



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**RAFAEL DE OLIVEIRA GOULART**

**EXPRESSÃO CIRCADIANA DE GENES DO RELÓGIO MOLECULAR NO  
FÍGADO E CÉREBRO DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

**João Pessoa-PB**

**2017**

**RAFAEL DE OLIVEIRA GOULART**

**EXPRESSÃO CIRCADIANA DE GENES DO RELÓGIO MOLECULAR NO FÍGADO  
E CÉREBRO DA TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba como requisito obrigatório para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

Co-orientadora: Msc. Marcia Dantas dos Santos

**João Pessoa-PB**

**2017**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

G694e Goulart, Rafael de Oliveira.

Expressão circadiana de genes do relógio molecular no fígado e cérebro da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) / Rafael de Oliveira Goulart. - João Pessoa, 2017.

40 f. : il.

Orientação: Ian Porto Gurgel do Amaral.

Coorientação: Marcia Dantas dos Santos.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2. Piscicultura. 3. Ciclo circadiano. 4. PCR em tempo real. I. Amaral, Ian Porto Gurgel do. II. Santos, Marcia Dantas dos. III. Título.

UFPB/BC



João Pessoa, 20 de novembro de 2017.

### ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte dias do mês de novembro de 2017, às 10:00 h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Ian Porto Gurgel do Amaral e composta pelos avaliadores 1. Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos (CBIOTEC/UFPB); 2. Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa (CBIOTEC/UFPB), o discente Rafael de Oliveira Goulart, matrícula 11312738, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Estudo molecular do relógio biológico da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): expressão circadiana de genes do mecanismo do relógio molecular em fígado e cérebro**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela Aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Ian Porto Gurgel do Amaral, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

*Ian Porto Gurgel do Amaral*

Presidente da Banca Examinadora

Avaliador 1

*Rafael de A. Travassos*

Discente

*Adna Cristina B. de Sousa*

Avaliador 2

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, **Genur** e **Claudete**, por toda dedicação, pelos inúmeros sacrifícios pessoais, pelo apoio que me deram nesses anos, pela confiança em minha capacidade como homem e estudante, e principalmente pela educação moral que me deram, se hoje eu me considero uma pessoa honesta e capaz é porque vocês me criaram assim, obrigado!

Agradeço ao meu irmão, **Samuel**, por sempre estar ao meu lado quando tudo dava errado e quando dava certo também. Você sempre foi o meu parceiro e amigo nas diversas situações da vida e sou muito grato a você por isso.

Aos meus tios, tias e primos por todo apoio e motivação que me deram e por todos os momentos de felicidades que compartilhamos nos finais de semana, minha vida nunca foi triste com vocês. Em especial aos meus primos **Anna** e **Cezar**, pelos quais tenho enorme consideração, vocês são como irmãos para mim.

Meu orientador **Ian**, por ter me convidado a participar de seus projetos e por me dar a oportunidade de conhecer o mundo da Ciência Biomolecular, mesmo com as tantas limitações que enfrentamos ao tentar fazer ciência de qualidade no Brasil e na Paraíba.

Aos meus colegas do LABOrA. **Jucilene e Márcia**, as duas mãezonas do laboratório, sempre organizando nossa bagunça, nos impulsionando a melhorar e sempre ajudando quando necessário. **Elizanete**, minha companheira de extrações. **Lucas** meu colega de limpezas do sistema. **Anna Ju** e **Cayro**, que me receberam tão bem e se dispuseram a ajudar quando possível.

Aos DONOS da sala 10 do CBIOTEC: **Carol, Andrwey, Tarcísio, Ray, Gabriel, Melina, Débora, Fabrine, Alex, Estrela, Aline, Lucas**. Vocês são grandes amigos que eu tive a sorte de conhecer, talvez a coisa mais positiva que UFPB já me deu. Em especial à **Carol**, que esteve comigo em praticamente toda minha formação acadêmica (lê-se, desde a 6ª série kkkk).

Ao meu grande e melhor amigo **Ulisses**, que esteve comigo durante os melhores anos e experiências de minha vida e que, infelizmente não pôde me acompanhar no final dessa etapa, é uma grande tristeza não poder comemorar essa vitória contigo meu amigo.

Às minhas colegas de trabalho, **Luiza, Yngrid, Fátima** e **Katiucia**, por tornarem muito mais leve a pesada rotina que foi trabalhar a noite durante a graduação, além de serem amigas que quero levar para o resto da vida.

Aos **professores** que fazem parte do Curso de Biotecnologia, eu aprendi muito com vocês apesar das limitações estruturais e dificuldades que passamos. Vocês conseguiram transmitir seus conhecimentos o suficiente para que hoje eu me considere um biotecnologista, parabéns e obrigado. No meio de tantos profissionais competentes, **Sildivane** e **Andreia** foram duas professoras que se destacaram pelo cuidado, dedicação e atenção ao passarem o conteúdo ensinado e que me inspiraram a continuar acreditando no curso, obrigado professoras!

Aos membros da banca examinadora, **Adna Cristina Barbosa de Sousa** e **Rafael de Almeida Travassos**, por aceitarem fazer parte da banca e por enriquecerem este trabalho ao contribuírem de forma positiva com suas experiências acadêmicas e profissionais.

Ao **Centro de Biotecnologia** – CBIOTEC e a **Universidade Federal da Paraíba** - UFPB por proporcionarem as condições, espaço e estrutura necessários para a minha formação acadêmica e social.

A todas as outras pessoas que participaram de forma direta ou indiretamente nessa conquista.

**Sou muito grato a todos!**

*“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.”*

(Charles Robert Darwin)

## RESUMO

O fotoperíodo influencia o cultivo e a produção de peixes, especialmente nas taxas de crescimento dos animais. Este fator ambiental que modula a atividade biológica por meio do relógio molecular, que é composto de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes com periodicidade circadiana (período de cerca de 24h). Um mecanismo possível pelo qual o fotoperíodo influencia o crescimento somático está na modulação do metabolismo do fígado - um órgão de controle metabólico importante, e do cérebro - órgão central de controle, que afeta todas as funções do organismo. Desta forma, o presente trabalho objetivou analisar a expressão de genes do mecanismo do relógio molecular no fígado e cérebro da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), uma das espécies mais importantes para a piscicultura nacional em termos de produção. Espécimes de tilápia-do-Nilo foram aclimatados por 3 semanas no laboratório em 4 tanques separados (28L, n=17 por tanque). Após este período, 7 peixes foram medidos e sacrificados a cada 6h por 54h (n=63), com o objetivo de observar a expressão de genes ao longo do fotoperíodo. Os tecidos alvo foram dissecados e mantidos em solução conservante de RNA em baixa temperatura (-20°C) até a extração do RNA total, que foi realizada pelo método do fenol-clorofórmio utilizando Trizol. A qualidade e integridade do RNA total foi analisada por espectrofotometria e eletroforese, respectivamente e em seguida, foi realizada a síntese de cDNA. Os genes investigados foram, fator de alongamento-1 alfa (*ef1a*), e 18S RNA ribossomal (*18sRNA*), como genes de referência, e *clock1a* e *bmalla* como genes de interesse (genes do relógio molecular). Após a síntese do cDNA a partir dos RNA extraídos, realizamos a PCR em tempo real. Em todas as reações, foi observada a formação apenas do produto de PCR esperado, sem a formação de produtos inespecíficos. Foi observada expressão circadiana do gene *clock1a* no fígado (acrofase no final da fase clara e expressão basal no período escuro), já nos outros perfis analisados (*clock1a* e *bmalla* no cérebro; *bmalla* no fígado) não foi possível comprovar estatisticamente a expressão circadiana, devido principalmente ao reduzido número amostral utilizado, apesar de todos apresentarem diferença de expressão entre os pontos experimentais analisados.

**Palavras-chave:** ciclo circadiano; produção pesqueira; tecido hepático; tecido cerebral; PCR em tempo real.

## ABSTRACT

The photoperiod influences the cultivation and production of fish, especially in the growth rates of the animals. This is an environmental factor that modulates biological activity through the molecular clock, which is composed of transcription factors that regulate an expression of genes with circadian periodicity (period of approximately 24 hours). A possible mechanism by which the photoperiod influences somatic growth is in the modulation of liver metabolism - an important metabolic control organ; and the brain - central control organ, which affects all functions of the body. Thus, the present work aimed at the analysis of genes of the molecular clock mechanism in the liver and brain of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*), one of the most important species for a national fish culture in terms of production. Nile Tilapia specimens were acclimatized for 3 weeks in the laboratory in 4 separate tanks (28L, n = 17 per tank). After this period, 7 fish were measured and sacrificed every 6h for 54h (n = 63), in order to observe an expression of genes throughout the photoperiod. The target tissues were dissected and maintained in low temperature (-20 ° C) RNA preservative solution until extraction of total RNA, which was performed by the phenol-chloroform method, using Trizol. A quality and integrity of total RNA was analyzed by spectrophotometry and electrophoresis, respectively and then performed with cDNA synthesis. The genes investigated were elongation factor-1 alpha (*ef1a*), 18S ribosomal RNA (*18sRNA*) as reference genes, and *clock1a* and *bmal1a* as genes of interest (molecular clock genes). After the synthesis of the cDNA from the RNA extracted, we performed the PCR in real time. In all reactions, formation was observed only by expected PCR product, without formation of nonspecific products. The circadian expression of the *clock1a* gene in the liver (acrophase at the end of the clear phase and basal expression in the dark period) was observed, but in the other analyzed profiles (*clock1a* and *bmal1a* in the brain, *bmal1a* in the liver) it was not possible to statistically prove a circadian expression due mainly to the small sample number used, although it presented a difference of expression between the experimental points analyzed.

