneustes fossilis*, *Clarias gariepinus*, *Rhamdia quelen*) e Characiformes (*Colossoma macropomum* e *Piaractus mesopotamicus*). A sequência de tambaqui corresponde ao consenso dos três clones e dos produtos de PCR. A região do peptídeo sinal de tambaqui e pacu foi omitida. A lacuna de 10 aminoácidos corresponde a uma deleção no exon 4.

### Expressão da mensagem genética do tGH em *P. pastoris*

O GH foi amplificado sem a sequência codificadora do peptídeo sinal nativo do GH, pois para a secreção do gene recombinante foi utilizado a sequência sinal do fator  $\alpha$  de *S. cerevisiae* presente no vetor de expressão pPIC9. Para a construção do códon ótimo, foi feita a seleção manual dos códons preferenciais para *Pichia pastoris* e GH, sendo selecionado o de maior percentual

Uma vez determinada a sequência completa da região codificadora do tGH, procedeu-se a conversão para os códons mais utilizados por *P. pastoris* e a síntese química da molécula foi realizada pela empresa GENSCRIPT®. Foram introduzidas nas extremidades 5' e 3' os sítios das enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*, para facilitar a subclonagem em fase com a sequência codificadora do fator- $\alpha$  do vetor pPIC9 e para garantir a secreção do hormônio na levedura. A molécula sintetizada quimicamente foi inicialmente clonada no vetor pUC57 (Figura 8).

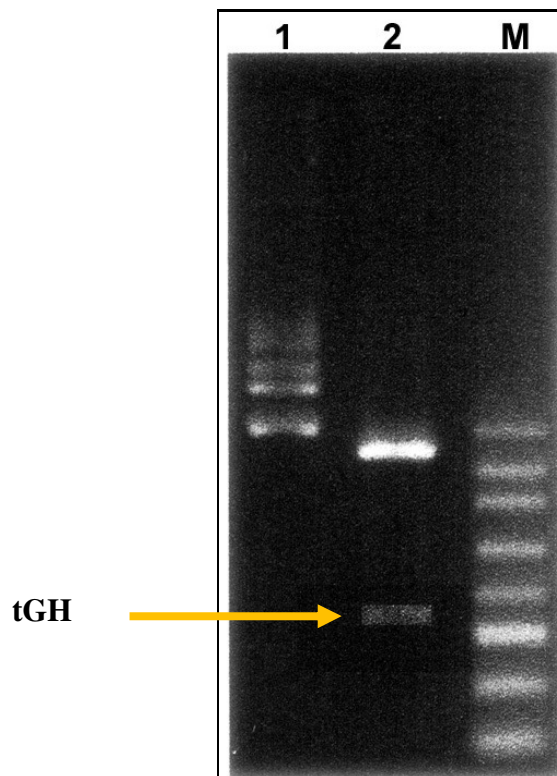


Figura 8. Perfil de restrição do vetor pUC57 com as enzimas de restrição e *EcoRI* e *NotI*. 1- Vetor pPIC9 intacto; 2: vetor digerido com *EcoRI* e *NotI*; M: marcador de peso molecular (Ladder 1000 pb). A seta indica a banda referente a sequência codificadora do tGH.

Após a digestão dupla com *EcoRI* e *NotI* o inserto foi purificado por eletroforese em gel de agarose e subclonado no vetor pPIC9 pré-digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo recombinante resultante da ligação da sequência do GH ao vetor, foi denominado de pPIC-tGH e utilizado a seguir para transformação genética de *P. pastoris* (Figura 9).

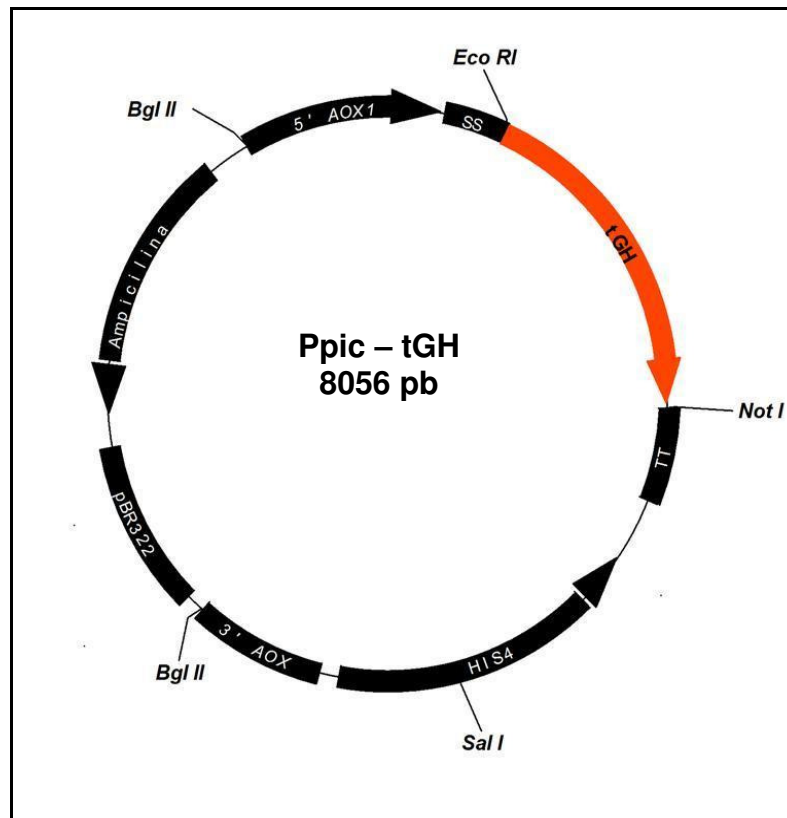


Figura 9. Figura esquemática do plasmídeo recombinante pPIC-tGH. A sequência codificadora do GH está em colorido enquanto o restante representa o vetor pPIC9.

### Transformação e integração do cassete de expressão em *Pichia pastoris*

No presente estudo, foi utilizada uma estratégia para integração do cassete de expressão no genoma de *Pichia pastoris*. Esta consistiu na digestão do vetor de expressão com a enzima de restrição *Sal* I que corta especificamente no interior do locus *His4* (histidinol desidrogenase), cuja marca permitiu a seleção de transformantes prototróficos  $\text{His}^+$ . Os produtos de digestão do plasmídeo recombinante pPIC-tGH com a enzima de restrição *Sal*I foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Figura 10). Esta enzima possui um único sítio de restrição localizado no meio da sequência do gene *His4*. A integração gerou transformantes do tipo  $\text{Mut}^+$  (Figura 11). Utilizando a estratégia de eletroporação foi obtido um total de 44 clones transformantes resultantes de dois ciclos de transformação genética.

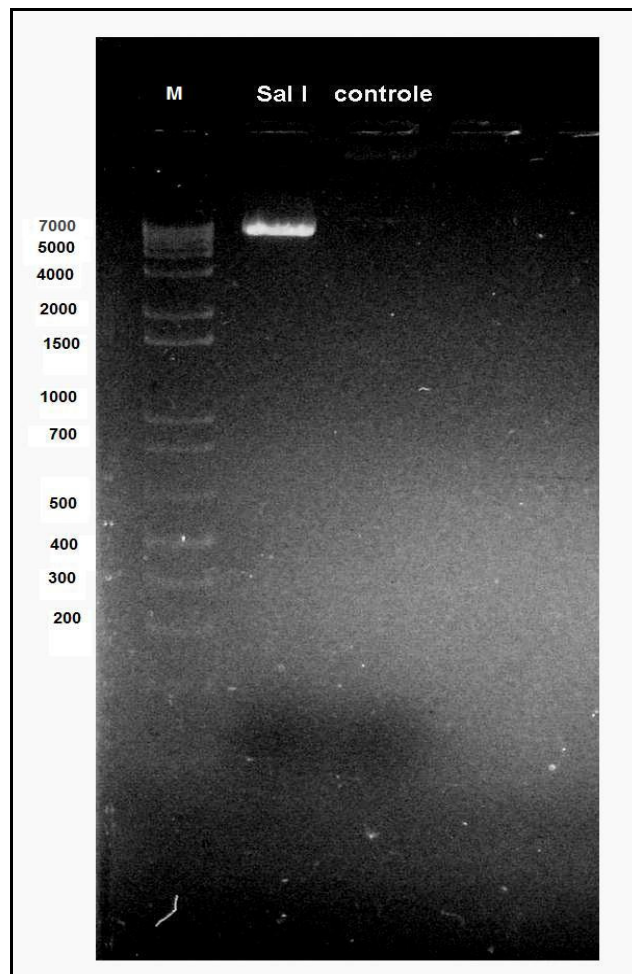


Figura 10. Perfil eletroforético do produto de digestão vetor pPIC-tGH com a enzima *SalI*.

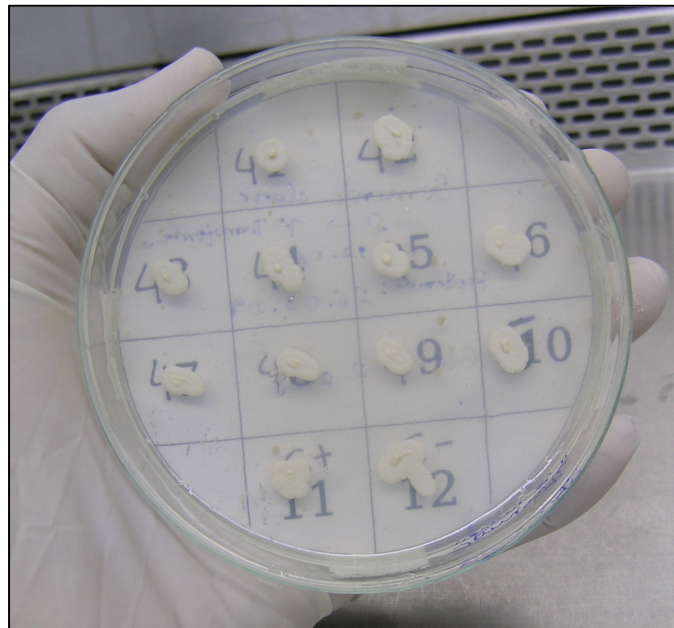


Figura 11. Seleção dos clones após transformação da *P. pastoris* com o plasmídeo pPIC-tGH digerido com a enzima *SalI*.

