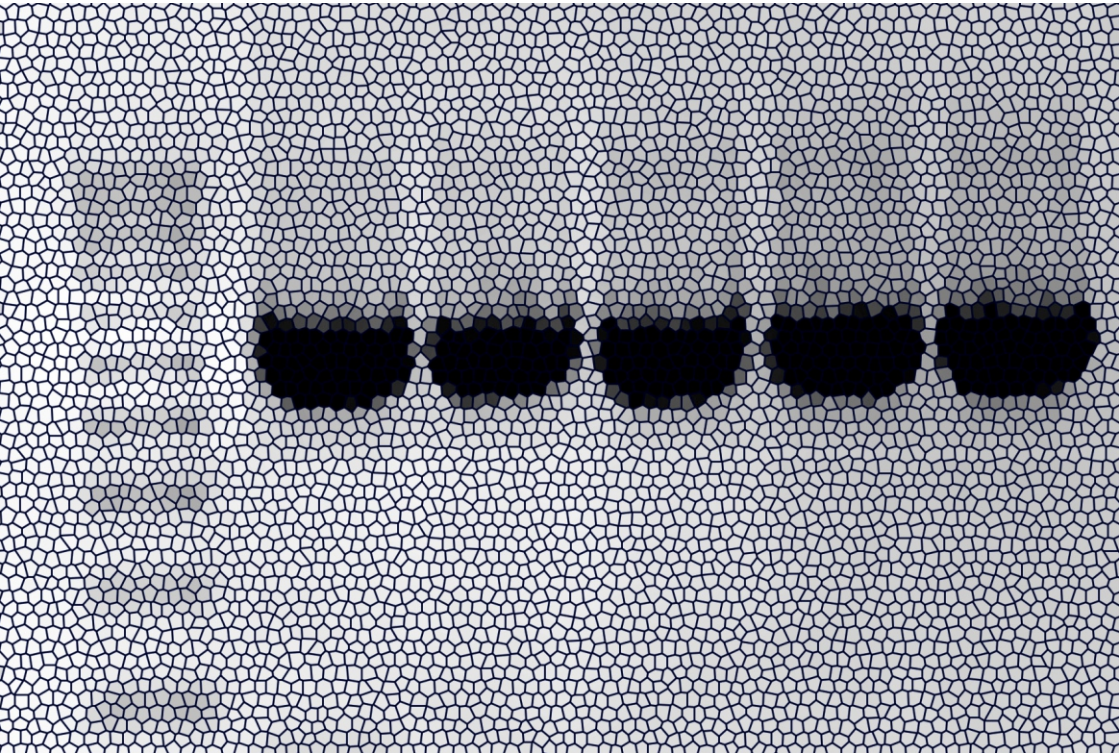
Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 12
ISSN 2358-6273
Outubro, 2016

Caracterização molecular do hormônio do crescimento do tambaqui (*Colossoma macropomum*)



Embrapa

ISSN 2358-6273
Outubro, 2016

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pesca e Aquicultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 12

Caracterização molecular do hormônio do crescimento do tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Carlos José Hoff de Souza
Magda Vieira Benavides
Eduardo Oliveira Melo

Embrapa Pesca e Aquicultura
Palmas, TO
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pesca e Aquicultura
Prolongamento da Avenida NS 10, cruzamento com a Avenida LO 18, sentido Norte, loteamento Água Fria, Palmas, TO
Caixa Postal nº 90 , CEP 77008-900
Fone: (63) 3229-7800/ 3229-7850
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Unidade responsável pelo conteúdo
Embrapa Pesca e Aquicultura

Comitê de Publicações
Presidente: *Eric Arthur Bastos Routledge*

Secretária-Executiva: *Marta Eichemberger Ummus*

Membros: *Alisson Moura Santos, Andrea Elena Pizarro Munoz, Hellen Christina G. de Almeida, Jefferson Christofoletti, Luciana Cristine Vasques Villela, Luciana Nakaghi Ganeco, Rodrigo Veras da Costa.*