**Keywords:** circadian cycle; Nile Tilapia; hepatic tissue; brain tissue; Real-time PCR.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mecanismo oscilatório molecular de mamíferos.....	17
<b>Figura 2</b> - Modelo atual do mecanismo molecular do relógio circadiano no peixe zebra.....	18
<b>Figura 3</b> – Exemplar de <i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia-do-Nilo), modelo experimental utilizado neste trabalho.....	20
<b>Figura 4</b> - Amostras representativas de eletroforese em gel de agarose obtido durante os experimentos.....	24
<b>Figura 5</b> – Expressão do <i>bmall1a</i> no cérebro de tilápia-do-Nilo.....	28
<b>Figura 6</b> - Expressão do <i>clock1a</i> no cérebro de tilápia-do-Nilo.....	29
<b>Figura 7</b> - Expressão do <i>bmall1a</i> no fígado de tilápia-do-Nilo.....	30
<b>Figura 8</b> - Expressão do <i>clock1a</i> no fígado de tilápia-do-Nilo.....	31

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** – Classificação taxonômica da tilápia-do-Nilo.....20

**Tabela 2** - Iniciadores desenhados para reações de qPCR.....25

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information.</i>
NSQ	Nucleo Supraquiasmático
<i>Bmal</i>	<i>brain and muscle Arnt-like protein</i>
<i>Ror</i>	receptor órfão relacionado ao ácido-retinóico
<i>Arnt</i>	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
<i>Clock</i>	<i>Cicardian locomoter output cycles kaput</i>
<i>Per</i>	<i>period</i>
<i>Cry</i>	<i>Cryptocome</i>
<i>Ppara</i>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\alpha</math></i>
<i>Ppar<math>\gamma</math></i>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\gamma</math></i>

Observação: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções que seguem o Sistema Internacional de Unidades (S.I.).

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1.	FOTOPERÍODO E SUA INFLUENCIA NOS ORGANISMOS .....	15
2.2.	CICLO CIRCADIANO.....	15
2.2.1.	MECANISMOS DO RELÓGIO MOLECULAR .....	16
2.2.2.	RELÓGIO MOLECULAR NOS PEIXES TELEÓSTEOS .....	17
2.3.	IMPORTÂNCIA DA TILÁPIA-DO-NILO.....	19
3.	OBJETIVOS .....	21
3.1.	OBJETIVO GERAL .....	21
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	22
4.1.	ACLIMATAÇÃO DAS TILÁPIAS.....	22
4.2.	AMOSTRAGEM DAS TILÁPIAS.....	22
4.3.	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL.....	22
4.4.	INTEGRIDADE DO RNA TOTAL.....	23
4.5.	SINTESE DE cDNA .....	24
4.6.	DESENHOS DE INICIADORES PARA PCR QUANTITATIVA (qPCR).....	24
4.7.	PCR QUANTITATIVA (qPCR) E ANÁLISE DE DADOS .....	25
4.8.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
5.1.	PCR EM TEMPO REAL (qPCR) .....	27
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	34
7.	REFERENCIAS .....	35

## 1 INTRODUÇÃO

Durante o processo evolutivo das espécies, os seres vivos tiveram de se adaptar às mudanças que eles experimentavam, essas mudanças podiam ocorrer isolada e bruscamente (desastres naturais, grandes mudanças de relevo, redução abrupta de disponibilidade de recursos) ou de forma constante/cíclica (fim de um dia e início da noite), este ultimo tipo de mudança ambiental provocou um mecanismo de adaptação nos seres vivos que é sincronizada com a periodicidade de 24h do ciclo de alterações do ambiente, este mecanismo denomina-se ciclo circadiano. Assim, os organismos tornaram-se capaz de gerar e coordenar oscilações rítmicas endógenas para melhor se adaptarem à condição ambiental na qual está inserido, como por exemplo: produzir hormônios, acordar, procurar abrigo antes da noite, etc. Já foi demonstrado que dentre os fatores ambientais, a luz (fotoperíodo) tem o maior impacto na regulação desse mecanismo (YVONALDO, 2013).

Além dos fatores externos, o ciclo circadiano de atividades biológicas é determinado pelo relógio molecular, que é dividido em relógio central e periférico. Em mamíferos, o relógio central é responsável pela sincronização dos relógios periféricos, que controlam eventos fisiológicos relacionados ao ciclo circadiano. Os genes que estão envolvidos nos mecanismos do relógio são: *bmal* (*brain and muscle Arnt-like protein*); *clock* (*Cicardian locomoter output cycles kaput*); *per* (*Period*); *cry* (*Cryptochrome*); *rora* (*RAR-related orphan /receptor transcriptional activator of bmal1*); e *rev-erb* (*transcriptional repressor of bmal1*). O relógio molecular é constituído por duas alças regulatórias principais, uma de ativação (regulada pelo BMAL e CLOCK) e a outra de repressão (regulada pelo PER e CRY), além de uma alça auxiliar de estabilização (composta pela ROR $\alpha$ , que ativa a expressão de *bmal* e REV-ERB, repressora do *bmal*).

Atualmente a grande maioria dos estudos envolvendo relógio molecular em vertebrados utiliza o peixe-zebra como modelo experimental, sendo que a maior parte do conhecimento já estabelecido sobre o relógio molecular vem de estudos com a mosca *Drosophila melanogaster*, uma vez que ela foi o primeiro organismo a ter o seu relógio molecular descrito (KONOPKA; BENZER, 1971; HARB, 2013).

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie mais importante para a piscicultura nacional, ela apresenta características zootécnicas importantes para produção, pois possui crescimento rápido, curto ciclo de alimentação, maior resistência a doenças e maiores resistência a altas temperaturas quando comparados a outros peixes de cultivo

(TAVARES-DIAS; MORAES, 2010; BIZARRO, 2013). Devido a essas características zootécnicas durante seu cultivo e a alta aceitação pelo mercado consumidor, a tilápia vem se consolidando como um produto de grande valor comercial. Esta espécie apresenta outras vantagens para seu cultivo, por exemplo: preferência por águas rasas e poderem ser criadas em ambiente aberto ou fechados com água doce, salobra e marinha (FAO, 2015).

Apesar de esta espécie exercer um papel tão importante na economia brasileira, poucos estudos foram realizados com o objetivo de elucidar seus mecanismos de relógio molecular, tais estudos podem ser utilizados com o propósito de melhorar a produção advinda da cultura desta espécie. A proposta desse trabalho foi justamente esta, estudar os mecanismos do relógio molecular da *Oreochromis niloticus*, de modo que no futuro seja possível buscar soluções biomoleculares, genéticas, e de cultivo com a finalidade de melhorar ainda mais o cultivo dessa espécie e conseguir assim um aumento em qualidade e quantidade do principal produto de aquicultura do Brasil. Esperamos que os padrões de expressões dos genes estudados, *clock1a* e *bmalla*, se apresentem de forma circadiana com acrófase no período claro e expressão basal durante o período escuro.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O ambiente representa um fator importante no desenvolvimento dos organismos e é composto de variáveis (temperatura, pH, intensidade da luz, disposição de alimento, densidade de indivíduos ocupando o mesmo espaço e microbiota) que podem alterar o comportamento dos organismos a eles submetidos. Algumas dessas variáveis ocorrem de maneira cíclica, se repetindo com uma frequência que pode ser definida (ex: nascer do sol no mesmo horário todos os dias, ou aumento da temperatura ao meio-dia). O ambiente influencia diretamente no desenvolvimento de tilápias, assim como demonstrado pela relação direta entre o fotoperíodo e o crescimento dos peixes (YVONALDO, 2013).

### **2.1. Fotoperíodo e sua influencia nos organismos**

Além dos fatores ambientais, fatores genéticos estão ligados ao crescimento dos animais, uma vez que o fenótipo (características observáveis, como tamanho e peso) é resultado da interação da genética com o ambiente a que o peixe está exposto. Dentre esses fatores, a luz, nos ciclos de claro e escuro (denominado fotoperíodo), é um dos que mais afeta o crescimento somático dos animais durante o cultivo. Um exemplo da influencia do fotoperíodo no comportamento de peixes tropicais está na reprodução do (*Danio rerio*), onde animais (aclimatados em um ciclo de 12hr claro e 12h escuro) tem preferencia pelas primeiras horas do dia para acasalarem, sendo essas horas o momento critico para uma reprodução de sucesso. O fotoperíodo afeta tais comportamentos através de uma relação com o relógio biológico endógenos dos animais.

### **2.2. Ciclo circadiano**

Esta influência ambiental é tão significativa para o desenvolvimento, sobrevivência e reprodução dos animais, que foi necessário desenvolver mecanismos de adaptação às oscilações do ambiente ao qual eram e são expostos de maneira cíclica. O resultado da interação entre o ambiente e esses mecanismos endógenos é justamente o ciclo circadiano.

O termo “ciclo circadiano” refere-se a ritmos biológicos de eventos moleculares, fisiológicos e comportamentais com periodicidade em torno de 24h. Estes ciclos são iniciados e mantidos por fatores externos como luz, alimentação, e temperatura, e por fatores internos,

que são regulados pelo relógio biológico ou molecular (PEREIRA; TUFIK; PEDRAZZOLI, 2009). O fator ambiental com maior capacidade de deflagrar um evento de adaptação endógena através do relógio biológico é o fotoperíodo (YVONALDO, 2013).