### **Expressão de tGH recombinante em *Pichia pastoris***

A Figura 12 mostra o crescimento do clone 2 de *P. pastoris* recombinante em função do tempo de cultivo em meio contendo o indutor metanol. Pode-se observar que a cultura atinge o máximo de crescimento em 72h, posteriormente seguindo para a fase de degradação. Em experimentos realizados em laboratório com expressão/secreção de alfa-amilase de *Bacillus subtilis* por *P. pastoris*, observou-se que em 72h havia maior secreção da enzima recombinante. Por isso, esse tempo foi escolhido para analisar-se a expressão/secreção de tGH na levedura.

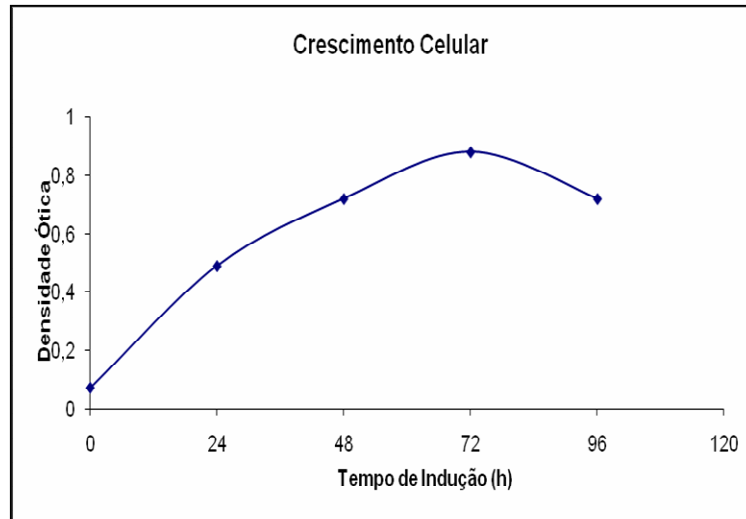


Figura 12. Gráfico da cinética de indução do clone 2 de pPIC-tGH durante 96 horas de indução com metanol, à 30° C sob agitação de 200 rpm.

Em um *screening* preliminar, foram cultivados 17 clones recombinantes no meio líquido BMGY-U contendo o indutor metanol, por 72 horas. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e a presença do tGH foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS. O objetivo dessa indução foi detectar os melhores clones recombinantes.

A Figura 13 mostra o perfil eletroforético dos sobrenadantes (proteínas secretadas) de 3 clones selecionados (1, 2 e 3), sendo possível identificar a banda do tGH recombinante correspondendo a massa molecular de aproximadamente 22 kDa, tamanho próximo ao marcador hGH. Esta mesma banda de proteína estava ausente em outros clones e no controle não transformado com o mesmo vetor (dados não mostrados). Portanto, a massa molecular do produto secretado corresponde ao tamanho esperado, embora tenham sido observadas diferenças no nível de expressão dos clones recombinantes.

O clone 2 foi o que apresentou a banda tGH mais forte, ou seja, é o melhor produtor dentre os 17 recombinantes analisados, tendo sido por isso selecionado para trabalhos futuros. Utilizando o programa Image Master® Platinum (GE-Healthcare) foi possível estimar em 12,9 µg de tGH aplicado no gel, o que corresponde a 21 µg/ml (21 mg/L) do hormônio secretado pela *P. pastoris*.

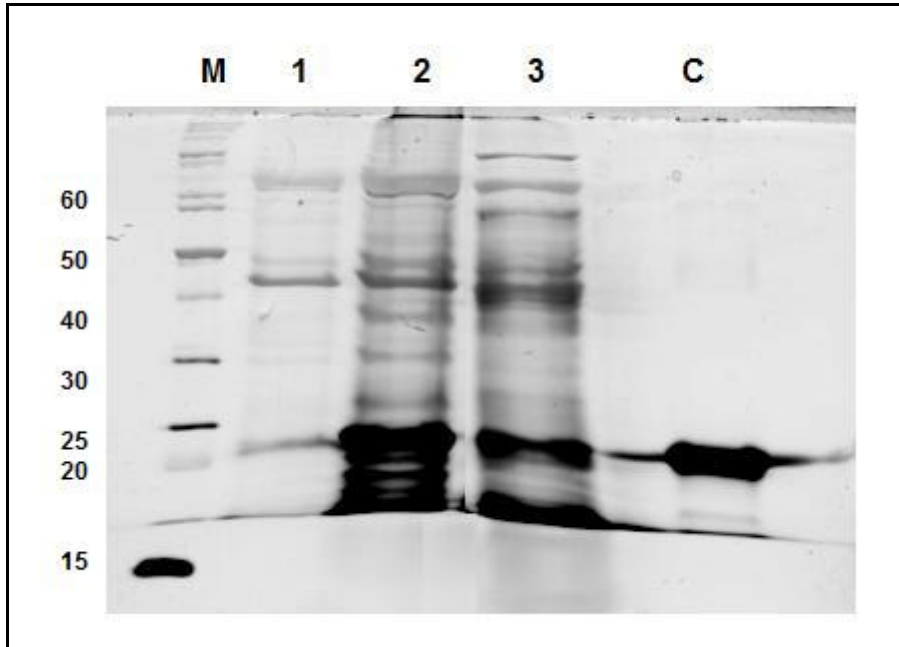


Figura 13. Análise da expressão do tGH recombinante. Sobrenadante das proteínas em gel desnaturante SDS-PAGE 15%. M: Marcador de massa molecular *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas); linhas de 1 a 3: clones expressando pPIC-tGH; C: marcador hGH<sup>®</sup>.

## 5. DISCUSSÃO

### A biblioteca de cDNA

Nesta tese foram geradas etiquetas de sequências expressas (ESTs), a partir de uma biblioteca de cDNA de hipófise e de partes de cérebro de uma importante espécie de peixe da região amazônica, o *Colossoma macropomum* que é mais conhecida como tambaqui. De um total de 1728 sequências obtidas, gerou-se 1060 etiquetas de sequências expressas, as quais foram agrupadas em 184 *contigs* e 12 *singlets*.

Uma das particularidades que mais chamam a atenção na biblioteca de cDNA de hipófise e de parte do cérebro do tambaqui analisadas no presente estudo, foi a baixa quantidade de transcritos encontrados em relação à quantidade de clones sequenciados. A possível explicação para esse fato foi a baixa qualidade da biblioteca de cDNA, que resultou na alta redundância dos transcritos. Assim, como a biblioteca de cDNA não foi normalizada é esperada elevada redundância (alguns poucos genes presentes em alta frequência) e baixa representatividade.

Apesar disso, dentre os *contigs* gerados no sequenciamento, foi identificado o hormônio de crescimento, o qual por ser estratégico para futuras aplicações biotecnológicas foi selecionado para uma abordagem envolvendo a clonagem e expressão.

Com intuito de proceder a análise comparativa com sequências de ESTs de tambaqui, realizou-se uma busca rápida no banco público de etiquetas de sequências expressas do dBest-NCBI([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST\\_summary.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST_summary.html)) e foi observado que até o momento ainda não tinha sido feito nenhum depósito de ESTs de *C. macropomum*, apesar de haver registros da existência de ESTs geradas em dissertações e teses brasileiras (ver Pinheiro, 2007; Casanova, 2008).

Contudo, as ESTs de hipófise e de partes do cérebro de juvenis de tambaqui, um caracídeo de água doce, apresentaram uma alta similaridade com os transcritos de outros peixes, ou mesmo de outros organismos vertebrados. Quando comparados ao banco de sequências de peixes disponíveis no servidor do Centro Universitário da Nilton Lins, foi possível observar que a maior similaridade das sequências de ESTs de tambaqui foi com as ESTs do peixe salmão (*Salmo salar*), seguido da espécie paulistinha (*Danio rerio*), como destacado na figura 6.

Com o emprego da bioinformática foi possível fazer uma análise preliminar dos transcritos presentes na hipófise e em parte do cérebro do tambaqui e,



comparar com transcritos de cérebro de outros peixes teleósteos, como o *Ictalurus punctatus* (Ju *et al.*, 2000), e de tecidos próximos ao cérebro, como o hipotálamo, de outros vertebrados. Dentre os transcritos, obteve-se 43% de índice de novidade, similar ao registrado em outras bibliotecas de cDNA de peixes.

Com base nas categorias funcionais geradas pelo consórcio responsável pela classificação dos genes presentes em organismos (*Gene Ontology*), os transcritos foram agrupados em três grandes categorias: função molecular, componente celular e processo biológico.

Neste aspecto, a maioria dos transcritos está envolvida com a função molecular (63%), nos quais as seguintes sub-categorias mostraram-se presentes: ligação, atividades catalíticas, atividade estrutural da molécula, atividade reguladora da transcrição, atividade de transdução de sinal, atividade de transporte, e atividades regulatórias enzimáticas. Isso demonstra que tais genes estão em plena atividade nos transcritos da hipófise e parte do cérebro dos juvenis do tambaqui.

Na biblioteca de cDNA de tambaqui os transcritos mais expressos pertenceram a um grupo gênico codificador de proteínas ribossomais e mitocondriais. Sabe-se que genes codificadores de proteínas ribossomais são abundantes em bibliotecas de cDNA de peixes (Karsi *et al.*, 2002; Paterson *et al.*, 2003).

Os ribossomos catalizam a tradução do RNA mensageiro em proteínas e no caso dos ribossomos eucarióticos (80S) são conhecidos 4 tipos de rRNA: 5S; 5.8S e 28S (que fazem parte da subunidade maior - 60S) e o 18S (que constitui a subunidade menor - 40S) e aproximadamente outras 80 proteínas ribossomais. As proteínas ribossomais das famílias gênicas *rps* e *rpl* agrupam-se no núcleo do RNA e cada proteína reconhece seu sítio de ligação específico e, juntos agem na dinâmica da macromolécula.