Unidade responsável pela edição
Embrapa Pesca e Aquicultura

Coordenação editorial
Embrapa Pesca e Aquicultura

Supervisão editorial
Embrapa Pesca e Aquicultura

Normalização bibliográfica
Embrapa Pesca e Aquicultura

Editoração eletrônica e tratamento das ilustrações
Jeffferson Christofoletti
Daniel Arrais de Carvalho

Foto da capa
Jeffferson Christofoletti

1ª edição
Versão eletrônica (2016)

Todos os direitos reservados
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Informação Tecnológica

Caracterização molecular do hormônio do crescimento do tambaqui (*Colossoma macropomum*) / autores, Carlos José Hoff de Souza, Magda Vieira Benavides e Eduardo Oliveira Melo. Palmas, TO: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2016.

15p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Pesca e Aquicultura, ISSN 2358-6273; 12).

1. Caracterização molecular hormônios 2. Hormônio do Crescimento (GH) 3. GH tambaqui. I. Souza, Carlos José Hoff de. II. Benavides, Magda Vieira. III. Melo, Eduardo Oliveira. IV. Embrapa Pesca e Aquicultura. V. Série.

CDD 664.942

© Embrapa 2016

Sumário

Resumo 05
Abstract 07
Introdução 09
Material e Métodos 09
Resultados e Discussão 11
Conclusões 14
Referências 14

Caracterização molecular do hormônio do crescimento do tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Carlos José Hoff de Souza[1]
Magda Vieira Benavides[2]
Eduardo Oliveira Melo[3]

Resumo

O hormônio do crescimento (GH) dos peixes teleósteos é uma molécula polipeptídica de cadeia simples secretado principalmente pelos somatotrófos da glândula hipófise anterior sendo importante regulador do crescimento somático e sendo também envolvido numa gama de outros processos biológicos, tais como o metabolismo, regulação osmótica, reprodução, comportamento e imunidade.

Para determinar a sequencia codificante do GH de tambaqui, o RNA total foi obtido de hipófises de peixes adultos, que foi utilizado para síntese de cDNA e posteriormente para amplificação por PCR baseado em oligonucletídeos iniciadores desenhados a partir de outras espécies

1 Médico Veterinário, PhD em Biologia da Reprodução, pesquisador da Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, TO.

2 Zootecnista, PhD em Ciência da Lã, pesquisadora da Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, TO.

3 Biólogo, Doutor em Biologia Molecular, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

de teleósteos nas quais este gene é conhecido. Foi obtido um *amplicon* que foi clonado em vetor plasmidial, transformado em bactérias e purificado para ser sequenciado. Uma sequência do gene do GH de tambaqui foi obtida, analisada e comparada com sequências do GH de outros teleósteos e depositada no GenBank.

A caracterização do gene do GH do tambaqui poderá servir de controle positivo na expressão de hormônios hipofisários, para estudos de expressão gênica nos diferentes tecidos e situações fisiológicas, também para produção de proteínas recombinantes e finalmente poderá proporcionar seu uso para a busca de polimorfismos de base única (SNPs) neste gene a fim de auxiliar no melhoramento genético.

Palavras chave: Caracterização molecular hormônios; Hormônio do Crescimento (GH); GH tambaqui.

Molecular characterisation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth hormone.

Abstract

Growth hormone of teleost fishes is a single chain polipeptidic molecule mainly secreted by the somatotrophs of the anterior hypophysis, being an important regulator of somatic growth and also involved in a plethora of other biological processes, such as methabolism, osmotic regulation, reproduction, behaviour and immunity.

To determine the tambaqui GH coding sequence, total RNA was extracted from adult fish hypophysis, used for cDNA synthesis and later used for PCR amplification based on short oligonucleotides especially designed from other species of teleosts which this gene is known. The resulting amplicon was cloned in a plasmid vector, transformed in bacteria and purified to be sequenced. A sequence of the tambaqui GH gene was obtained, analysed, compared to other sequences of teleost fishes, and submitted to the GenBank.