### 2.3. Mecanismos do relógio molecular

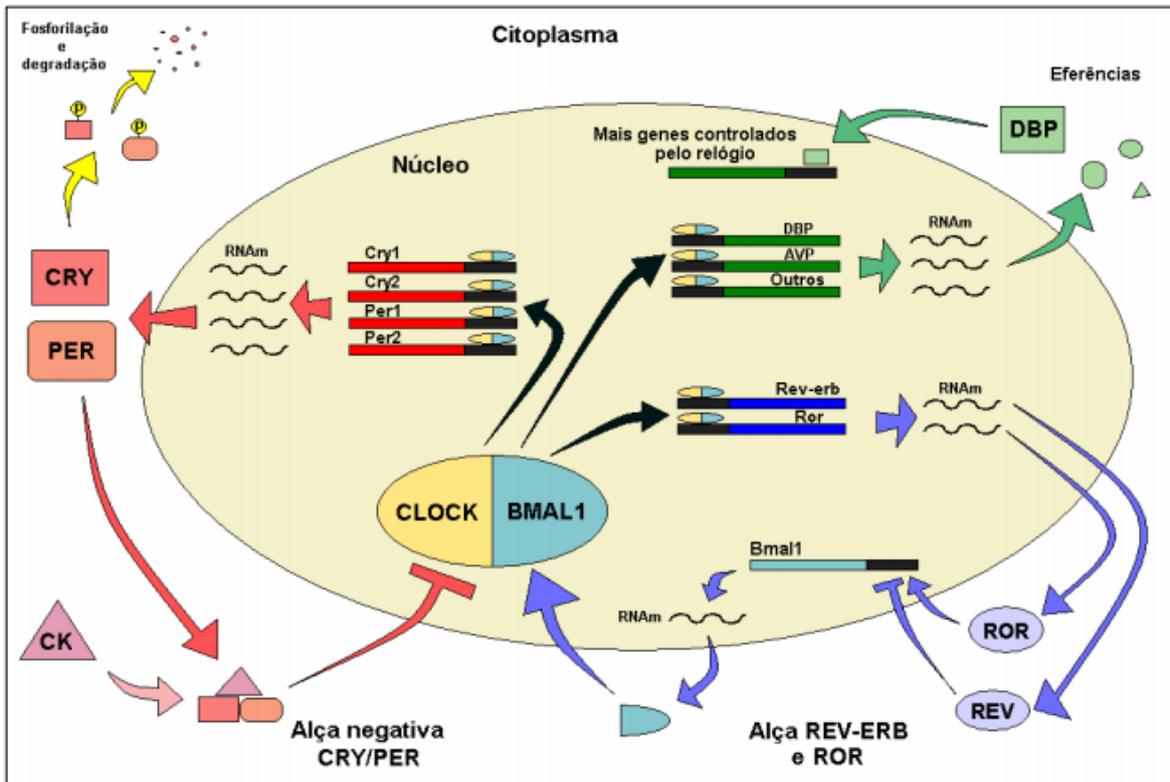
O relógio biológico é composto por estruturas que operam como marcapassos, exibindo um padrão oscilatório próprio e autossustentado, capaz de gerar um ritmo endógeno passível de sincronização (ALBRECHT, 2002). O núcleo supraquiasmático (NSQ) é uma estrutura anatômica localizada no hipotálamo anterior, acima do quiasma óptico e representa o relógio biológico capaz de gerar ritmo endógeno próprio (ALOE et al; 2005). O relógio molecular central em mamíferos se localiza no NSQ, e é capaz de sincronizar todos os relógios moleculares do organismo, sendo também responsável pelo controle dos ciclos de vigília, alimentação e atividade comportamental (RICHARDS; GUMZ, 2012; HARB, 2013). Existe uma discussão sobre a existência e localização de um relógio molecular central em peixes. Porém, tem sido mostrada a existência do relógio molecular periférico presente na maioria dos tecidos (FALCON, 1999; FALCON et al., 2007), o que sugere que a fisiologia circadiana dos peixes funciona de maneira diferente quando comparados aos mamíferos.

A etapa inicial da foto-sincronização do NSQ está nas células ganglionares da retina. Estas células possuem receptores e fotopigmentos específicos que são responsáveis pela fotorecepção e transdução do estímulo luminoso transmitido até o NSQ (VAN GELDER, 2004). Esse relógio central distribui a informação para os relógios periféricos (núcleos hipotalâmicos espalhados pelos tecidos do organismo). Segundo Pace-Schott e Hobson (2002), o NSQ é responsável pela periodicidade de secreção de hormônios, variação de temperatura, ingesta alimentar, propensão e duração do ciclo sono-vigília e secreção de melatonina.

A base do funcionamento do relógio molecular são alças de retroalimentação positiva e negativa, onde a interação do organismo com diversos fatores altera a atividade dessas alças regulatórias. A alça de inibição tem ação de dois genes principais, o gene *period* (*per1*, *per2* e *per3*) e o gene *Cryptochrome* (*cry1* e *cry2*), já alça de ativação tem a participação dos genes *clock* (*Circadian locomotor output cycles kaput*) e *bmal* (*brain and muscle Arnt-like protein*). Há ainda uma via alternativa responsável pela estabilização do ritmo do relógio, composta pelos genes *rev-erb* (repressor de *clock* e *bmal*) e *rora* (ativador de *clock* e *bmal*), onde as

proteínas ROR $\alpha$  e REV-ERB $\alpha$  regulam a ativação e inibição dos genes da alça de ativação, respectivamente.

**Figura 1** - Mecanismo oscilatório molecular de mamíferos.



Setas vermelhas indicam a alça de retroalimentação negativa; setas azuis indicam o mecanismo de regulação por ROR e REV-ERB; setas verdes indicam os genes modulados por CLOCK:BMAL. **Fonte:** Cecon; flores (2010).

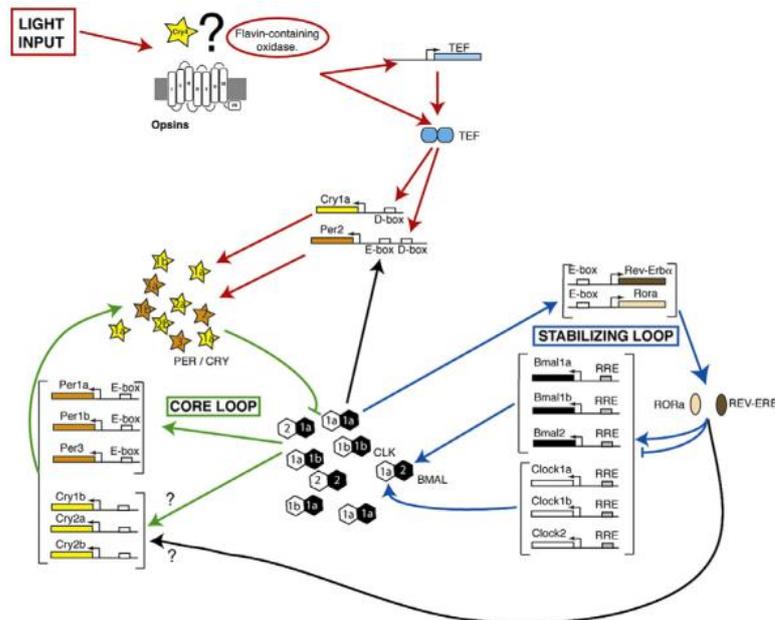
Como esquematizado na Figura 1, após a sua transcrição e tradução, as proteínas CLOCK e BMAL formam um heterodímero capaz de ativar a expressão de outros genes do relógio molecular que compõe a alça de retroalimentação negativa (*cry1*, *cry2*, *per1*, *per2*), a alça de estabilização (*Rev-erb* e *ror*), além de outros genes controlados pelo relógio molecular (*DBP*, *AVP*, outros), que em última análise, são os genes responsáveis pelos ritmos das atividades biológicas, sejam elas fisiológicas ou comportamentais, como por exemplo, a liberação da vasopressina e outros neuropeptídios, neurotransmissores, hormônios, fatores de transcrição, moléculas de sinalização intracelular, dentre outros (DUFFIELD, 2003).

## 2.4. RELÓGIO MOLECULAR NOS PEIXES TELEÓSTEOS

Devido aos eventos de duplicação genômica que ocorreram na base da evolução dos peixes teleósteos, algumas espécies possuem mais de uma cópia de cada um dos genes do

relógio molecular. Já foi comprovado que o peixe-zebra possui genes do relógio molecular com mais de um parâlogo, como por exemplo, nos genes do tipo *cry* (*cry1*, *cry2*, *cry3* e *cry4*) onde os genes *cry1* e *cry2* possuem dois parâlogos cada (*cry1a* e *cry1b*; *cry2a* e *cry2b*) havendo diferença nas funções exercidas entre eles, alguns inibindo o heterodímero CLOCK:BMAL e outros não; além do *cry* os genes *bmal* (*bmal1a*, *bmal1b* e *bmal2*), *per* (*per1a*, *per1b*, *per2* e *per3*) e o gene *clock* (*clock1a*, *clock1b* e *clock2*) também possuem vários parâlogos, Estas características podem trazer implicações moleculares e fisiológicas importantes, já que cada parâlogo pode possuir funções diferentes e principalmente sofrer regulações diferentes. Considerando tantas possibilidades, vários heterodímeros CLOCK:BMAL podem se formar dependendo das mudanças no fotoperíodo e de outros fatores regulatórios (LIU et al., 2015; VATINE et al., 2011; CERMAKIAN et al., 2000), essas informações sugerem que o mecanismo do relógio biológico nos peixes seja mais complexo do que o dos mamíferos.