A análise dos transcritos da biblioteca de cDNA de tambaqui revelou a presença dos genes *rps5*, *rps7*, *rps11*, *rps14*, *rps15*, *rps26*, *rps29* (associados à subunidade ribossomal menor – 40S) e *rpl2*, *rpl7a*, *rpl10a*, *rpl3*, *rpl8a*, *rpl36a*, *rpl37* (associados à subunidade maior 60S). As sequências nucleotídicas do transcrito de *C. macropomum* (tambaqui) apresentaram alta similaridade às de *Ictalurus punctatus* (bagre de canal) e *Danio rerio* (paulistinha), com identidade superior a 80% entre as espécies.

No que diz respeito à abundância de transcritos mitocondriais este tipo de resultado também já foi observado em outras bibliotecas de cDNA de peixes (Karsi *et al.*, 2002; Paterson *et al.*, 2003).

Genes mitocondriais como o de citocromo b e de citocromo c oxidase I e II, que estão relacionados a energia e metabolismo, também foram altamente expressos no cérebro de *Ictalurs punctatus* (Ju *et al.*, 2000), assim como no hipotálamo de machos adultos de *Epinephelus coiodes* (Zhou *et al.*, 2006).

Essas constatações se devem ao fato de que nos vertebrados o cérebro é metabolicamente um dos mais ativos de todos os órgãos e sensível a perturbações do metabolismo de energia (Magistretti, 1999), além do que, os tambaquis jovens estão em fase de crescimento acelerado, dessa forma, a fosforilação oxidativa mitocondrial fornece a maior parte dos ATP necessários para impulsionar as diversas atividades neuronias energeticamente exigentes em teleósteos (Suarez, 1988; Yang & Somero, 1993).

O percentual de genes mitocondriais encontrado na biblioteca foi de 6,6%, próximo aos percentuais encontrados no transcrito do cérebro de *Ictalurs punctatus* que foi de 6.2% (Ju *et al.*, 2000) e no transcrito do cérebro de *Lates calcarifer* que foi de 7.31% (Tan *et al.*, 2008), Por outro lado, a abundância no hipotálamo de tilapia adulta *Oreochromis mosambicus* (Shiue *et al.*, 2004) e, no hipotálamo de machos adultos de *Epinephelus coiodes* (Zhou *et al.*, 2006), foi superior (11.9% e 10.2%, respectivamente).

Dentre as ESTs sequenciadas, alguns transcritos merecem destaque por desempenharem funções metabólicas importantes, por exemplo: beta-2 microglobulina; carnitina palmitoyltransferase 1; álcool dehidrogenase; hemoglobina alfa; apolipoproteína c; precursor da catepsina s; glutatona s-transferase; diamina acetyltransferase 1; fator de alongação 1-gamma; fator de alongação 1 beta 2; GH e prolactina.

Dos genes destacados acima, alguns podem ser de interesse biotecnológico como as glutatona s-transferase, que pertencem a uma superfamília multigênica de enzimas diméricas, multifuncionais e associados à degradação de xenobióticos; os que fazem parte do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC), como as beta-2 microglobulina; os do precursor da catepsina s cuja enzima madura é uma protease de cisteína altamente ativa, pertencente à superfamília da papaína; os da prolactina a qual também atua na promoção do crescimento.

Além desses resultados foi possível, fazer uma breve análise da sequência de GH do tambaqui e comparar com outras sequências de GH de peixes depositadas no genbank. Porto & Assunção, 2005 e Pinheiro *et al* 2008, identificaram que tambaqui (*C. macropomum*) e o pacu do pantanal (*P. mesopotamicus*) não possuem 10 aminoácidos no quarto exón do hormônio de crescimento, e a análise comparativa com outras sequências de Cypriniformes e Siluriformes permitiu-nos detectar que essa característica é compartilhada somente com as espécies da ordem Siluriformes, como destacado na figura 7.

### **Clonagem e expressão da mensagem genética do hormônio de crescimento**

Nesta análise foi possível identificar genes relacionados à indução do crescimento, como a prolactina e o hormônio do crescimento. E, considerando a natureza do nosso interesse, foi escolhido apenas o hormônio do crescimento.

Muitas pesquisas na área de aquicultura têm se voltado para a clonagem deste gene, quer seja para avaliação de crescimento de peixes ou estudos evolutivos. A melhoria das taxas de crescimento natural de peixe tem sido amplamente explorada na aquicultura, com os ganhos decorrentes de melhorias na produção animal, nutrição e seleção genética (Fjalestad *et al.*, 2003; Pennel e Barton, 1996). O crescimento adicional pode proporcionar vantagens para a aquicultura, encurtando o tempo de produção, aumentando a eficiência e conversão alimentar e, controlando a disponibilidade dos produtos.

Nesta tese, a sequência codificadora do GH do tambaqui foi otimizada (“*codon usage*”) e sintetizada quimicamente para ser utilizado em um sistema capaz de expressar e secretar o tGH recombinante. A expressão e secreção do tGH recombinante do tambaqui foi feita na levedura metilotrófica *P. pastoris* e, a produção foi desenvolvida sob o controle de um promotor forte e induzível (AOX1).

Em termos biotecnológicos, a levedura metilotrófica *P. pastoris* apresenta algumas vantagens como: processo fermentativo bem estabelecido e economicamente viável, metodologia de manipulação genética bem estabelecida, expressão de proteínas heterólogas sob o controle de promotores fortes e induzíveis e produção de proteínas heterólogas em grande quantidade (Cregg *et al.*, 1993). A literatura é bem ampla quanto às possibilidades do uso de sistemas de clonagem e expressão, sendo que todos apresentam vantagens e desvantagens.

Nos últimos anos a *P. pastoris* vem sendo amplamente utilizada devido a algumas características como, uma maior expressão e secreção dos produtos de

interesse, o baixo custo, a existência de um promotor forte e regulável (gene álcool oxidase I - AOX1) (Cereghino & Cregg, 2000).

O GH de várias espécies de peixes também tem sido expressos e secretados em *Pichia pastoris* a fim de verificar o efeito de crescimento em juvenis e dessa forma acelerar o seu crescimento em condições de cultivo (Ouyang *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2003; Palma-Nicolas *et al.*, 2005, Acosta *et al.*, 2007).

Nos experimentos de integração no genoma da levedura metilotrófica, foi possível observar a ocorrência de eventos de recombinação homóloga simples, num processo conhecido como adição gênica, que não altera o fenótipo da linhagem hospedeira (Cregg *et al.* 1993). A transformação de *P. pastoris* com o plasmídeo pPIC-tGH, por eletroporação, foi realizada com sucesso e está de acordo com alguns trabalhos que utilizaram estratégia parecida, como na secreção do GH de humano (Escamilla-Treviño *et al.*, 2000) e na expressão da  $\alpha$ -amilase (Muller, 2008).

Com os experimentos realizados neste trabalho, foi possível alcançar uma boa concentração de GH nos sobrenadante dos clones induzidos por metanol. Resultados similares foram encontrados em outros trabalhos de expressão de GH de peixes por *P. pastoris* quando induzida pelo metanol. O tempo de indução de 72hs também se iguala aos resultados encontrados por Li *et al.* (2003) e Acosta *et al.* (2007), como o melhor tempo de indução do GH recombinante.

O nível de expressão de uma proteína recombinante depende de vários outros fatores como sua sequência nativa de cDNA, do “*códon bias*”, do número de cópias, temperatura, pH, tempo de indução e concentração da indução (D’Anjou & Daugulis, 2000). De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, a proteína foi secretada eficientemente, sendo que o clone 2 foi o que apresentou a maior expressão do hormônio de crescimento. Por essa razão foi selecionado para análises/trabalhos futuros.

Apesar de não ter sido possível confirmar por cromatografia de massa, o padrão de banda observado na Figura 13, apresenta o mesmo perfil já descrito em outros trabalhos de expressão heteróloga de GH, como exemplo, o GH humano (Escamilla-Treviño *et al.*, 2000), GH canino (Ascacio-Martinez & Barrera-Saldaña, 2004) e GH de peixes (Li *et al.*, 2003; Acosta *et al.*, 2007).

A maioria das proteínas secretadas por *P. pastoris* são glicosiladas, o que pode ou não afetar a atividade biológica da proteína recombinante. A glicosilação é uma modificação pós-traducional que ocorre no retículo endoplasmático e

posteriormente no aparelho de Golgi. Em peixes, a glicosilação da proteína GH foi descrita no salmão (Wagner *et al* 1985) e na carpa da Índia (Vegunopal *et al.*, 2002).

Em nossas análises, não foram encontrados sítios clássicos de N ou O-glicosilação na sequência do tGH, sugerindo que essa proteína não seja glicosilada. O tGH recombinante apresentou o mesmo tamanho do marcador hGH (hormônio de crescimento humano), corroborando a hipótese de que não há sítios de glicosilação na proteína.

Resultado similar foi encontrado por Ascacio-Martinez & Barrera-Saldaña (2004), que detectaram ausência de glicosilação do GH recombinante de *C. familiares*, ao contrário de Müller (2008), que observou glicosilação quando analisou a enzima  $\alpha$ -amilase secretada em *P. pastoris*, encontrando duas bandas no sobrenadante. Sato *et al.* (2009) também encontrou níveis de glicosilação ao analisar a enzima AChE de carpa utilizando o mesmo sistema de expressão, uma vez que a levedura *P. pastoris*, de um modo geral, glicosila proteínas recombinantes com sítios de N ou O-glicosilação, resultando em proteínas maiores do que as nativas.

Apesar de que no presente trabalho não foi avaliada a influência do pH para a expressão do tGH recombinante, Li *et al.* (2003) encontraram um pH ótimo de 6.0 para a expressão do GH recombinante de carpa pela *P. pastoris*.

A concentração de proteínas totais secretadas pelo clone 2 de *P. pastoris*, medida pelo método BCA foi de 44  $\mu\text{g/mL}$ . Estes resultados são próximos dos valores encontrados por Ascacio-Martinez & Barrera-Saldaña (2004), que utilizaram o método Bradford para medir proteínas totais do GH de *Canis familiaris* expresso em *P. pastoris*, no qual o valor encontrado variou de 15 a 40  $\mu\text{g/mL}$  de proteínas totais. No experimento realizado neste estudo, das proteínas totais expressas secretadas pela *P. pastoris* (clone 2), cerca de metade, ou seja, 20  $\mu\text{g/mL}$  em 20 mg/L, correspondem ao tGH.