The sequence of the tambaqui GH gene could be useful as positive control for the expression of hypophysarian hormones, for genic expression studies in different animal tissues and physiological statuses, for recombinant protein production, and also helpful in animal breeding programmes by using GH single nucleotide polymorphism (SNP) as a molecular marker.

Key words: Hormone molecular characterisation; growth hormone (GH); GH tambaqui.

Introdução

O hormônio do crescimento (GH) é um hormônio polipeptídico de cadeia simples secretado principalmente pelos somatotrófos da glândula hipófise anterior e é um importante regulador do crescimento somático em vertebrados, incluindo os teleósteos (Dai et al., 2015).

Há evidências de que o GH, além de ser produzido na glândula hipófise de mamíferos, possa também ser produzido em alguns tecidos extrahipofisários, incluindo a placenta, tecido mamário, cérebro e glândula pineal (Butler e Roith, 2001). Em teleósteos, transcriptos de GH também foram detectados no testículo de peixe-rei (*Odontes bonariensis*) (Sciara et al., 2006), e no cérebro, fígado, rim, baço, coração, músculo, e ovário do *Schizothorax prenanti* (Li et al., 2011).

A atuação do GH no crescimento corporal é bem conhecida, inclusive em teleósteos, mas este hormônio tem outras ações, como por exemplo interagindo na função do sistema imune (Franz *et al.,* 2016).

Também foi demonstrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que o GH estimula a produção de esteróides no testículo de vários peixes teleósteos (Schulz et al. 2010). Além disso, foi demonstrado que o tratamento com GH promove a proliferação das espermatogônias em bagre da Filipina (*Clarias batrachus*, (Gopal, Kumar e Lal, 2014)), o que indica que, pelo menos nos machos, o GH tem um papel importante na reprodução.

Material e Métodos

RNA total foi extraído a partir de hipófises de tambaquis abatidos para consumo, utilizando TRI reagente (Sigma-Aldrich Ltd), conforme a metodologia recomendada pelo fabricante. A quantificação do RNA total foi feita em espectrofotômetro nanodrop e a sua integridade confirmada por gel desnaturante de agarose a 1% (Masek *et al.,* 2005). A síntese de cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA total utilizando o *kit Superscript III first-strand synthesis supermix* (Invitrogen) e iniciadores oligo dT, de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante.

Os oligonucleotídeos iniciadores usados na PCR foram desenhados baseados nas sequências depositadas no GenBank das espécies bagre do canal (*Ictalurus punctatus,* NM001200245) e pacu (*Piaractus mesopotamicus,* DQ206404). A amplificação por PCR foi realizada em reações contendo 1µl de cDNA, 2,5 µL de tampão 10X (Tris-HCl a 100, pH 8,5; KCl 500 mM), 200 µM de dNTPs, $MgCl_2$ 2 mM, 2,5 pM de iniciadores IP GH forward 5'-ATGGCTAGAGCATTAGTGCTG-3'e PM GH reverse 5'-CAGGGTGCAGTTGGAATCCAG-3', 1 unidade de Taq DNA polimerase (Platinium Taq, Invitrogen) e água estéril para levar o volume total a 25 µL. Um amplicon com aproximadamente 600 pares de bases (bp) foi obtido e purificado com o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up Sytem* (Promega), seguindo as instruções do fornecedor.