**Figura 2** - Modelo atual do mecanismo molecular do relógio circadiano no peixe zebra.



Na alça de retroalimentação negativa (CORE LOOP) os heterodímeros CLOCK:BMAL se ligam aos elementos E-box dos genes *Period* (*Per*) e *Cryptochrome* (*Cry*) levando-os á expressão rítmica; O heterodímero PER:CRY é então formado e, ao atingir o núcleo da célula, atuam inibindo a ação do CLOCK:BMAL, criando o efeito de alça negativa. PER:CRY também são regulados por fatores externos, a partir dos parâlogos *cry1a* e *per2* que são regulados por um mecanismo dependente da incidência de luz (a luz atinge os tecidos fotorreceptores ativando o TEF, que por sua vez se liga aos elementos D-box dos genes *cry1a* e *per2*); Na alça de estabilização (STABILIZING LOOP) o heterodímero CLOCK:BMAL promovem a transcrição dos genes *Rora* e *Rev-Erba*, as proteínas resultantes desse processo (RORα e REV-ERBα) dirigem a expressão rítmica dos genes *Clock* e *Bmal* de forma antagonônica ao se ligarem no elemento responsivo ao ROR (RRE), onde o RORα tem efeito promotor e REV-ERBα tem efeito inibidor. **Fonte:** Vatine et al (2011).

Como pode ser visto na Figura 2, os parálogos dos genes *cry* e *per* (*cry1a* e *per2*) sofrem regulação pelo fotoperíodo por possuírem os elementos D-box, que são ativados pelo TEF em resposta à incidência de luz nos fotorreceptores. Esse é um exemplo de como os eventos de duplicação genômica tiveram impacto na complexidade do sistema de regulação do relógio biológico dos peixes teleósteos, criando outros mecanismos de modulação além dos que podem ser observados em outros organismos.

A maior parte do conhecimento sobre o relógio molecular é derivado dos estudos com a mosca *D. melanogaster*, já que ela foi a primeira a ter o seu relógio molecular descrito (KONOPKA; BENZER, 1971; HARB, 2013). No decorrer dos anos, também surgiu o interesse em realizar estudos nos peixes, tendo como principal modelo o peixe-zebra. Em relação, à tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), poucos estudos envolvendo o relógio molecular foram realizados neste peixe, embora um autor já tenha identificado padrões biológicos circadianos nesta espécie (COSTA et al, 2016).

## **2.5. Importância da tilápia-do-Nilo**

As tilápias pertencem à ordem dos Perciformes, família Cichlidae, e são naturais do continente africano (VERANI, 1980). Podem chegar a medir 60 cm e viver 10 anos, toleram ambientes com temperaturas de 14° a 33° e pH entre 6,0 e 8,6. Possuem um comportamento de agressividade mediana e alimentação onívora com tendência herbívora (praticam canibalismo).

Essa espécie ocorre naturalmente em rios costeiros de Israel, na bacia do rio Nilo, em vários lagos da Etiópia e em praticamente todas as bacias de água doce na África Ocidental, porem já foi introduzida em inúmeros países que visam a sua alta rentabilidade como produto da aquicultura. O primeiro registro da tilápia-do-Nilo no Brasil foi no ano de 1971, onde alguns exemplares oriundos da Costa do Marfim foram introduzidos no estado do Ceará (CASTAGNOLLI, 1992). Apesar de ser naturalmente de águas doces podem sobreviver em águas salobras também.

A tilápia-do-Nilo é a espécie mais importante para a piscicultura nacional, ela apresenta um alto valor econômico por possuir um aumento de produtividade quando comparada a outras espécies de produção devido às suas características zootécnicas superiores que conferem uma alta capacidade de adaptação e crescimento em condições de cultivo menos complexas e mais baratas. Em relação às espécies comercialmente cultivadas, a tilápia

ocupa uma posição de destaque, sendo considerado o peixe de água doce mais produzido pela aquicultura no Brasil, tendo em vista que a produção da tilápia-do-Nilo mostra crescimento acentuado desde 2008, e em 2011 ultrapassou 253 mil toneladas, representando mais de 39% de toda a produção da piscicultura continental (MPA, 2011). Apesar da alta relevância econômica e científica da tilápia, pouco se conhece sobre seus ritmos biológicos e os relógios moleculares existentes nos tecidos da tilápia-do-Nilo.

**Tabela 1** - Produção de pescado (t) da aquicultura continental por espécie

<b>TOTAL</b>	<b>544.490,0</b>
<b>Bagre</b>	7.048,1
<b>Carpa</b>	38.079,1
<b>Pacu</b>	21.689,3
<b>Pirapitinga</b>	9.858,7
<b>Pintado</b>	8.824,3
<b>Tambacu</b>	49.818,0
<b>Tambaqui</b>	111.084,1
<b>Tambatinga</b>	14.326,4
<b>Tilápia</b>	253.824,1

Fonte: adaptado de MPA (2011)

**Tabela 2** – Classificação taxonômica da tilápia-do-Nilo.

tilápia-do-Nilo	
Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Chordata</i>
Classe	<i>Actinopterygii</i>
Ordem	<i>Perciformes</i>
Família	<i>Cichlidae</i>
Gênero	<i>Oreochromis</i>
Espécie	<i>Oreochromis niloticus</i>

Fonte: NCBI

**Figura 3** – exemplar de *Oreochromis niloticus* (Tilápia-do-Nilo), modelo experimental utilizado neste trabalho.



Fonte: <http://www.fishbase.se>

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar a expressão de genes da alça positiva do relógio molecular de juvenis da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

#### **3.2. Objetivos específicos**

Averiguar perfil de expressão do gene *clock1a* e *bmalla* no cérebro;

Averiguar perfil de expressão do gene *clock1a* e *bmalla* no fígado.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos (LABOrA) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (CBiotec/UFPB), com espécimes de tilápia-do-Nilo adquiridos do laboratório de aquicultura, sob responsabilidade do Professor Dr. Marino Eugênio de Almeida Neto, e integrado ao Departamento de Agropecuária do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias da UFPB – *Campus* Bananeiras.

### **4.1. Coleta e aclimação das tilápias**

Os espécimes foram removidos de tanques escavados (*campus* bananeiras) e medidos com auxílio de uma régua. A seleção dos animais foi feita apenas baseada no tamanho, onde os que apresentaram tamanho corpóreo entre 5 e 10 cm foram transportados até o *campus* de João Pessoa. As tilápias foram mantidas em quatro tanques separados e aclimatados por três semanas a aproximadamente 25°C, pH entre 7.5 e 8,0, com fotoperíodo de 12h:12h claro: escuro, e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (*Tropical Discus Gran*).

### **4.2. Amostragem das tilápias**

Após o período de aclimação, foi realizado o experimento do ritmo circadiano, no qual 63 animais foram coletados em um período de 54h (7 animais a cada 6h, totalizando nove pontos experimentais). Seguindo a aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA, certidão n° 0205/14), as tilápias foram eutanasiadas em solução anestésica com óleo do cravo da Índia (1ml de óleo/4ml de álcool) diluída na água. Posteriormente, os animais foram dissecados e foi feita a extração do fígado e cérebro, os tecidos coletados foram mantidos em uma solução conservante de RNA (*RNA later, Sigma*) a -20°C até a extração do RNA total.

### **4.3. Extração do RNA total**

As amostras foram mecanicamente homogeneizadas e submetidas a extração de RNA em fenol:clorofórmio utilizando o reagente Trizol (Ambion), de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram colocadas em tubos eppendorf contendo 500µl de trizol, homogeneizadas utilizando-se um pistilo de plástico e adicionados mais 500µl de trizol, posteriormente foram adicionados 200µl de clorofórmio. A mistura ficou incubada por 10min à temperatura ambiente e posteriormente centrifugada a 12.000rpm / 4°C / 10min, depois da centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo eppendorf contendo 500µl de isopropanol e após um novo período de incubação e centrifugação a fase líquida foi descartada. Nesta etapa do processo de extração já foi possível observar um precipitado de cor branca no fundo do tubo, sendo este o RNA total da amostra. Para garantir a obtenção do RNA sem contaminantes de outros componentes da amostra, foi feito um processo de limpeza com etanol 70% e centrifugação – processo repetido três vezes. Após a limpeza o precipitado foi ressuspensionado em 25µl de água livre de nuclease (água NF).