Outros sistemas de expressão foram utilizados para expressar GH de peixes, mas a quantidade foi inferior quando comparado aos expressos na levedura *P. pastoris*. Acosta *et al.* (2007), descreveram uma alta produção de GH recombinante de tilápia expressa em *P. pastoris* (200-300 mg/L). Os referidos autores discutem que seu resultado de produção foi superior ao de Li *et al.* (2001) quando essa diferença pode ser explicada pelo fato de que o processo fermentativo para produção do tGH não foi otimizado e sabe-se que a sua otimização pode elevar a produção entre 5 a 10X, ou seja, o clone recombinante pode vir a expressar entre

105-210 mg/L de tGH, e, portanto nossos valores são compatíveis com os resultados encontrados na literatura.

Nos últimos anos, a indústria biotecnológica tem tido um grande interesse em moléculas úteis para a melhoria na produção alimentar e na saúde animal. A importância de promover o GH como um agente estimulador-imune e de crescimento, tem sido reconhecido e seu potencial de aplicação na indústria piscicultura tem se tornado uma área de pesquisa ativa (Acosta *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos demonstram que a produção, o processamento e a secreção do GH recombinante foi obtida com sucesso em *P. pastoris*. Tais resultados demonstram a eficiência do sistema de produção do GH recombinante de um peixe de água doce da bacia amazônica de grande valor comercial, como é o caso do tambaqui, utilizando o sistema de expressão da levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, linhagem GS115 e o vetor de expressão pPIC9, expressando e secretando tGH recombinante.

Dessa forma, a produção de tGH dessa importante espécie para aquicultura regional poderá ser utilizada posteriormente em ensaios biológicos, como fator de aceleração do crescimento de peixes para cultivo e, a seguir para a produção em maior escala com fins industriais.

## 6. CONCLUSÃO

No presente estudo foi construída uma biblioteca de cDNA de hipófise e partes do tecido do cérebro de juvenis de tambaqui *Collossoma macropomum*. Do total de clones de 1728 sequências obtidas foi possível identificar 1060 ESTs válidas, com o índice de novidade de 43%.

O sequenciamento dessas ESTs forneceu informações preliminares sobre o transcrito da hipófise e parte do cérebro do tambaqui em estado juvenil e, principalmente, informações sobre os genes mais expressos. Estas informações são importantes para estudos mais avançados sobre a genômica dessa espécie.

Foi possível identificar transcritos e comparar com os transcritos de outras espécies de peixes, e nas análises dessas sequências identificou-se a do hormônio de crescimento.

A levedura *P. pastoris* contendo a sequência codificadora do tGH foi capaz de expressar e secretar o hormônio de crescimento em níveis de 21 mg/L. A massa molecular do tGH foi de aproximadamente 22 kDa, idêntico aos GHs de outras espécies.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, J.; Carpio, Y.; Besada, V.; Morales, R.; Sánchez, A.; Curbelo, Y.; Ayala J.; Estrada, M.P. 2008. Recombinant truncated tilapia growth hormone enhances growth and innate immunity in tilapia fry (*Oreochromis sp.*). *General and Comparative Endocrinology*, 157: 49-57.
- Acosta, J.; Morales, R.; Morales, A.; Alonso, M.; Estrada, M.P. 2007. *Pichia pastoris* expressing recombinant tilapia growth hormone accelerates the growth of tilapia. *Biotechnol. Lett*, 29: 1671–1676.
- Adams, M.D.; Kelley, J.M.; Gocayne, J.D.; Dubnick, M.; Polymeropoulos, M.H.; Xiao, H.; Merril, C.R.; Wu, A.; Olde, B.; Moreno, R.F.; Kerlavage, A.R.; McCombie, W.R.; Venter, J.C. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252: 1651– 1656.
- Agellon, L.B.; Davies, S.L., Chen, T.T.; Powers, D.A. 1988. Structure of a fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5136-5140.
- Agelon, L. B. 1998. Promotion of rapid growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by a recombinant fish growth hormone; *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 146–151.
- Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Toledo-Filho, S.A; Bernardino, G.; Ferrari, W.; Alcantara, R.C.G. 1987. Cytogenetic studies on *Colossoma mitrei*, *Colossoma macropomum* and their interspecific hybrid. *Proc. World Symp. on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquacultur.*, 189-195.
- Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L. 1995. A adaptação de peixes aos ambientes de criação. In: A. L. VAL & A. HONCZARYK (eds). Criando peixes na Amazônia. Manaus-INPA. 160pp.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-10.
- Ãnes, L. M. M. 2008. *Identificação e diferenciação da expressão de genes em tambaqui (Colossoma macropomum CUVIER, 1818) alimentado com frutos e sementes da Amazônia*. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 105p.
- Aparicio, S.; Chapman, J.; Stupka, E.; Putnam, N.; Chia, J.M.; Dehal, P.; Christoffels, A.; Rash, S.; Hoon, S.; Smit, A.; Gelpke, M.D.; Roach, J.; Oh, T.; Ho, I.Y.; Wong, M.; Detter, C.; Verhoef, F.; Predki, P.; Tay, A.; Lucas, S.; Richardson, P.; Smith, S.F.; Clark, M.S.; Edwards, Y.J.; Doggett, N.; Zharkikh, A.; Tavtigian, S.V.; Pruss, D.; Barnstead, M.; Evans, C.; Baden, H.; Powell, J.; Glusman, G.; Rowen, L.;



- Hood, L.; Tan, Y.H.; Elgar, G.; Hawkins, T.; Venkatesh, B.; Rokhsar, D.; Brenner, S. 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*, 297(5585): 1301-1310.
- Araújo-Lima, C.; Goulding, M. 1998. Os frutos do tambaqui. Ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Sociedade Civil Mamirauá - MCT - CNPq. 186p.
- Ascacio-Martinez, J.A.; Barrera-Saldana, H.A.; 2004. Production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormone by *Pichia pastoris*. *Gene*, 340: 261–266.
- Balm, P.H.M. 1997. Immune-endocrine interactions. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 195–221.
- Barroso, A.L.F. 2004. *A pesca e a conservação das áreas alagáveis na calha dos rios Solimões-Amazonas*. CEULM-ULBRA. Monografia. 27pp.
- Batista, V.S.; Silva, A.J.L.; Freitas, C.E.C.; Freire-Brasil, D. 1998. Characterization of the fishery in riverine communities in the Low – Solimões/High Amazonas region. *Fisheries Management and Ecology*, 5: 419-435.
- Bayley, P.B. 1981. Fish yield from the Amazon in Brazil: Comparisons with African river yield and management possibilities. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 110: 351-359p.
- Bayley, P.B.; Petrere Júnior, M. 1989. Amazon Fisheries: assessment methods current status, and management options. In: DODGE, D. P. (Ed). Proceedings of the International Large River Symposium. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat.sci.*, 106: 385-398.
- Ber, R.; Daniel, V. 1993. Sequence analysis suggests a recent duplication of the growth hormone-encoding gene in *Tilapia nilotica*, *Gene*. 125: 143–150.
- Bernardi, G.; D'Onófrío, G.; Caccio, S.; Bernardi, G. 1993. Molecular Phylogeny of bony Fishes, Based on the Amino Acid Sequence of the Growth Hormone. *Journal Molecular Evolution*, 37: 644-649.
- Bernardino, G.; Ferrari, V. 1987. Reprodução artificial do tambaqui *Colossoma macropomum*. In: Síntese dos trabalhos realizados com espécies do gênero *Colossoma*. Pirassununga: Cepta, p.12-3.
- Björnsson, B.T. 1997. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiol. Biochem.*, 17: 9–24.
- Blum, H.; Bier, H.; Gross, H. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. 1987. *Electrophoresis*, 8: 93-99.

- Boischio, A.A.P. 1992. Produção Pesqueira em Porto Velho, Rondônia (1984-89) - Alguns Aspectos Ecológicos das Espécies Comercialmente Relevantes. *Acta Amazonica*, 22(1): 163-172.
- Butte, A. 2002. The use and analysis of microarray data. *Nature Drug Discovery Reviews* 1: 951-960.
- Caerles, A.; Berishvili, G.; Meli, M.L.; Eppler, E.; Reinecke, M. 2004. Establishment of real-time RT-PCR for the determination of absolute of IGF-I and IGF-II gene de expression inn liver and extrahepatic sites of tilapia. *General and Comparative Endocrinology*, 137: 196-204.
- Calcagnotto, D., Russello, M.; DeSalle, R. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology Notes*, 1 (4): 245-247.
- Calcagnotto, D.; Toledo-Filho, S.A. 2000. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Genetics and Molecular Biology*, 23 (1): 127-130.
- Calduch-Giner, J.A.; Mingarro, M., Vega-Rubin de Celis, S., Boujard, D., Perez-Sanchez, J. 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*, 136: 1–13.
- Cao, D.; Kocabas, A.; Ju, Z.; Karsi, A.; Patterson, A. 2001. Transcriptome of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): initial analysis of genes and expression profiles of the head Kidney. *Anim. Genet.*, 32: 169-188.
- Casanova, F. M. 2008. *Caracterização in silico de biossensores em Colossoma macropomum: Diagnóstico molecular e monitoramente de ambientes impactados*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia / Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 84p.
- Cavari, B.; Funkenstein, B.; Chen, T.T.; Gonzalez-Villasenor, L.I.; Schart, M. 1993. Effect of growth hormone on the growth rate of the gilthead seabrem (*Sparus aurata*), and use of different construct for the production of transgenic fish. *Aquaculture*, 111: 189-197.
- Cerdeira, R.G.P.; Ruffino, M.L.; Isaac, V.J. 1997. Consumo de pescado e outros alimentos pela população ribeirinha do Lago Grande de Monte Alegre, PA. *Acta Amazônica*, 27 (3): 213 -228 .