A clonagem do *amplicon* foi feita com o *kit TOPO® TA Cloning* com vetor pCR™ II-TOPO (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. As colônias contendo o inserto foram cultivadas durante a noite e os plasmídeos purificados utilizando o *kit QIAprep Spin Miniprep Kit* (Quiagen), obedecendo as recomendações do fabricante. As preparações obtidas foram quantificadas em espectrofotometro nanodrop e enviadas para sequenciamento terceirizado (Helixxa Imp. Exp. Serv. Gen. LTDA, Paulínia, SP). Os cromatogramas obtidos foram avaliados quanto a sua qualidade e a seqüência obtida usando o *software* 4 peaks (mekentosj.com, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam,The Netherlands). A determinação da região codante e da sequência deduzida de amino ácidos foi realizada utilizando o *software online* ORF Finder (http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html). A identificação do peptídeo sinal foi feita com o software online SignalP 4.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), que prevê a presença e localização de sítios de clivagem do peptídeo de sinal em sequências de aminoácidos de procariótas e eucariótas. A análise da homologia da sequência obtida foi realizada usando os *softwares online* Blast e Blastp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), empregando os parâmetros default.

Resultados e Discussão

Uma sequência do gene do GH de tambaqui foi obtida e depositada no GenBank (KU312263, Figura 1) e a sequência de aminoácidos deduzida (AA) foi 89-77%, 84-79%, 68-64% e 59-54% homóloga à sequência prevista para teleósteos das ordens Cypriniformes, Siluriformes, Salmoniformes e Perciformes, respectivamente. A homologia no domínio do peptídeo secretado (Figura 1) é de até 99% entre o tambaqui e outros membros da família Characidae, ainda que a cobertura não seja total pois somente estão disponíveis sequências parciais para outras espécies desta família.

```
  1 atggctagagcattagtgctgctctctgttgtggtggcaagtgtg
  1 M  A  R  A  L  V  L  L  S  V  V  V  A  S  V
 46 ttcattagccagggctcaacctctgagaatcaacggctcttcaac
 16 F  I  S  Q  G  S  T  S  E  N  Q  R  L  F  N
 91 aatgcagtcatccgtgtgcaacaccttcaccagctggctgcgaag
 31 N  A  V  I  R  V  Q  H  L  H  Q  L  A  A  K
136 atgatcaccgattttgaggaaagtcttttacctgaggaacgcaga
 46 M  I  T  D  F  E  E  S  L  L  P  E  E  R  R
181 cagctgagcaagatttcccccctgtccttctgcaattctgactcc
 61 Q  L  S  K  I  F  P  L  S  F  C  N  S  D  S
226 attgaagcccccactggcaaggacgagacccagaagagctctgtg
 76 I  E  A  P  T  G  K  D  E  T  Q  K  S  S  V
271 ctgaaattgctgcacatctcataccgcctgatcgagtcttgggag
 91 L  K  L  L  H  I  S  Y  R  L  I  E  S  W  E
316 taccccagcaggatcctcggaaaccccaaccagattacagagaag
106 Y  P  S  R  I  L  G  N  P  N  Q  I  T  E  K
361 ctggctgacctgaaagtgggcattagtgtgcttatcaagggatgt
121 L  A  D  L  K  V  G  I  S  V  L  I  K  G  C
406 ctggatggccaacccaacatggacgacaatgagtctctgccccta
136 L  D  G  Q  P  N  M  D  D  N  E  S  L  P  L
451 ccattcgaagacttctaccagaccttgggtgatggcaacctcaga
151 P  F  E  D  F  Y  Q  T  L  G  D  G  N  L  R
496 aagagcttccgtctgctggcctgcttcaagaaggacatgcacaaa
166 K  S  F  R  L  L  A  C  F  K  K  D  M  H  K
541 gtggagacctatctgagggtggccaactgtaggaggtccctggat
181 V  E  T  Y  L  R  V  A  N  C  R  R  S  L  D
586 tccaactgcaccctg 600
196 S  N  C  T  L
```

Figura 1. Sequência de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos do GH de tambaqui. Nucleotídeos (sequência de cima) e amino ácidos (sequência de baixo) estão numerados a esquerda. Aminoácidos que compreendem a sequência do peptídeo sinal estão sublinhados.