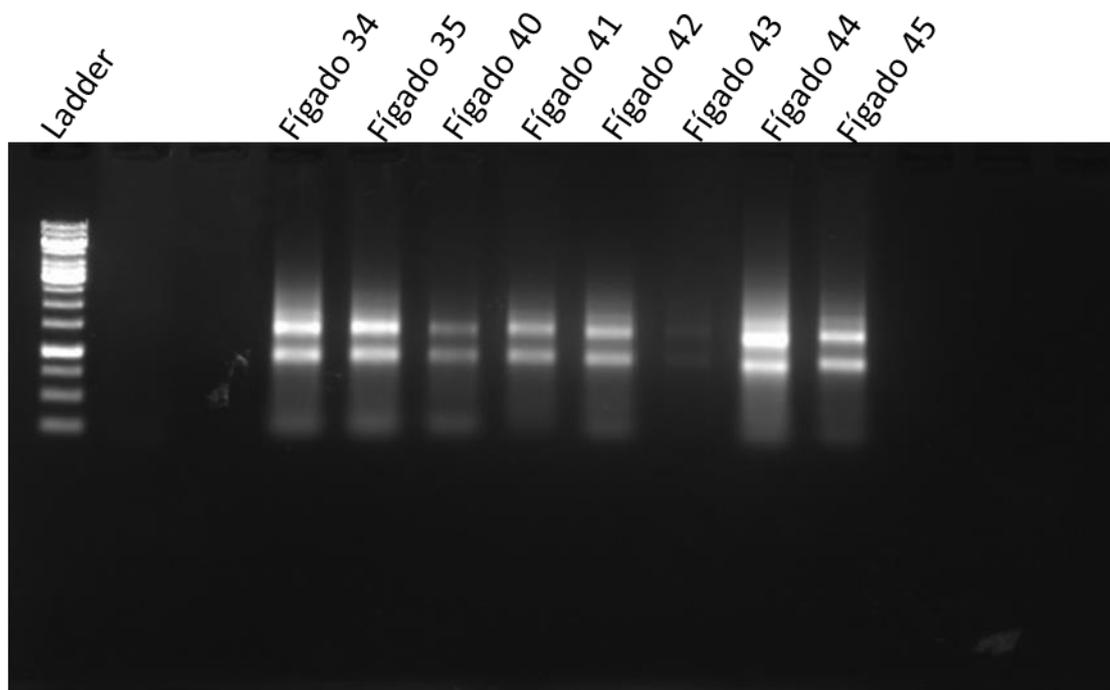
Para garantir que a extração foi bem sucedida, foi feita uma quantificação da concentração de RNA total nos extraídos, com o uso de um espectrofotômetro (*NanoDrop, Thermo Fisher Scientific*), o que também permitiu a verificação da qualidade das amostras através das taxas A260nm/A280nm e A260nm/A230nm (indicativos de contaminação), onde valores entre 1,9 e 2,1 são considerados adequados para esse tipo de extração.

#### **4.4. Integridade do RNA total**

Com a finalidade de verificar se houve a degradação do RNA total durante a extração, utilizamos a técnica da eletroforese em gel de agarose, buscando observar um padrão de bandas no gel que fosse compatível com o de um RNA integro: duas bandas paralelas, bem definidas e ausência de arraste (Figura 4).

As amostras que se apresentaram de forma incompatível com o padrão de bandas esperado de um RNA integro foram descartadas dos procedimentos seguintes. Considerando essas condições, foi observado que a grande maioria das amostras de RNA extraídas permaneceu íntegra e possibilitaram a síntese do cDNA a partir das mesmas.

**Figura 4** - Amostras representativas de eletroforese em gel de agarose obtido durante os experimentos.



As bandas iluminadas à direita são referentes a amostras de RNA extraídas do tecido do fígado (Fígado 34, 35, 40, 41, 42, 43, 44 e 45). No lado esquerdo está o 'Ladder', utilizado como referência de tamanho de bandas para avaliar as amostras.

#### 4.5. Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando o kit de transcrição reversa Quantitect (*Qiagen*), a partir de 1,0 µg de RNA total. Os parâmetros da síntese do cDNA foram definidos a partir das especificações do fabricante. Para a atividade da transcriptase reversa a reação ficou incubada a 30° por 15 min e para inativação da enzima, a reação foi incubada a 95° por 3 min.

#### 4.6. Desenhos de iniciadores para PCR quantitativa (qPCR)

Os pares de iniciadores (*primers*) foram desenhados com o auxílio do programa Primer Premier V5.0. Utilizando sequências de transcritos específicos da espécie *Oreochromis niloticus* nos bancos de dados NCBI e Ensembl, foram desenhados pares de iniciadores f (direto) e r (reverso) para os genes: *clock1a*, *bmall1a*, e *ef1a* (Tabela 1).

Além destes, foram utilizados dois iniciadores para o gene *18sRNA*, descritos na literatura (Yang, C.G. et al., 2013). Os parâmetros para o desenho de iniciadores foram: Tm do *primer* próximo a 60°C, produto de PCR com tamanho entre 80 e 250pb, e sem ocorrência de estruturas secundárias no iniciador e de formação de dímeros entre os iniciadores.

**Tabela 3** - Iniciadores desenhados para reações de qPCR.

Genes	f/r Sentido do Primer 5'-3'	Produto (pb)	Tm (°C)	%CG	R <sup>2</sup>	E (%)
<b>Genes circadianos</b>						
<i>bmal1a</i>	f: ATGGACTACACCCGCAAAAAGG r: ATCCGGCCCTGTTGGTCA	116	85,3	49,1	0,998	93
<i>clock1a</i>	f: ATGGGTTGATGGAAGAAGATGAAAA r: ACATTGAACTGGTCTCGCCG	88	83,2	46,6	0,999	91
<b>Genes de referência</b>						
<i>ef1a</i>	f: CCGAGCCCCCTACAGC r: CGCTCAATCTCCATCCCTTC	181	90,7	57,5	0,999	83
<i>18sRNA</i>	f: GGACACGGAAAGGATTGACAG r: GTTCGTTATCGGAATTAACCAGAC	111	82,3		0,999	81

Nota: f/r = sequência dos primers nos sentidos forward (f) e reverse (r); pb = tamanho do produtos em pares de bases; Tm = temperatura de melting; %CG = porcentagem de Citosina e Guanina na sequência dos *primers*; R<sup>2</sup> e E representam o coeficiente de linearidade e a eficiência média das reações.

#### 4.7. PCR quantitativa (qPCR) e análise de dados

Com a finalidade de amplificar as sequências de DNA a partir do cDNA produzido utilizamos os pares de iniciadores em reações de PCR em tempo real (qPCR). Foram feitos dois “*pools*” de amostras para cada um dos nove pontos de coleta (7 amostras cada), cada *pool* foi composto por 3 amostras, sendo que a de pior qualidade foi descartada.

A reação de qPCR foi composta de 7,5µl do reagente Brilliant II SYBR qPCR Low Rox Master Mix (*Stratagene*), 6µL do cDNA (*pool*) diluído 40 vezes e 1,5µL dos pares de iniciadores, dispensados em placas de 96 poços apropriadas (*Applied Biosystems*). Posteriormente, as reações foram realizadas em duplicadas no termociclador *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System* com o seguinte protocolo de termociclo: ativação inicial a 95°C por 10min seguida por quarenta ciclos de 95°C por 30s, 50°C por 30s e 72°C por 30s (quando foram obtidas as leituras de

fluorescência). O nível de expressão de cada gene foi avaliado pelo Cq (ciclo de quantificação). Ao final da PCR foi realizada uma curva de dissociação de 55° a 95°C, para averiguar a presença de um único pico de fluorescência, e assegurar que apenas um produto de PCR foi obtido nas reações. Para analisar a eficiência dos pares de iniciadores foi utilizado o software LingRegPCR versão 12.5 (RUIJTER et al; 2009). Os genes de referência (*efla* e *18sRNA*) foram utilizados para gerar um fator de normalização a partir do Genorm versão 3.5 (VANDESOMPELE et al; 2002), com valor de  $M < 1.5$ . Os ciclos de quantificação dos genes de interesse (*bmalla* e *clock1a*) foram normalizados utilizando o fator de normalização gerado pelo Genorm. Os resultados são expressos como unidades arbitrárias (u.a.) em relação ao ponto onde houve maior expressão.

#### **4.8. Análises estatísticas**

Os dados foram analisados para determinar o tipo de distribuição (normal ou diferente de normal) utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov, com nível de significância de 0,05. Todos os dados analisados seguiram uma distribuição normal, e a diferença entre as médias de cada ponto experimental foi analisada com o teste ANOVA. Após o teste de ANOVA o teste *post-hoc* de Tukey foi utilizado para analisar grupos com médias estatisticamente diferentes. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa IBM SPSS Statistics V21.

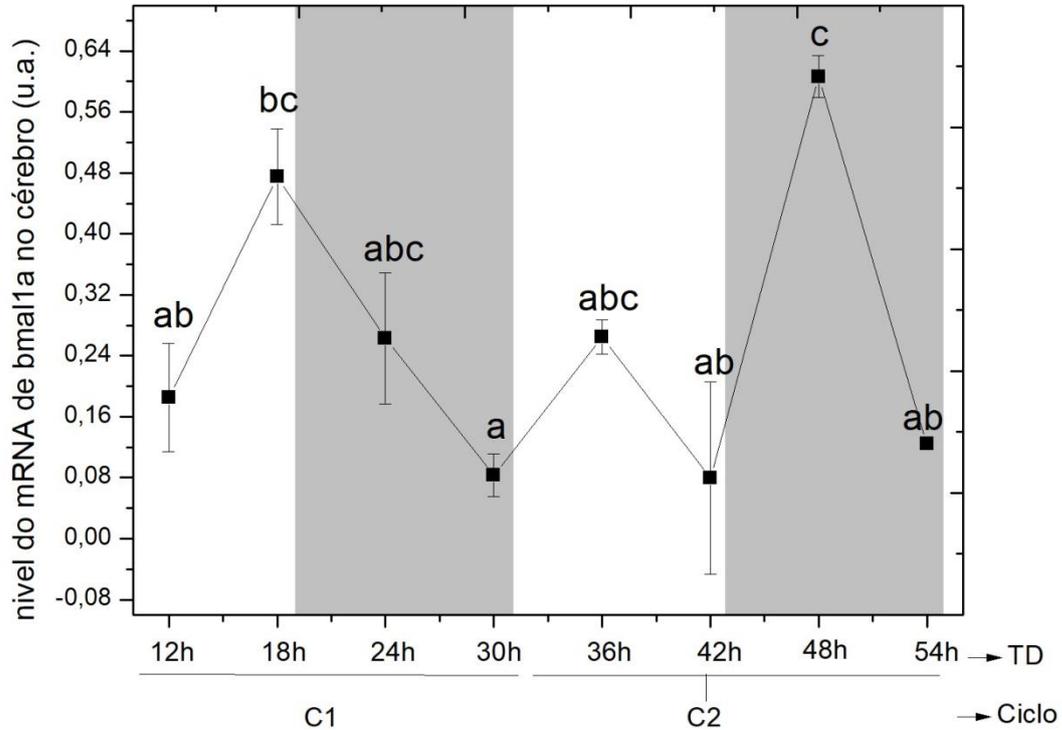
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. PCR em tempo real (qPCR)

A expressão dos genes da alça positiva do relógio molecular (*clock1a* e *bmalla*) foi analisada, por meio da técnica de PCR em tempo real, no cérebro e no fígado de tilápia-do-Nilo. Os resultados foram organizados em gráficos, relacionando o nível de mRNA presente nas amostras (expressão do gene) com o tempo decorrido após o início do experimento (TD), dentro desse tempo, houveram dois ciclos de fotoperíodo (C1 = 12h a 30h; C2 = 36h a 54h) sendo que cada um é composto por uma fase clara e uma fase escura (representada pela área sombreada no gráfico).