- Cereghino, G.P.L.; Cereghino, J.L.; Ilgen, C.; Cregg, H.M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris* – a review- *Current Opinion Biotechnology*, 13: 329-332.
- Cereghino, J. L.; Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 45-66.
- Chao, N. L. 2001. The fishery, diversity, and conservation of ornamental fishes in the rio Negro Basin, Brazil - A review of Project Piaba (1989-99). In: *Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Project Piaba* (N.L. Chao, G. Prang, L. Sonneschein; M. Tlusty eds.). Editora da Universidade do Amazonas, Manaus-AM, Brazil. 161-204p.
- Chiou, C.S.; Chen, H.T.; Chang, W.C. 1990. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim Biophys Acta*, 1087: 91-94.
- Conesa, A.; Götz, S.; García-Gómez, J.M.; Terol, J. Talón, M.; Robles. M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics Applications Note*, 21(18): 3674–3676.
- Creeg, J. M.; Madden, K. R.; Barringer, K. J.; Thill, G. P. e Stillman, C. A. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia*. *Molecular and Cellular Biology*, 9: 1316-1323.
- Cregg, J.M.; Barringer, K.J.; Hessler, A.Y. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol*, 5: 3376– 3385.
- Cregg, J.M.; Vedvick, T.S.; Raschke, W.C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*, 11: 905-910.
- D'Anjou, M.C.; Daugulis, A.J.; 2000. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 1– 11.
- D'Assunção, A. A. A.; Santos, M.C.F., Farias, I. P. e Porto, J.I.R. 2003. Estimativa preliminar da variabilidade genética do tambaqui (*Colossoma macropomum*) pelo sequenciamento do hormônio de crescimento (GH). 4º Encontro de Genética do Amazonas/ 1º Encontro de genética da Região Norte, Manaus-Am, p. 108.
- Davey, G. C.; Caplice, N. C.; Martin, S.A.; Powell, R. 2001. A survey of genes in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) as identified by expressed sequence tags. *Gene*, 263: 121-130.
- Davis, G.P.; Hetzel, J.S. 2000. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. *Aquaculture Researche*, 31: 3-10.

- De Jesus, E.G.T.; Ayson, F.G.; Amemya, Y.; Moriyama, S.; Hyodo, T.; Kawauchi, H. 2002. Milkfish (*Chanos Chanos*) growth hormone cDNA cloning and mRNA expression in embryos and early larval stages. *Aquaculture*, 208: 177-188.
- Deyholos, M.K., Galbraith, D.W., 2001. High-density microarrays for gene expression analysis. *Cytometry*, 43: 229–238.
- Dixon, B.; Shum, B.; Adams, E.J.; Magor, K.E.; Hedrick, R. P.; Muir, D. G.; Parham, P. 1998. CK-1 a, putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunol.*, 3: 299-312.
- Donaldson, E.M.; Hunter, G.A. 1983. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fish. *In: Fish physiology Vol IXB*, pp351-403. W.S. Hoar, D.J. Randal and E.M. Donaldson eds. Academic Press, New York.
- Eppler, E.; Caelers, A. Bererish, G.; Reinecke, M. 2005. The advantage of absolute Quantification in comparative hormone research as indicated by a newly established real-time RT-PCR GH, IGF-I, and IGF-II gene expression in the Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*1040: 301-304.
- Escamilla-Treviño, L.L.; Viader-Salvadó, J.M.; Barrera-Saldaña.; Guerrero-Olazarán, M. 2000. Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 109-114.
- Farias, I.P., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H.; Meyer, A. 1999. Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: monophyly and fast molecular evolution of the neotropical assemblage. *Journal of Molecular Evolution*, 48: 703–711.
- Farias, I. P., and T. Hrbek. 2008. Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 32–43.
- Gabillard, J.C.; Yao, K.; Vandeputte, M.; Gutierrez, J.; Le Bail, P.Y. 2006. Differential expression of two GH receptor mRNAs following temperature change in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Endocrinol*, 190: 29–37.
- Gong, Z. 1999. Zebrafish expressed sequence tags and their applications. *Methods Cell Biol.* 60: 213–233.
- Goulding, M.; Carvalho, M.L. 1982. Life and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Rev. Bras. De Zool.*, 1: 107-133.
- Govoroun, M.; Le Gac, F.; Guiguen, Y. 2006. Generation of a large scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalized rainbow trout cDNA libraries. *BMC Genomics*, 7:196.

- Hamilton, L.C.; MacPherson, P.; Wright, J.M. 2000. Expressed sequence tags derived from brain tissue of *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology*. 56: 219-222.
- Hrbek, T.; Farias.I.P.; Crossa, M.; Sampaio, I.; Porto, J.I.R.; Meyer, A. 2005. Population genetic structure of *Arapaima gigas*, world's biggest freshwater fish: implications for conservation. *Animal Conservation*, 8: 297-308.
- Hulata, G. 2001. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*. 111: 155-173.
- Hull, K.L.; Harvey, S. 2002. GH as a co-gonadotropin: the relevance of correlative changes in GH secretion and reproductive state. *J. Endocrinol.*, 172: 1–19.
- IBAMA. 2003. Portaria nº 65 de 30 de outubro de 2003. Ministério do Meio Ambiente, Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, Brasília.
- IBAMA. 2004. Estatística da Pesca 2003 – Brasil – Grandes Regiões e Unidades de Federação. Brasília, 98 p.
- Inoue, S.; Nam, B. H.; Hirono, I.; Aoki, T. A. 1997. Survey of expressed genes japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) liver and spleen, *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6: 376-380.
- Ishioka, H.; Kosugi, R.; Ouchi, K.; Hara, A.; Nagamatsu, T. Mihara, S.; Ogai, H. 1992. Effect of recombinant red sea bream growth hormone on growth of young red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(12): 2335-2340.
- INVITROGEM. 2006. Pichia Expression Kit: A Manual of methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. [S.l.].
- Jaillon, O.; Aury, J.M.; Brunet, F.; Petit, J.L.; Stange-Thomann, N.; Mauceli, E.; Bouneau, L.; Fischer, C.; Ozouf-Costaz, C.; Bernot, A.; Nicaud, S.; Jaffe, D.; Fisher, S.; Lutfalla, G.; Dossat, C.; Segurens, B.; Dasilva, C.; Salanoubat, M.; Levy, M.; Boudet, N.; Castellano, S.; Anthonard, V.; Jubin, C.; Castelli, V.; Katinka, M.; Vacherie, B.; Biémont, C.; Skalli, Z.; Cattolico, L.; Poulain, J.; De Berardinis, V.; Cruaud, C.; Duprat, S.; Brottier, P.; Coutanceau, J.P.; Gouzy, J.; Parra, G.; Lardier, G.; Chapple, C.; McKernan, K.J.; McEwan, P.; Bosak, S.; Kellis, M.; Volff, J.N.; Guigó, R.; Zody, M.C.; Mesirov, J.; Lindblad-Toh, K.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Kahn, D.; Robinson-Rechavi, M.; Laudet, V.; Schachter, V.; Quétier, F.; Saurin, W.; Scarpelli, C.; Wincker, P.; Lander, E.S.; Weissenbach, J.; Crollius, H.R. 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*, 431(7011): 946-957.

- Jiao, B.; Huang, X.; Chan, C.B.; Zhang, L.; Wang, D.; Cheng, C.H. 2006. The coexistence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in sea bream. *J. Mol. Endocrinol*, 36: 23–40.
- Johnsson, J.I.; Björnsson, B.Th. 1994. Growth hormone increases growth rate, appetite and dominance in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Anim. Behav.*, 48: 177–186.
- Jönsson, E.; Björnsson, B.Th. 2002. Physiological functions of growth hormone in fish with special reference to its influence on behaviour. *Fish. Sci.*, 68: 742–774.
- Ju, Z.; Karsi, A.; Kocabas, A.; Patterson, A.; Li, P.; Cao, D.; Dunham, R.; Liu, Z. 2000. Transcriptome Analyses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): genes and expression profiles from the brain. *Gene*, 261: 373-382.
- Kah, O; Anglade, I; Lepretre, E; Dubourg, P; de Monbrison, D. 1993. The reproductive brain in fish. *Fish Physiol. Biochem.* , 11:85–98.
- Kajimura, S.; Kawaguchi, N.; Kaneko, T.; Kawazoe, I., Hirano, T. 2004. Identification of the growth hormone receptor in an advanced teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) with special reference to its distinct expression pattern in the ovary. *J. Endocrinol*, 181: 65–76.
- Karsi, A.; Cao, D.; Li, P.; Patterson, A.; Kocabas, A.; Feng, J. 2002. Transcriptome of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): initial analysis of gene expression and microsatellites-containing cDNA in the skin. *Gene*. 285: 157-168.
- Kasahara, M.; Naruse, K.; Sasaki, S.; Nakatani, Y.; Qu, W.; Ahsan, B.; Yamada, T.; Nagayasu, Y.; Dóí, K.; Kasai, Y.; Jindo, T.; Kobayashi, D.; Shimada, A.; Toyoda, A.; Kuroki, Y.; Fujiyama, A.; Sasaki, T.; Shimizu, A.; Asakawa, S.; Shimizu, N.; Hashimoto, S.; Yang, J.; Lee, Y.; Matsushima, K.; Sugano, S.; Sakaizumi, M.; Narita, T.; Ohishi, K.; Haga, S.; Ohta, F.; Nomoto, H.; Nogata, K.; Morishita, T.; Endo, T.; Shin-I, T.; Takeda, H.; Morishita, S.; Kohara, Y.2007. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, 447(7145): 714-749.
- Kawano, H.; Kono, T.; Watanuki, H.; Savan, R.; Sakai, M. 2003. Analysis of genes expressed in head kidney of common carp *Cyprinus carpio* L. Treated with cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology* , Part B 136: 857-886.
- Kocabas, A. M; Kucuktas, H.; Dunham, R. A.; Liu, Z. 2002. Molecular characterization and differential expression of the myostatin gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochim. Biophys. Acta.*, 1575: 99-107.