Na Figura 2 está ilustrada a homologia entre a sequência proteíca obtida para o tambaqui e alguns exemplos de teleósteos das ordens Characiformes, Cypriniformes, Siluriformes, Salmoniformes e Perciformes. A homologia da sequência do GH de tambaqui também foi superior a 99% à sequência predita do GH da piranha vermelha (*Pygocentrus nattereri*) que recentemente ficou disponível com a divulgação da primeira montagem do genoma desta espécie no GenBank (GCA_001682695.1).

```
tambaqui          MARALVLLSVVVASVFISQGSTSENQRLFNNAVIRVQHLHQLAAKMITDFEESLLPEERR   60
piranha_vermelha  MAKGLVLLSVVVASVFVSQGSTSENQRLFNNAVIRVQHLHQLAAKMISDFEESLLPEERR   60
pacu              ----------------------SDNQRLFNNAVIRVQHLHQLAAKMITDFEESLLPEERR   38
jundiá            MARVLVLLSLAMASLYVSQGSTLESQRLFNNAVARVQHLHQLAAKMMDDFDEALLPEERK   60
cará              MDTVLLLLSVV--CLGVSSQPITDSQRLFSIAVSRVQHLHLLAQRLFSDFESSLQTEEQR   58
peixe_rei         MNRAILLLSVV--CLVVSSQPIADSQRLFSIAVSRVQHLHLLAQRLFSDFESSLQTEEQR   58
tilápia_nilo      MNSVVLLLSVV--CLGVSSQQITDSQRLFSIAVNRVTHLHLLAQRLFSDFESSLQTEEQR   58
bagre_canal       MARALVLLSVVVASLLFSQGATFESQRLFNNAVIRVQHLHQLAAKMMDDFEEALLPEERK   60
pangasius         MARVLVVLSVVVASLFFSQGATFENQRLFNNAVIRVQHLHQLAAKMMDDFEEALLPEERK   60
truta_arco_íris   MGQVFLLMPVLLVSCFLGQGAAMENQRLFNIAVNRVQHLHLLAQKMFNDFEGTLLPDERR   60
carpa_comum       MARALVLLSVVLVSLLVNQGTASENQRLFNNAVIRVQHLHQLAAEMINDFEDNLLPEERR   60
zebra-fish        MARALVLLQLVVVSLLVNQGKASENQRLFNNAVIRVQHLHQLAAKMINDFEEGLMPEERR   60
                                         :.****. ** ** *** ** .:: **:  *  :*::

tambaqui          QLSKIFPLSFCNSDSIEAPTGKDETQKSSVLKLLHISYRLIESWEYPSRI----------  110
piranha_vermelha  QLSKIFPLSFCNSDSIEAPTGKDETQKSSVLKLLHISYRLIESWEYPSRI----------  110
pacu              QLSKIFPLSFCNSDSIEAPTGKDETQKSSVLKLLHISYRLIESWEYPSRI----------   88
jundiá            QLGKIFPLSFCNSDSIEAPAGKDETQKSSVLKLLHTSYRLIDSWDFPSRT----------  110
cará              QLNKIFLLDFCNSDYIVSPIDKHETQRSSVLKLLSISHRLIESWEFPSRSLSGGSS----  114
peixe_rei         QLNKIFLQDFCNSDYIISPIDKHETQRSSVLKLLSISYGLVESWEFPSRFLSGGSA----  114
tilápia_nilo      QLNKIFLQDFCNSDYIISPIDKHETQRSSVLKLLSISYGLVESWEFPSRSLSGGSS----  110
bagre_canal       QLSKIFPLSFCNSDSIEAPAGKDEAQKSSVLKLLHTSYRLIESWEFPSRN----------  110
pangasius         QLSKIFPLSFCNSDSIEAPAGKDETQKSSVLKLLHTSYRLIESWEFPSKN----------  118
truta_arco_íris   QLNKIFLLDFCNSDSIVSPIDKQETQKSSVLKLLHISFRLIESWEYPSQTL--TISNSLM  120
carpa_comum       QLSKIFPLSFCNSDSIEAPTGKDETQKSSMLKLLRISFRLIESWEFPSQTLSGAVSNSLT  120
zebra-fish        QLSKIFPLSFCNSDSIETPTGKDETQKSSMLKLLRISFRLIESWEFPSQTLSSTISNSLT   60
                  ** ***  .***** * :*  *.*:*:**:****  *. *::**::**:

tambaqui          LGNPNQITEKLADLKVGISVLIKGCLDGQPNMDDNESLP-LPFEDFYQTL-GDGNLRKSF  168
piranha_vermelha  LGNPNQITEKLADLKVGISVLIKGCLDGQPNMDDNESLP-LPFEDFYQTL-GDSSLRKSF  168
pacu              LGNPNQITEKLADLKVGISVLIKGCLDGQPNVDDNESLP-LPFEDFYQTL-GDGNLRKSF  146
jundiá            LGNPNHISDKLADLKIGISVLIERCVDGQTTLDEIDSLA-PPFEDFYQTP-SEGNLSKHF  168
cará              --LRNQISSRLSELKTGILLLIRANQDEAENFPDSGALQLAPYGNFYQSLGADESLRRNY  172
peixe_rei         --PRTQISPKLSELKTGILLLIRANQDPAEIFSDPSGPQVPSYGNYYQSLGADESLRRTY  172
tilápia_nilo      --LRNQISPRLSELKTGILLLIRANQDEAENYPDTDTLQHAPYGNYYQSLGGNESLRQTY  172
bagre_canal       LGNPNHISEKLADLKMGIGVLIEGCVDGQTGLDENDSLA-PPFEDFYQTL-SEGNLRKSF  168
pangasius         LGNPNHISEKLADLKMGIGVLIEGCLDGQTSLDENDSLA-PPFEDFYQTL-SEGNLRKSF  168
truta_arco_íris   VRNSNQISEKLSDLKVGINLLIKGSQDGVLSLDDNDSQHLPPYGNYYQNLGGDGNVRRNY  178
carpa_comum       VGNPNQITEKLADLKVGISVLVKGCLDGQPNMDDNDSLP-LPFEDFYLTM-GESSLRESF  178
zebra-fish        IGNPNQITEKLADLKMGISVLIKGCLDGQPNMDDNDSLP-LPFEDFYLTV-GETSLRESF  178
                      .:*: :*::** ** :*:.   *      :        : ::* .  .: .: . :
```