Analisando o tecido cerebral, como pode ser observado nas figuras 5 e 6, o padrão de expressão do *bmalla* se apresentou em um tipo de padrão que pode ser observado em genes circadianos. Na figura 5, pode-se observar em C1 um pico de expressão nas últimas horas do período claro (TD18) e expressão basal no período escuro (TD30). Em C2, verifica-se que esse gene apresentou valores máximo e mínimo no período escuro, TD48 e TD54, respectivamente. Sendo assim, pode-se inferir que não foi observado um ritmo evidente, apenas uma expressão circadiana desse gene que permaneceu no ciclo seguinte.

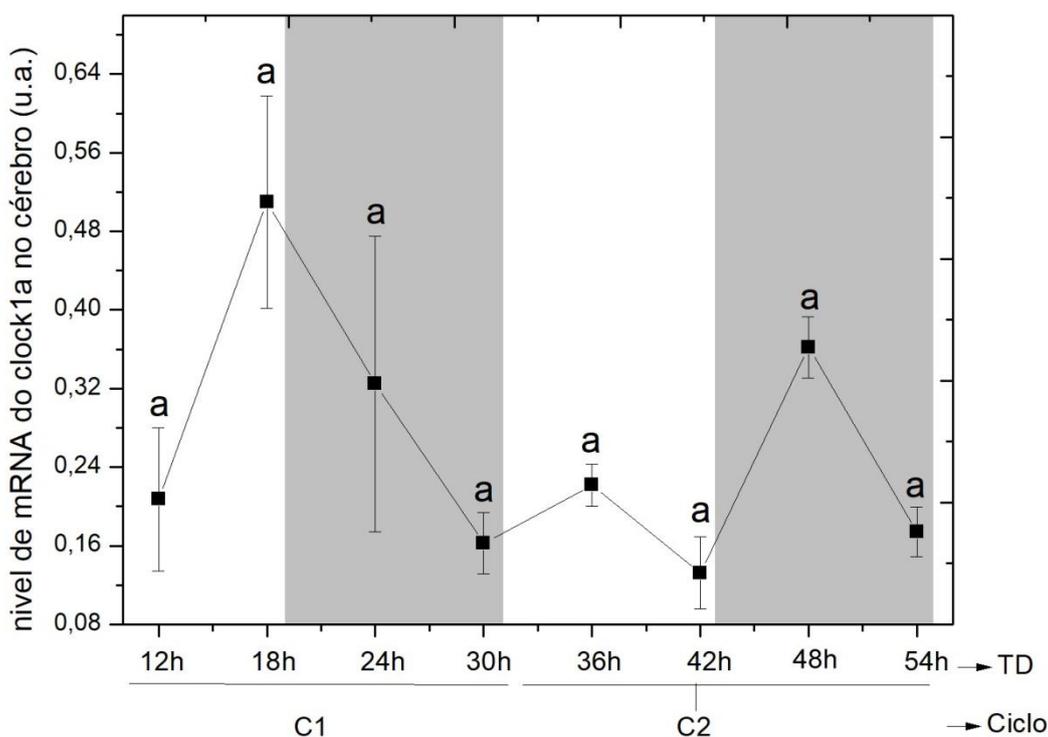
**Figura 5** – Expressão do *bmal1a* no cérebro de tilápia-do-Nilo



Nível de mRNA do gene *bmal1a* presente no cérebro em relação ao fotoperíodo, indicando a variação da expressão do gene em função do tempo. Letras diferentes representam que houve diferença estatística entre os pontos ( $p=0,032$ ), segundo o teste ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. TD indica o tempo decorrido após a primeira coleta. C1 e C2 indicam o ciclo do fotoperíodo, cada um contendo uma fase clara e uma fase escura. **Fonte:** o autor (2017).

Já considerando o gene *clock1a* (Figura 6), foi observada a ausência de expressão circadiana tanto no C1 quanto no C2, pois não houve diferenças estatisticamente significativas entre os pontos. Mostrando assim, ausência de um ritmo biológico com máximo e mínimo de acrofases.

**Figura 6** - Expressão do *clock1a* no cérebro de tilápia-do-Nilo



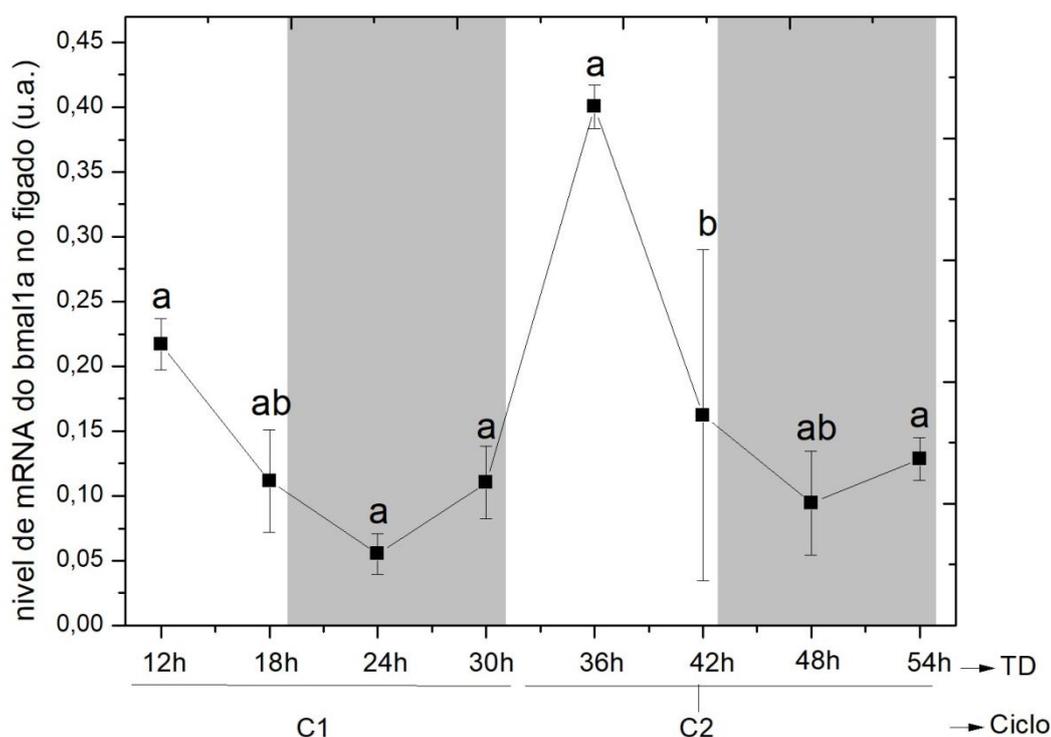
Nível de mRNA do gene *clock1a* presente no cérebro em relação ao fotoperíodo, indicando a variação da expressão do gene em função do tempo. Letras diferentes representam que houve diferença estatística entre os pontos ( $p > 0,001$ ), segundo o teste ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. TD indica o tempo decorrido após a primeira coleta. C1 e C2 indicam o ciclo do fotoperíodo, cada um contendo uma fase clara e uma fase escura. **Fonte:** o autor (2017).

Vale salientar que o gene *bm11a* apresentou uma tendência para um perfil de expressão circadiana, inclusive similar ao de Costa et al. (2016) no hipotálamo, em que se observou um pico de expressão entre o fim do período claro e início do escuro e expressão basal ao final da fase escura. O número amostral reduzido deste trabalho pode ter resultado na ausência do perfil circadiano, sendo assim, se a análise dos perfis de expressão dos genes estudados tivesse sido realizada com um número amostral maior, poderíamos ter diminuído o desvio padrão e observado, assim, um perfil de expressão circadiana.

No fígado, observa-se uma acrófase no período claro, tanto no C1 quanto no C2 (TD12 e TD36) para o *bmalla* (Figura 7). No entanto, não foi possível observar um ritmo circadiano de expressão do gene, uma vez que, estatisticamente os pontos não diferem entre si.