- Kono, T.; Sakai, M.; 2001. The analysis of expressed genes in the kidney of Japanese flounder, (*Paralichthys olivaceus*) inject with the immunostimulant peptidoglycan. *Fish Shellfish Immunol.*, 11: 357-366.
- Kossowski, G.; Bracamonte, N.O.; Velasco, J.Q. 1983. Karyotype of the hybrid of *Colossoma macropomum* (female) (Cuvier, 1818) x *Mylossoma duriventris* (male) (Cuvier, 1818) and their progenies (Pisces, Cypriniformes, Characidae). *Acta Cient. Venez.*, 34 (2): 173-175.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Le Bail, P.Y.; Sire, M.F.; Vernier, J.M. 1989. Intestinal transfer of growth hormone into the circulation system of rainbow trout, salmon gaidneri: interference by granule cells. *J. Exp. Zool.*, 251: 101-110.
- Lee F.W.K; Da Silva, N.A. 1997. Sequential  $\delta$ -integration for the regulated insertion of cloned genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog.*, 13: 368-373.
- Lee, L.T.; Nong, G.; Chan, Y.H.; Tse, D.L.; Cheng, C.H., 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene*, 270: 121–129.
- Leitão, M. A. B. 1998. *Estudo comparativo da estrutura genética de populações naturais e artificiais de tambaqui Colossoma macropomum (Cuvier,1818): sistemas isozímicos*. INPA-UFAM. Dissertação de Mestrado. 75pp.
- Li, Y.H.; Bai J.J.; Jian, Q.; Ye, X.; Lao, H.; Li, X.H.; Luo, J.R.; Liang, X.F. 2003. Expression of common carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris* and growth stimulation of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216: 329–341.
- Liu, Z.J.; Cordes, J.F. 2004. DNA marker Technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.
- Liu, Z.J.; Karsi, A.; Dunham, R.A. 1999. Development of polymorphic EST markes suitable for genetic linkage mapping of catfish. *Marine Biotechnology*, 1: 437-447.
- López-vásquez, K.; Oliveira, S. S.; Cunha, L. K. H.; Nozawa, S. R.; Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F. 2004. Differential gene expression on tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 exposed to crude oil. In: VI International Congress on Biology of Fishes, Manaus. Behaviour, physiology and toxicology interactions in fish. Vancouver: American Fisheries Society - *Physiology Section*, 2004. v. 1. p. 13-17.

- Lowe-McConnle, R. H. 1987. Ecological studies in Tropical Fish Communities. Cambridge University Press. 382 p.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L., Randall, J.R. 1951. Protein measurements with the Folin reagent. *J. Biol. Chem*, 193: 265–275.
- Magistretti, P.J., 1999. Brain energy metabolism. In: Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L., Squire, L.R. (Eds.). *Fundamental Neuroscience*, Academic Press, San Diego, pp. 389–413.
- Martin, S. A.; Caplice, N. C.; Davey, G.C.; Powell, R. 2002. EST- based identification of genes expressed in the liver of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293: 578-585.
- Martins, C.; Porto-Foresti, F.; Wasko. A. P.; Leitão. G. R.; Oliveira. C.; Foresti, F. 2002. Marcadores Genéticos na piscicultura. *Biotecnologia & Desenvolvimento.* 28: 12-15pp.
- McLean, E.; Donaldson E. M.; Teskeredzic E and Souga L M.1993. Growth enhancement following dietary delivery recombinant protein somatotropin to diploid and triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Fish Physiol. Biochem.* 11: 363–369.
- Melamed, P.; Gong, Z.; Fletcher, Hew, C.L. 2002. The potencial impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture*, 204: 255-369.
- Merona, B.; Bittencourt, M.M. 1988. A pesca na Amazônia através dos desembarques no mercado de Manaus: resultados preliminares. *Memória Sociedad Ciências Natutales La Salle*, 48: 433-453.
- Mommsen, T.P. 2001. Paradigms of growth in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 129: 207–219.
- Moriyama, S.; Kawauchi, H., 1990. Growth stimulation of juvenile salmonids by immersion in recombinant salmon growth hormone. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 31–34.
- Moriyama, S.; Yamamoto,H.; Sugimoto,S; Abe,T.; Tetsuya, H.; Kawauchi, H. 1993. Oral administration of salmon recombinant growth hormone to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 112: 99-106.
- Moriyama, S.; Yamamoto,H.; Sugimoto,S; Abe,T.; Tetsuya, H.; Kawauchi, H. 1993. Oral administration of salmon recombinant growth hormone to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 112: 99-106.



- Muller, G. 2007. *Clonagem e expressão do gene da alpha-amilase de Bacillus subtilis variedade D2 na levedura Pichia pastoris*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 108pp.
- Nam, B. H.; Yanamoto, E.; Hirono, I.; Aoki, T. 2000. A survey of expressed genes in the leukocytes of japanese flounder, (*Paralichthys olivaceus*) infected with Hirane rhabdovirus. *Dev. Comp. Immunol.* 24: 13-24.
- Nakano, A.; Lee, C. Y.; Yoshida, A.; Matsumoto, T.; Shiomi, N.; Katoh, S. 2006. Effects of methanol feeding methods on chimeric alpha-amylase expression in continuous culture of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (101). 3: 227-231.
- Ng, S.H.S.; Artieri, C.G.; Bosdet, I.E.; Chiu, R.; Danzmann, R.G.; Davidson, W.S.; Ferguson, M.M.; Fjell, C.D.; Hoyheim, B.; Jones, S.J.M.; De Jong, P.J.; Koop, B.F.; Krzywinski, M.I.; Lubieniecki, K.; Marra, M.A.; Mitchell, L.A.; Mathewson, C.; Osoegawa, K.; Parisotto, S.E.; Phillips, R.B.; Rise, M.L.; Von Schalburg, K.R.; Schein, J.E.; Shin, H.; Siddiqui, A.; Thorsen, J.; Wye, N.; Yang, G.; Zhu, B. 2005. A physical map of the genome of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Genomics*, 86: 396-404.
- Nishida, Y.; Yoshioda, M.; St-Armand, J. 2005. The top most abundant transcripts are sufficient to characterize the organs functional specificity: evidences from the cortex, hypothalamus and pituitary gland. *Gene*, 344: 133-141.
- Okubo, K.; Matsubara, K. 1997. Complementary cDNA sequence EST collections and the expression information of the human genome. *FEBS Lett.*, 403: 225-229.
- Oliveira, C. C. M. 2005. Produção de  $\beta$ -galactosidase por Levedura Recombinante Desenvolvimento de um Sistema de Produção Estável. Universidade do Minho. Dissertação de Mestrado. 110pp.
- Orti, G., Petry, P., Porto, J.I.R., Jégu, M.; Meyer. A. 1996. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *J. Mol. Evol.*, 42: 169-182.
- Ouyang, J.; Yang, L.; Long, Q.X.; Wang, X.Z.; Xing, K.; Wei, P.H. 2001. High level secretion expression of porcine somatotropin gene in *Pichia pastoris* and N glycosylation analysis of products. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 17: 520–525.
- Ozaki, Y.; Fukada, H.; Kazeto, Y.; Adachi, S.; Hara, A.; Yamauchi, K. 2006. Molecular cloning and characterization of growth hormone receptor and its homologue in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 143: 422–431.

- Palma-Nicolas, J.P.; Ascacio-Martinez, J.A.; Revol, A.; Barrera-Saldana, H.A. 2005. Production of recombinant human placental variant growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett*, 21: 1695–1700.
- Parrington, J.; Coward, K. 2002. Use of emerging genomic and proteomic technologies in fish physiology. *Aquat. Living Resour.*, 15: 193-196.
- Patterson, A.; Karsi, A.; Feng, J.; Liu, Z. 2003. Translational machinery of channel catfish: II. Complementary DNA and expression of the complete set of 47 60S ribosomal proteins. *Gene*, 305:151-160.
- Pedraça, E.B. 2000. *Clonagem e expressão do cDNA do hormônio de crescimento da carpa (Hypophthalmichthys mulitrix) em Escherichia coli*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 73p.
- Petrere Jr., M. 1983. Relationships among catches, fishing effort and river morphology for eight rivers in Amazonas State (Brazil), during 1976-1978. *Amazoniana*, 8: 281-296.
- Pierce, A.L.; Dickey, J.T.; Larsen, D.A.; Fukada, Swanson, H. P.; Dickhoffa, W.W. 2004. Communication in Genomics and Proteomics A quantitative real-time RT-PCR assay for salmon IGF-I mRNA, and its application in the study of GH regulation of IGF-I gene expression in primary culture of salmon hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 135: 401–411.
- Pineda-Santis, H.; Pareja-Molina, D.; Builes-Gómez, J.; Olivera-Ángel, M. 2004. Contribución a la relación taxonómica entre cuatro especies de peces de la familia Characidae mediante el Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD). *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 17: Suplemento 2004: 31-37.
- Pinheiro, J.S.; Wolf, J.L.C.; Araújo, R. C.; Hilsdorf, A.W.S. 2008. Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA of neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Genetics and Molecular Biology*, 31: 381-384.
- Pinheiro, L. R. B. 2007. *Expressão gênica diferencial em tambaquis, Colossoma macropomum (Cuvier, 1818), expostos ao petróleo e a hipóxia*. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) / Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas. 66p.
- Porto, J.I.R.; Alves-Gomes, J.A.; Farias, I.P. Feldberg, E. 2001. Using molecular biology techniques to characterize the diversity of amazonian ornamental fishes. In: Ning Labbish Chao; Paulo Petry; Gregory Prang; Leonard Sonneschien; Michael Tlusty. (Org.). Conservation and management of ornamental fish

- resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil. (Project Piaba). Manaus, p. 227-244.
- Porto, J.I.R.; D'Assunção, A.A.A. 2005. Baixo nível de variabilidade genética detectado no íntron 3 do hormônio de crescimento de *Colossoma macropomum* e espécies relacionadas. Comunicaciones Del primer colóquio de la Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amánica.p. Iquitos. 143-147.
- Prosdocimi, F.; Cerqueira, G.C.; Binneck, E.; Silva, A.F.; Reis, N.A.; Junqueira, A.C.M.; Santos, A.C.F.; Nabani Junior, A.; Wust, C.I.; Filho, F.C.; Kessedjian, J.L.; Petretski, J.H.; Camargo, L.P.; Ferreira, R.G.M.; Lima, R.P.; Pereira, R.M.; Jardim, S.; Sampaio, V.S.; Folgueiras-Flatschart, A. 2003. Bioinformática: Manual do Usuário. *Biotec. Ciênc. e Desenvolv.*, 29: 18-31.
- Rees, C. B.; Li, W. 2004 .Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining CYP1A transcripts in three genera of salmonids. *Aquatic Toxicology* 66: 357–368.
- Rise, M.L.; Von-Schalburg, K.R.; Brown, G.D.; Mawer, M.A.; Devlin, R.H.; Kuipers, N.; Busby, M.; Beetz-Sargent, M.; Alberto, R.; Gibbs, A.R; Hunt, P.; Shukin, R.; Zeznik, J.A.; Nelson, C.; Jones, S.R.M.; Smailus, D.E.; Jones, S.J.M.; Schein, J.E.; Marra, M.A.; Butterfield, Y.S.N.; Stott, J.M.; Ng, S.H.S.; Davidson, W.S.; Koop, B.F. 2004 Development and application of a salmoni EST database and cDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics. *Genome Res*, 14: 478-490.
- Rousseau, K.: Dufour, S. 2007. Comparative aspects of GH and metabolic regulation in lower vertebrates. *Neuroendocrinology*, 86: 165–174.
- Ruffino, M. L. 2001. Strategies for managing biodiversity in amazonian fisheries. Flood Plain Natural Resources Management Project–Pro Várzea. In: Blue Millennium: Managing Global Fisheries for Biodiversity 2001, Victoria Homepage:<http://www.worldfish.org/Chapter20220Ruffino20Case20Study.pdf>.
- Ruffino, M. L. 2002. Estatística pesqueira do Amazonas e Pará – 2001. Manaus: Ibama; ProVárzea, 2002. 73 p.
- Saera-Vila, A.; Calduch-Giner, J.A.; Perez-Sanchez, J. 2005. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gen. Comp. Endocrinol*, 142: 193–203.
- Saint-Paul, U. 1990. *Aquaculture in Latin America*. Bibliography. European Aquaculture Society. Special Publication, 13, 434p.

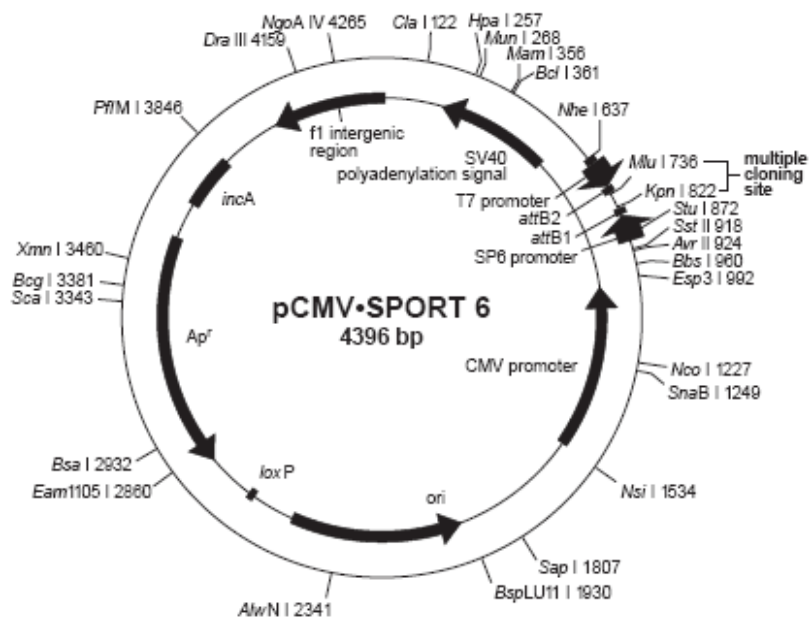
- Sakamoto, T.; McCormick, S.D. 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 147: 24–30.
- Sangiao-Alvarellos, S.; Miguez, J.M.; Soengas, J.L. 2005. Actions of growth hormone on carbohydrate metabolism and osmoregulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 141: 214–225.
- Santos, M.T. 2004. Iniciativas de desenvolvimento sustentável das comunidades do rio Amazonas/Solimões. Manaus: Provárzea/Ibama.
- Santos, M. C. F., Ruffino, M. L., Farias, I. P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology* 71A: 33–44.
- Santos, M.C.F., T. Hrbek, and I.P. Farias. 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. *Molecular Ecology Resources*, 9: (3) 874-876.
- Sato, R.; Matsumoto, T.; Hidaka, N.; Imai, Y.; Abe, K.; Takahashi, S.; Yamada, R.; Kera, Y. 2009. Cloning and expression of carp acetylcholinesterase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expression and Purification*, 64: 205-212.
- Savan, R.; Sakai, M. 2002. Analysis of expressed sequence tags (EST) obtained from common carp, *Cyprinus carpio* L.; head kidney cells after stimulation by two mitogens lipopolysaccharide and concanavalin – A. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 131: 71-82.
- Sheridan, M.A. 1986. Effects of thyroxin, cortisol, growth hormone and prolactin on lipid metabolism of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification. *Gen. Comp. Endocrinol*, 64: 220–238.
- Shie, Y.L.; Wang L.H.; Chao, T.Y.; Lin, C.H.; Tsai, C.L. 2004. EST-based identification of genes expressed in the hypothalamus of adult tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316: 523-527.
- Suarez, R.K., 1988. Thinking with and without oxygen: energy metabolism in vertebrate brains. *Can. J. Zoo*, 66: 1041–1045.
- Tan, S.L.; Mohd-Adnan, A.; Mohd-Yusof, N.Y.; Forstner, M.R.J.; Wan. K.L. 2008. Identification and analysis of a prepro-chicken gonadotropin releasing hormone II (preprocGnRH-II) precursor in the Asian seabass, *Lates calcarifer*, based on an EST-based assessment of its brain transcriptome. *Gene*, 411: 77–86

- Teixeira, A.S.; Jamieson, A. 1985. Genetic variation in plasma transferrins of tambaqui, *Colossoma macropomun* (CUVIER 1818). *Amazoniana*, 9: 159-168.
- Telles, G. P.; Braga, M.D.V.; Dias, Z.; Lin, T. L.; Qutizau, J.A.A.; Da Silva, F.R.; Meidanis, J. 2001. Bioinformatics of the surgarcane EST project. *Genetics and Molecular Biology*, 24: (1-4), 9-15.
- Torres, F.A.G.; Moraes, L.M.P. 2000. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Brasil, 12: 20-22.
- Tsai, H.J.; Chen, H.M.; Lo. C.F. 1994. Secretory synthesis of active recombinant fish growth hormone by insect cells using a baculovirus vector. *Canadian Journal of fisheries and Aquatics Sciences*, 51(1): 1-7.
- Tsai, H.J.; Chen, H.M.; Lo. C.F. 1994. Secretory synthesis of active recombinant fish growth hormone by insect cells using a baculovirus vector. *Canadian Journal of fisheries and Aquatics Sciences*, 51(1): 1-7.
- Tse, D.L.; Tse, M.C.; Chan, C.B.; Deng, L.; Zhang, W.M.; Lin, H.R.; Cheng, C.H., 2003. Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochim. Biophys. Acta*, 1625: 64–76.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 1995. Fishes of the Amazon and their environment: *Physiological and biochemical aspects*. Springer. 224pp.
- Val, A.L.; Honczaryk, A. 1995. *Criando peixes na Amazônia*. Manaus-INPA. 160pp.
- Varsamos, S.; Nebel, C.; Charmantier, G. 2005. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 141: 401–429.
- Venugopal, T.; Mathavan, S.; Pandian, T.J. 2002. Molecular cloning of growth hormone encoding cDNA of Indian major carps by a modified rapid amplification of cDNA ends strategy; *J. Biosci.* 27: 261–272.
- Very, N.M.; Kittilson, J.D.; Norbeck, L.A.; Sheridan, M.A. 2005. Isolation, characterization, and distribution of two cDNAs encoding for growth hormone receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. B Biochem. Mol. Biol.* 140: 615–628.
- Vettore, A.I.; da Silva, F.R.; Kemper, E.L.; Arruda, P. 2001. The Library that made Sucest. *Gen. Mol. Biol.*, 24(1-4): 1-7.
- Villacorta-Correa, M. A.; Saint-Paul, U. 1999. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (cuvier, 1818) (characiformes: characidae) in central amazon, Brazil, *Rev. Brasil. Biol.*, 59(4): 637-652.

- Von Schalburg, K.R.; Leong, J.; Cooper, G.A.; Robb, A.; Beetz-Sargent, M.R.; Lieph R.; Holt, R.A.; Moore, R.; Ewart, K.V.; Driedzic, W.R.; Ten Hallers, B.F.H.; Zhu, B.; DeJong, P.J.; Davidson, W.S.; Koop, B.F. 2008. Rainbow smelt (*Osmerus mordax*) genomic library and EST resources. *Marine Biotechnology*, 10: 487-491.
- Wagner, G.M.; Fargher, R.C.; Brown, J.C. McKeown, B. A. 1985. Further characterization of growth hormone from the chum salmon (*Oncorhynchus keta*); *Gen. Comp. Endocrinol.* 1: 27–34
- Wallis, M. 1992. The expanding growth hormone/prolactin family. *J. Mol. Endo.*, 9: 185-188.
- Wang, W.; Sun, Y.H.; Wang, Y.P.; Zhu, Z.Y. 2003. Expression of grass carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris*. *Yi Chuan Xue Bao*, 30: 301– 306.
- Weyts, F.A.A.; Cohen, N.; Flik, G.; Verburg-van Kemenade, B.M.L. 1999. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 1–20.
- Yada, T.; 2007. Growth hormone and fish immune system. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152: 353–358.
- Yang, T.H.; Somero, G.N. 1993. Effects of feeding and food deprivation on oxygen consumption, muscle protein concentration and activities of energy metabolism enzymes in muscle and brain of shallow-living (*Scorpaena guttata*) and deep-living (*Sebastolobus alascanus*) scorpaenid fishes. *J.Exp. Biol*, 181: 213–232.
- Zeng, S.; Gong, Z. 2002. Expressed sequence tags analysis of the expression profiles zebrafish testis and ovary. *Gene*, 294: 45-53.
- Zhang, A.L.; Luo, J.X.; Zhang, T.Y.; Pan, Y.W.; Tan, Y.H.; Fu, C.Y.; Tu, F.Z. 2009. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Rep*, 36(6): 1611-9.
- Zhou, L., Yao, B., Xia, W., Li, C., Wang, Y., Shi, Y., Gui, J. 2006. EST-based grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 256: 129–139.