Continua...

Figura 2. Continuação.

```
tambaqui          RLLACFKKDMHKVETYLRVANCRRSLDSNCTL   200
piranha_vermelha  RLLACFKKDMHKVETYLRVANCRRSLDSNCTL   200
pacu              RLLACFKKDMHKVETYLRVANCRRSLDSNCTL   178
jundiá            RLLSCFKKDMHKVETYLSVAKCRRSLDSNCTL   200
cará              ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRLSPEANCTL   204
peixe_rei         ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRLSPEANCTL   204
tilápia_nilo      ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRLSPEANCTL   204
bagre_canal       RLLSCFKKDMHKVETYLSVAKCRRSLDSNCTL   200
pangasius         RLLSCFKKDMHKVETYLSVAKCRRSLDSNCTL   200
truta_arco_íris   ELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRKYLEANCTL   210
carpa_comum       RLLACFKKDMHKVETYLRVANCRRSLDSNCTL   210
zebra-fish        RLLACFKKDMHKVETYLRVANCRRSLDSNCTL   210
                  .**:************* **:**   ::****
```

Figura 2. Homologia entre a sequência de amino ácidos deduzida do GH de tambaqui e piranha vermelha (*Pygocentrus nattereri*, XP017572862), pacu (*Piaractus mesopotamicus,* ABA46816), jundiá (*Rhamdia quelen,* ABK969310), cará (*Cichlasoma dimerus,* ADV17697), peixe rei (*Odontesthes bonariensis,* AAO31982), tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus,* AAA49437), bagre do canal (*Ictalurus punctatus,* NP_001187174), pangasius (*Pangasius pangasius,* P69161), truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss,* NP_001118162), carpa comum (*Cyprinus carpio,* ABV64406) e zebra-fish (*Danio rerio,* NP_001018328). Aminoácidos que compreendem a sequência do peptídeo sinal estão sublinhados. Asteriscos indicam que a posições têm um único resíduo, sendo totalmente conservadas. Dois pontos indicam a conservação entre grupos de propriedades fortemente semelhantes, ponto indicam conservação entre grupos de propriedades fracamente semelhantes.