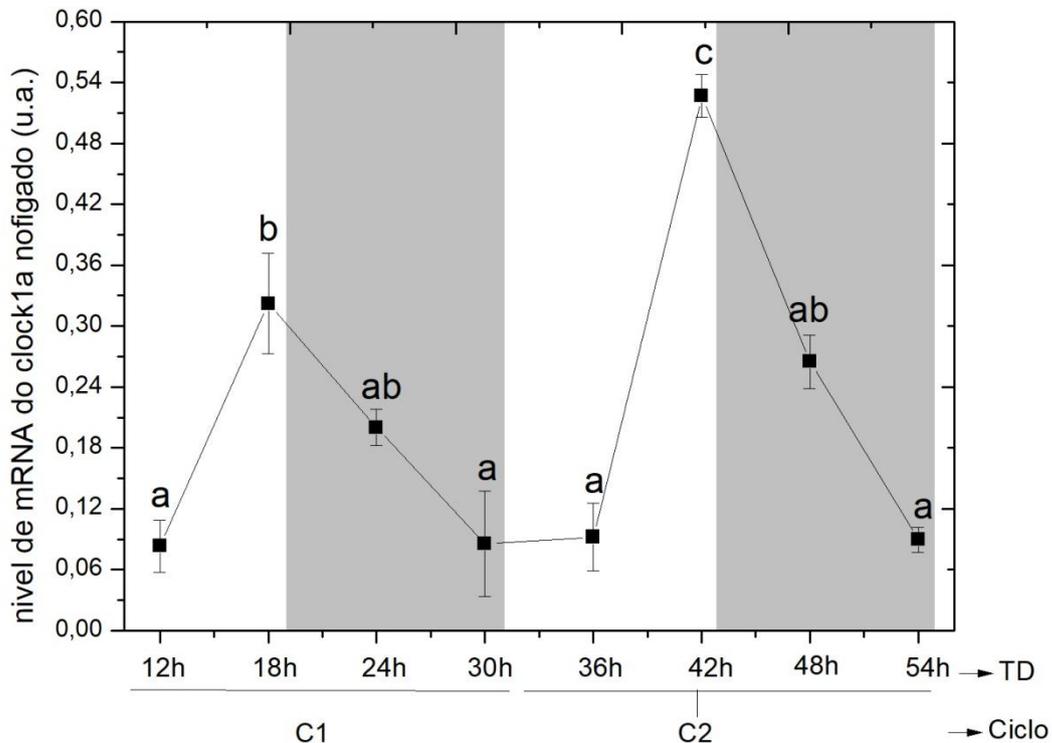
Já a expressão do *clock1a*, nesse tecido (Figura 8), apresentou resultados estatisticamente significativos. No C1, houve um pequeno pico de expressão no final da fase clara (18h). O C2 exibiu um resultado similar, com acrofase em 42h, mas com um nível de expressão maior (2.6 vezes maior). Assim, foi observada expressão circadiana do gene *clock1a* no fígado, caracterizada pela acrofase no final da fase clara e expressão basal no período escuro (Figura 6) tanto no C1 quanto no C2.

**Figura 7** - Expressão do *bmalla* no fígado de tilápia-do-Nilo



Nível de mRNA do gene *bmalla* presente no fígado em relação ao fotoperíodo, indicando a variação da expressão do gene em função do tempo. Letras diferentes representam que houve diferença estatística entre os pontos ( $p > 0,001$ ), segundo o teste ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. TD indica o tempo decorrido após a primeira coleta. C1 e C2 indicam o ciclo do fotoperíodo, cada um contendo uma fase clara e uma fase escura. **Fonte:** o autor (2017).

**Figura 8** - Expressão do *clock1a* no fígado de tilápia-do-Nilo



Nível de mRNA do gene *clock1a* presente no cérebro em relação ao fotoperíodo, indicando a variação da expressão do gene em função do tempo. Letras diferentes representam que houve diferença estatística entre os pontos ( $p > 0,001$ ), segundo o teste ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey. TD indica o tempo decorrido após a primeira coleta. C1 e C2 indicam o ciclo do fotoperíodo, cada um contendo uma fase clara e uma fase escura. **Fonte:** o autor (2017).

Nossos resultados exibiram expressão circadiana com acrofase no final da fase clara para o gene *bmalla* no cérebro, no C1, e no fígado, tanto no C1 quanto no C2, e para o *clock1a* no fígado, C1 e C2.

Existem poucas informações sobre o relógio molecular na tilápia-do-Nilo. O trabalho de Costa et al (2016) foi o primeiro a descrever o padrão de expressão dos genes do relógio e a influência de diferentes condições de fotoperíodo e alimentação em tecidos centrais (teto óptico e hipotálamo) e periféricos (fígado) da espécie, entretanto a análise da ritimicidade de expressão dos genes na pesquisa publicada por Costa et al (2016) foi realizada em um único ciclo diário (24h). Segundo Costa et al (2016), juvenis de Tilápias-do-Nilo submetidas ao ciclo claro:escuro e alimentadas apenas no meio da

fase clara apresentaram, em todos os tecidos analisados, ritmos diários para os genes *clock1* e *bmall1*, com acrofase no final da fase clara.

Outros organismos investigados são os mamíferos, como por exemplo, os camundongos, nos quais já foi verificado a presença de proteínas do relógio biológico em todo o organismo do animal (ABRAHAM et al., 2006), bem como a característica circadiana de expressão de tais genes em diversos tecidos e órgãos periféricos como coração, músculo esqueléticos, rins, fígado e pele (STOKKAN et al., 2001; YAMAZAKI et al., 2000). A maioria dos estudos sobre a expressão de genes do relógio tem como modelo biológico o peixe-zebra, nesse peixe já foi demonstrado que os genes *clock*, *bmall1*, *bmal2* e *per1* são expressos ritmicamente em vários tecidos, como no cérebro, olho, fígado, coração, rim e baço (CERMAKIAN et al., 2000). Em outro estudo envolvendo o *peixe-zebra* foi observado a expressão de 17 genes do relógio no músculo esqueléticos, entre esses genes, o *clock1a* e *bmall1* mostraram pico de a expressão em ZT14 (AMARAL; JOHNSTON, 2012). Além disso, nessa espécie foi evidenciado a expressão de genes do relógio circadiano em embriões, mesmo sob condições de escuro (DEKENS; WHITMORE, 2008). Também já foi demonstrado que em culturas *in vitro* de tecidos de células de *peixe-zebra*, a expressão de genes do relógio é regulada pelo ciclo claro: escuro, na ausência da regulação central (WHITMORE et al., 2000).

Costa et al. (2016) demonstraram que a tilápia apresenta um relógio molecular endógeno com características semelhantes ao observado em outros peixes, como medaka (*Oryzias latipes*), peixe dourado (*Sparus aurata*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e peixe-zebra (*Danio rerio*). Foi observado que, tanto no cérebro da medaka e do peixe dourado, como na retina de truta arco-íris e do peixe zebra, os elementos positivos (*clock1a* e *bmall1*) apresentaram pico no final da fase de luz e no início da escura (CUESTA et al. 2014; VERA et al. 2013; LÓPEZ-PATINO et al. 2011; CAHILL 2002). Do mesmo modo, no cérebro de peixe-zebra a expressão do *clock* atingiu o pico na transição LD (claro: escuro) em *zeitgeber* de 12h (ZT12) (WHITMORE et al., 1998). Além disso, os resultados de Costa et al. (2016) são equivalentes ao observado no fígado de peixe dourado (*Sparus aurata*) (VERA et al. 2013), mas, nessa espécie, o *clock1a* e *bmall1* atingiram pico durante as primeiras horas da noite no período de 14h (ZT14). Relacionando com outra espécie de peixe, Velarde

et al. (2009) relataram uma expressão rítmica dos genes do relógio molecular na retina e no fígado em *goldfish* (*Carassius auratus*), sob condições de claro e escuro.

É importante ressaltar os efeitos da alimentação e da exposição à luz na sincronização dos ritmos circadianos, fatores que também podem ter influenciado nossos resultados. Costa *et al*, por exemplo, verificaram influência da alimentação para o *clock1a* no fígado, com deslocamento da acrofase desse gene no grupo de animais alimentados apenas no meio da fase escura (deslocamento de 5:33 h em relação ao grupo alimentado na fase clara). Já o *bmalla* não apresentou ritmo significativo sob essa mesma condição e parece ser mais afetado pela luz. Enquanto isso, no cérebro, não houve diferenças entre os grupos alimentados em fases diferentes. Resultados similares também foram descritos para outras espécies de peixes (VERA et al. 2013; LÓPEZ-OLMEDA et al. 2010).

A correlação entre alimentação e expressão gênica em peixes teleósteos pode ser ainda mais explorada. Betancor et al (2014) analisou a relação entre a expressão de genes do relógio e de genes envolvidos com o metabolismo lipídico no fígado de salmão do Atlântico, onde ele relata que os picos de expressão do *bmal* e do *Ppara* ocorrem de forma sincronizada, sugerindo que a regulação destes dois genes está relacionada. Há ainda um gene vascular (*Pparγ*) que tem como alvo direto o *bmal*, porem não há conhecimento sobre seu papel na regulação do gene.

Em um ciclo de fotoperíodo de dia longo (16h claro: 08h escuro), apenas o *bmalla* exibiu um padrão diário significativo. A acrofase ocorreu 3h antes do fim do período claro (ZT 13). A alimentação ocorreu continuamente, durante o dia e a noite. O *bmalla* tem sido relacionado com a regulação da expressão circadiana de genes no fígado (SCHMUTZ, 2012). De fato, foi demonstrada a regulação circadiana do metabolismo lipídico em roedores, ocorrendo através da via *Rev-erblα*, que influencia a alça positiva do relógio molecular pela repressão do fator de transcrição do BMAL1 (LE MARTELOT, 2009).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, observa-se a expressão circadiana significativa do *clock1a* no fígado de tilápia-do-Nilo, o que está de acordo com estudos nessa e em outras espécies. Os outros genes e tecidos estudados apresentaram tendência circadiana, porém, a questão do número amostral reduzido, além de outras variáveis do experimento (falha na manutenção da temperatura durante os procedimentos de extração e durante o transporte das amostras e reagentes na qPCR) pode ter ocasionado em limitações nas análises e não permitido a obtenção de dados estatisticamente significativos. Também houve perda de algumas amostras o que pode ter aumentado ainda mais o desvio padrão nos gráficos e análises.