## ANEXOS

Anexo A. Mapa do plasmídeo pCMV-SPORT6, utilizado na clonagem do cDNA



## Anexo B. Preparação de plasmídeos em microplacas (96-well)

### **Crescimento**

1. Encher cada poço de uma microplaca de 96 poços com 1 mL de meio Circle Grow contendo 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Ampicilina (50  $\mu\text{L}$  de ampicilina 100 mg/mL para 50 mL de meio CG).

2. Inocular colônias individuais com o auxílio de palitos de dente ou com replicador. Selar a placa com adesivo. Fazer dois furos pequenos em cima de cada poço, com uma agulha, para facilitar a aeração. (aquecer a ponta da agulha no fogo ajuda a furar e elimina riscos de contaminação)

3. Incubar a 37°C, 320 rpm, por 22 horas (esse período de crescimento é crítico para o rendimento adequado de DNA)

4. Se necessário, fazer cultura permanente em placas estéreis (100  $\mu\text{L}$  de bactéria + 100  $\mu\text{L}$  de glicerol 50% estéril). Estoque (guardar no freezer -80°C)

5. Marcar a placa com fita crepe contendo: nome, n.º da placa e biblioteca. Selar a placa com adesivo. Centrifugar a microplaca por 6 min., 4000 rpm, para sedimentar as células. (caso a centrifuga disponível não chegue a essa velocidade aumentar o tempo de centrifugação, mas cuidado para não empacotar demais as células ou lisa-las durante a centrifugação)

6. Remover o adesivo, descartar o sobrenadante, inverter a placa sobre papel absorvente por 5 min e selar a placa. Depois disto pode ser mantida a -20°C.

### **Mini-Prep**

1. Ligar a estufa à 90°C. Separar e identificar o material a ser utilizado (1 placa fundo redondo, 1 placa fundo V e 1 placa filtro).

2. Adicionar a cada poço 240  $\mu\text{L}$  de GET, selar a placa com adesivo e agitar (Vortex) por 2 min, para ressuspender bem as células.

3. Centrifugar no mínimo 8 min 30 Seg., 4000 rpm, até sedimentar as células.

4. Retirar o adesivo e descartar o sobrenadante. Deixar a placa invertida em papel absorvente por 5 min.

5. Adicionar a cada poço 80  $\mu\text{L}$  de GET, selar placa com adesivo e agitar (Vortex) por 2 min, para ressuspender as células.

75

6. Adicionar 2,5  $\mu\text{L}$  de RNase (10mg/mL) a cada poço de uma microplaca (já identificada) de 250  $\mu\text{L}$  de polipropileno de fundo redondo (tipo Elisa).

7. Transferir 60ul da suspensão de células para a microplaca de 250  $\mu\text{L}$  de polipropileno de fundo redondo (tipo Elisa), já contendo a RNase.

8. Adicionar a cada poço 80  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,2N / SDS 1% (Preparar 20 mL para 2 placas iguais na hora de usar, essa solução não pode ser estocada).



1 mL NaOH 4M + 2 mL SDS 10% + água MilliQ q.s.p. 20 mL (solução para 2 placas).  
OBS.: Não pode ser adicionada uma solução de NaOH após SDS 10% , use água como intermediário.

9. Selar bem a placa com adesivo (novo) e misturar 30 vezes por inversão.

OBS: Aproveitar a tampa da placa com filtro para pressionar a placa com a suspensão antes da inversão.

10. Incubar por 10 min em TA. Centrifugar por alguns segundos até que não fique solução no adesivo

11. Adicionar a cada poço 80  $\mu$ L de KOAc 3M (acetato de potássio – estocado a 4°C). Selar a placa com adesivo e misturar 30 vezes por inversão

12. Incubar por 10 min em TA. Pulsar até chegar a 4000 rpm.

13. Remover o adesivo e incubar a placa aberta em estufa a 90°C por 30 min.

14. Selar a placa e esfriar em gelo picado por 10 min. Centrifugar por 8 min.30 seg., 4000 rpm, 20°C

15. Fixar com fita adesiva, uma placa Millipore (MAGV N22) no topo de uma microplaca de fundo em “V” de 250  $\mu$ L de polipropileno. Verificar se os poços estão alinhados.

16. Transferir todo o volume do sobrenadante (evitando transferir os debris celulares) para a placa Millipore e centrifugar (sem a tampa) por 5 min. 30 seg., 4000 rpm, 20°C ou até todo o volume descer para a outra placa (fundo em “V”).

OBS: Caso centrifugado por muito mais de 5  $\square$  30  $\square$  a 4000rpm a placa Millipore corre o risco de rachar.

17. Remover e descartar a placa Millipore. Adicionar 100  $\mu$ L de Isopropanol (Merck) ao filtrado (que está na microplaca)

18. Selar bem a placa com adesivo (resistente a álcool) e misturar 30 vezes por inversão.

19. Centrifugar por 45 min, 4000 rpm, 20°C.

20. Retirar o adesivo e descartar o sobrenadante (invertendo a placa)

21. Adicione 200  $\mu$ L de Etanol 70% (Merck) gelado.

22. Centrifugar por 5 min, 4000 rpm a 20°C. Remova o sobrenadante.

23. Inverter a placa sobre papel absorvente e pulsar, 900 rpm, 20°C.

24. Deixar a placa secar em TA por 60 min, coberta com papel toalha.

25. Ressuspender o DNA com 60  $\mu$ L de água MilliQ, cobrir com adesivo, anotar dados sobre a placa no adesivo e deixar a temperatura ambiente „over night“.

26. Guardar placa no freezer – 20oC.

**GET (Glicose, EDTA, Tris)**

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| 20% glicose filtrada           | 23ml  |
| 0,5M EDTA ph 8,0 autoclavado   | 10ml  |
| 1M Tris-Hcl ph 7,4 autoclavado | 13ml  |
| Água (q.s.p.)                  | 500ml |

**Guardar em geladeira**

**KOAc 3M**

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| 60ml KOAc 5M            | 11,5ml |
| acido acetico glacial   | 28,5ml |
| agua milliq autoclavada |        |

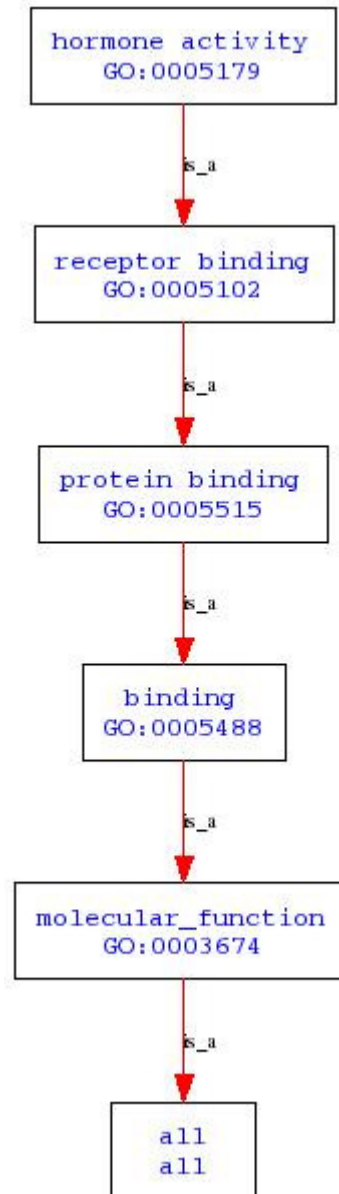
**Guardar em geladeira.**

**Estoque**

5M KOAc 246,87g  
KOAc em (q.s.p.) 500ml de agua. Filtrar

Usar 1ul da mini prep para a reação de sequência em um volume de 10ul com 4ul de pré-mix e 3.2 pmoles de primer.

Anexo C. Mapa do Mecanismo de Ação do gene do hormônio de crescimento, Gene Ontology. Fonte: Blast2GO.



Anexo D. Meios de cultivo de leveduras *P. Pastoris*

**Meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose Medium*): manutenção da linhagem**

***P. pastoris* GS115**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Extrato de levedura | 10 g/L |
| Peptona             | 20 g/L |
| Glicose             | 2 %    |
| Ágar                | 20 g/L |

Este meio foi esterilizado por autoclavagem e adicionadas a solução de glicose previamente filtrada e ampicilina na concentração de 100 µg/mL.

**MD (*Minimal Dextrose Medium*) - meio mínimo com glicoses em histidina para seleção de células transformantes de *P. pastoris***

|         |                      |
|---------|----------------------|
| YNB     | 1,34 %               |
| Biotina | $4 \times 10^{-5}$ % |
| Glicose | 2 %                  |
| Ágar    | 20 g/L               |

O volume da mistura foi completado com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente e adicionados 100 µg/mL de ampicilina.

**BMGY-U (*Buffered Glycerol Complex Medium*) - meio complexo tamponado, com glicerol e uréia para o aumento de massa celular de *P. pastoris***

|                       |                      |
|-----------------------|----------------------|
| Extrato de levedura   | 10 g/L               |
| Peptona               | 20 g/L               |
| Tampão fosfato pH 6,0 | 10 mM                |
| YNB                   | 1,34 %               |
| Biotina               | $4 \times 10^{-5}$ % |
| Glicerol              | 1 %                  |

O volume da mistura foi completado com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente com adição de 100 µg/mL de ampicilina.

**BMMY-U (*Buffered Methanol Complex Medium*) - meio complexo tamponado, com metanol para indução da expressão da proteína heteróloga**

|                       |                      |
|-----------------------|----------------------|
| Extrato de levedura   | 10 g/L               |
| Peptona               | 20 g/L               |
| Tampão fosfato pH 6,0 | 10 mM                |
| YNB                   | 1,34 %               |
| Biotina               | $4 \times 10^{-5}$ % |
| Metanol               | 0,5 %                |

A mistura foi completada com água ou ágar estéril, para meio líquido ou sólido, respectivamente com adição de 100 µg/mL de ampicilina.

E. Mapa metabólico do gene receptor do hormônio de crescimento. Fonte: [www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg)