A caracterização do gene do GH do tambaqui poderá ter várias aplicações práticas, como servir de controle positivo na expressão de hormônios hipofisários, visto que este está presente muito mais precocemente que as gonadotrofinas. Também como passo inicial para estudos de expressão gênica nos diferentes tecidos e situações fisiológicas como crescimento, osmoregulação entre outros (Rhee *et al.,* 2012). Além disso, poderá servir para produção de proteínas recombinantes para aplicação em imunoensaios como foi aplicado em carpa comum (Wu *et al.,* 2008) ou aplicação como aditivo alimentar para animais de produção aquícola (Rothan, Ser Huy e Mohamed, 2014).

A disponibilidade da sequência do GH de tambaqui poderá proporcionar seu uso para busca de polimorfismos de base única (SNPs) neste

gene, que estejam associados a melhor crescimento ponderal ou características de carcaça, como foi observado em outros peixes de interesse aquícola (Tian *et al.,* 2014).

Conclusão

A caracterização do gene do GH do tambaqui poderá servir de controle positivo na expressão de hormônios hipofisários, para estudos de expressão gênica nos diferentes tecidos e situações fisiológicas, também para produção de proteínas recombinantes e finalmente poderá proporcionar seu uso para a busca de polimorfismos de base única (SNPs) neste gene a fim de auxiliar no melhoramento genético.

Referências

BUTLER, A. A.; ROITH, D. L. Control of Growth by the Somatropic Axis: Growth Hormone and the Insulin-Like Growth Factors Have Related and Independent Roles. **Annual Review of Physiology**, v. 63, n. 1, p. 141-164, 2001.

DAI, X. et al. Neuroendocrine regulation of somatic growth in fishes. **Science China Life Sciences**, v. 58, n. 2, p. 137-147, 2015.

FRANZ, A.-C. et al. Endocrine and Local IGF-I in the Bony Fish Immune System. **Biology**, v. 5, n. 1, 2016.

GOPAL, R. N.; KUMAR, P.; LAL, B. Temperature dependent action of growth hormone on somatic growth and testicular activities of the catfish, Clarias batrachus. **General and Comparative Endocrinology**, v. 195, p. 125-131, 2014.

LI, C. et al. Molecular and expression characterization of growth hormone/prolactin family genes in the Prenant's schizothoracin. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 7, p. 4595, 2011.

MASEK, T. et al. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 1, p. 46-50, 2005.

RHEE, J.-S. et al. Cloning of growth hormone, somatolactin, and their receptor mRNAs, their expression in organs, during development, and on salinity stress in the hermaphroditic fish, Kryptolebias marmoratus. Comparative biochemistry and physiology. **Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 161, n. 4, p. 436-442, 2012.

ROTHAN, H. A.; SER HUY, T.; MOHAMED, Z. Effect of Codon Optimisation on the Production of Recombinant Fish Growth Hormone in Pichia pastoris. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 514835, 2014.

SCIARA, A. A. et al. Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (Odontesthes bonariensis) growth hormone. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 142, n. 3–4, p. 284-292, 2006.

TIAN, C. et al. Single Nucleotide Polymorphisms in Growth Hormone Gene and Their Association with Growth Traits in Siniperca chuatsi (Basilewsky). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, p. 7029-7036, 2014.

WU, G. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay of changes in serum levels of growth hormone (cGH) in common carps (Cyprinus carpio). **Science in China Series C: Life Sciences**, v. 51, n. 2, p. 157-163, 2008.

Embrapa

Pesca e Aquicultura

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE 13200