Destacamos a importância dos diferentes efeitos dos *zeitgebers* (luz e alimentação) no relógio central e periférico de peixes, alterando o perfil de expressão dos genes circadianos, como já foi discutido anteriormente. Também é necessário ressaltar que há uma independência entre essas regiões (relógio periférico e central), o que pode ser entendido como um mecanismo de adaptação a mudanças ambientais, como a disponibilidade de alimento.

A perspectiva é de que mais estudos consigam consolidar as informações acerca do relógio molecular e a influência dos fatores abióticos na regulação da expressão gênica em tecidos da tilápia-do-Nilo e outros peixes, principalmente aqueles de interesse comercial. Uma vez que a compreensão desse ritmo circadiano e seus componentes moleculares regulatórios pode gerar informações úteis para o desenvolvimento de ferramentas e soluções biotecnológicas, genéticas e de cultivo para a melhoria dos parâmetros de qualidade do produto e quantitativo de produção em fazendas comerciais de aquicultura. Na tilápia esses conhecimentos podem ser revertidos em aumento da velocidade de crescimento dos animais e aumento do ganho de massa muscular (filet, principal produto desta modalidade de produção).

E, além disso, não se limitar ao campo acadêmico, mas buscar a aplicação desses conhecimentos de forma proveitosa para a sociedade como um todo, buscando soluções biotecnológicas (biomoleculares, genéticas, cultivo) para se obter uma melhor qualidade, aumento em quantidade de produção e consequentemente barateamento do principal produto da aquicultura brasileira.

## REFERENCIAS

Amaral, I. P. G. and Johnston, I. A. (2012). **Circadian expression of clock and putative clock-controlled genes in skeletal muscle of the zebrafish**. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 302, 193-206.

Abraham D., Dallman R., Steinlechner S., Albrecht U., Eichele G., Oster H. (2006). **Restoration of circadian rhythmicity in circadian clock-deficient mice in constant light**. Journal of biological rhythms, Vol. 21 No. 3, 169-176.

Cahill G.M. (2002). **Clock mechanisms in zebrafish**. Cell Tissue Res 309:27-34

Betancor, M. B., McStay, E., Minghetti, M., Migaud, H., Tocher, D. R., & Davie, A. (2014). **Daily rhythms in expression of genes of hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)**. PloS one, 9(9), e106739./

Cahill, G. M. (2002). Clock mechanisms in zebrafish. Cell Tissue. 309, 27-34.

Castagnolli, N. (1992). **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: Funep. 189p.

Cecon, E; Flores, D. E. F. L. (2010). **Regulação da expressão gênica nas engrenagens do relógio circadiano de mamíferos**. Rev. Biol., ISSN 1984-5154, DOI 10.7594/revbio.

Cermakian N., Whitmore D., Foulkes N. S., Sassone-Cors P. (2000). **Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function**. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 97, n. 8, p. 4339-4344.

Costa L.S.; Serrano I., et al. (2016). **Circadian rhythms of clock gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) central and peripheral tissues: influence of different lighting and feeding conditions**. J Comp Physiol B DOI 10.1007/s00360-016-0989-x.

Cuesta I.H.; Lahiri K.; López-Olmeda J.F.; LoosII F.; Foulkes N.S.; Vallone D. (2014). **Differential maturation of rhythmic clock gene expression during early development in medaka (*Oryzias latipes*)**. Chronobiol Int 31:468-478

Dekens MP, Whitmore D. (2008). **Autonomous onset of the circadian clock in the zebrafish embryo**. EMBO J. 27:2757-65.

Duffield G. E. (2003). **DNA Microarray Analyses of Circadian Timing: The Genomic Basis of Biological Time**. Journal of Neuroendocrinology Volume 15, Issue 10, Version of Record online: 10 SEP 200

Eknath, A. E., Hulata, G. (2009). **Use and exchange of genetic resources of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. Reviews in Aquaculture. 1, 197–213.

Falcon J. (1999). **Cellular circadian clocks in the pineal**. Progress in Neurobiology 58, 121-162.

Falcon J.; Besseau, L.; Sauzet; S. and Boeuf G. (2007). **Melatonin effects on the hypothalamo pituitary axis in fish**. Trends in Endocrinology and Metabolism 18, 81-88.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2015). **Culture aquatic species information programme *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**.

IBAMA. **Estatística de Pesca 2006 - Brasil: Grande regiões e unidades da federação**. Brasília, 174p, 2008.

KONOPKA, R. J.; Benzer, S. **Clock mutants of *Drosophila melanogaster***. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 68, n. 9, p. 2112–2116, 1971.

Le Martelot G, Claudel T, Gatfield D, Schaad O, Kornmann B, et al. (2009). **REV-ERB alpha participates in circadian SREBP signalling and bile acid homeostasis**. PLoS Biol 7.

Liu C, Hu J, Qu C, Wang L, Huang G, Niu P (2015). **Molecular evolution and functional divergence of zebrafish (*Danio rerio*) cryptochrome genes**. Scientific Reports, v. 5, p. 8113.

López-Olmeda J.F., Noble C., Sánchez-Vázquez F.J. (2012). **Does feeding time affect fish welfare?** Fish Physiol Biochem 38:143–152.

López-Olmeda, J. F., Tartaglione E.V, de la Iglesia H.O., Sánchez-Vázquez, F. J. (2010). **Feeding antrainment of food-anticipatory activity and *per1* expression in the brain and liver of zebrafish under different lighting and feeding conditions**. Chronobiol Int. 38, 143–152.

López-Patiño M.A.; Rodríguez-Illamola A.; Conde-Sieira M.; Soengas J.L.; Míguez J.M. (2011). **Daily rhythmic expression patterns of *Clock 1a*, *Bmal1*, and *Per1* genes in retina and hypothalamus of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*.** Chronobiol Int 28:381–389.

Martín-robles A.J.; Isorna E.; Whitmore D.; Muñoz-Cueto J.A.; Pendón C. (2011). **The clock gene *Period3* in the nocturnal flatfish *Solea senegalensis*: molecular cloning, tissue expression and daily rhythms in central areas.** Comp Biochem Physiol A 159:7–15.

MINISTÉRIO DA AQUICULTURA E DA PESCA – MPA. (2010). **Boletim estatístico da pesca e da aquicultura. Brasília.**

Ng, W. K., Romano, N. (2013). **A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle.** Reviews in Aquaculture. 5, 220–254.

Pereira D. S.; Tufik, S.; Pedrazzoli, M. (2009). **Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos.** Rev. Bras Psiquiatr, São Paulo, n.31, v.1, p.63-71, jul/Nov, 2009.

Reppert, S. M., Weaver, D. R. (2002). **Coordination of circadian timing in mammals.** Nature. 418, 935–41

Richards, J.; Gumz, M.L. (2012). **Advances in understanding the peripheral circadian clocks.** FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v.26, n.9, p.3602-13.

Ripperger, J. A., Jud, C., Albrecht, U. (2011). **The daily rhythm of mice.** FEBS Letters. 585, 1384–1392.

Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM. (2009). **Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data.** Nucleic Acids Res 37: 2009.

Schmutz U, Albrecht JA, Ripperger JA (2012) **The role of clock genes and rhythmicity in the liver.** Mol Cell Endocrinol 349: 38–44.

Stokkan K.A., Yamazaki S., Tei H., Sakaki Y., Menaker M. (2001). **Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding**. *Science* 291: 490-49.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002). **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes**. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.

Vatine G, Vallone D, Yoav Gothilf a, Nicholas S. Foulkes (2011). **It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock**. *FEBS Letters*, v. 585, n. 10, p. 1485–1494,.

Velarde, E., Haque, R., Iuvone, P. M., Azpeleta, C., Alonso-Gómez, A. L., Delgado, M. J. (2009). **Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning and rhythmic expression of Period and Cryptochrome transcripts retina, liver, and gut**. *J Biol Rhythms*. 24, 104–113.

Vera L.M., Negrini P., Zagatti C., Frigato E., Sánchez-Vázquez F.J., Bertolucci C. (2013). **Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*)**. *Chronobiol Int* 30:649–661.

Verani, J. R., (1980). Controle populacional em cultivo intensivo consorciado entre tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) e o tucunaré comum, *Cichla ocellaris* (SCHNEIDER, 1801) – aspectos quantitativos. 116 p.. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais. Departamento de Ciências Biológicas da UFSCar.

Whitmore D, Foulkes NS, Strahle U, Sassone-Corsi P. (1998). **Zebrafish clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators**. *Nat Neurosci*, 1, 701–7.

Whitmore D., Foulkes N.S., Sassone-Corsi P. (2000). **Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock**. *Nature*, Vol. 404, 87-91.

Yamazaki S., Numano R., Abe M., Hida A. Takahashi R., Ueda M., Block G. D., Sakaki Y., Menaker M., Tei H. (2000). **Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats**. *Science* 288, 682-685.

Yvonaldo W.S.B. (2013). **Efeito do fotoperíodo na glicemia, cortisol, parâmetros hematológicos e nos índices reprodutivos de machos de tilápia (*Oreochromis Niloticus*) linhagem gift**. Dissertação de mestrado em ciências animais. Universidade de Brasília Faculdade de agronomia e medicina veterinária.