



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JUCILENE PEREIRA DE SOUSA

**PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) TRANSGÊNICO PARA O GENE *bmal1a*: EFEITOS NO
RELÓGIO MOLECULAR DO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

JOÃO PESSOA

2016

JUCILENE PEREIRA DE SOUSA

PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) TRANSGÊNICO PARA O GENE *bmal1a*: EFEITOS NO
RELÓGIO MOLECULAR DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Nível Mestrado do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis.

Orientador: Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

JOÃO PESSOA

2016

S725p Sousa, Jucilene Pereira de.
 Peixe-zebra (*Danio rerio*) transgênico para o gene bmal la:
 efeitos no relógio molecular do músculo esquelético / Jucilene
 Pereira de Sousa.- João Pessoa, 2016.
 65f. : il.
 Orientador: Ian Porto Gurgel do Amaral
 Coorientadora: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente
 Dissertação (Mestrado) - UFPB/CB
 1. Biotecnologia. 2. Ciclo circadiano. 3. CLOCK:BMAL.
 4. Crescimento muscular. 5. Sobrevivência. 6. Homeostasia.

UFPB/BC

CDU: 60(043)

JUCILENE PEREIRA DE SOUSA

PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) TRANSGÊNICO PARA O GENE *bmal1a*: EFEITOS NO
RELÓGIO MOLECULAR DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Nível Mestrado do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis.

Orientador: Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

Aprovado em 29 de novembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

(Orientador – Departamento de Biologia Celular e Molecular/CBIOTEC/UFPB)



Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

(Examinador Externo – Departamento de Bioquímica/CCB/UFPE)



Prof.^a Dr.^a Adna Cristina Barbosa de Sousa

(Examinadora Interna – Departamento de Biologia Celular e Molecular/CBIOTEC/UFPB)

Aos meus amadíssimos pais, **Juscelino** e **Gorete**, por sempre fazerem de tudo para me deixar confortável, me apoiarem e ajudar nas minhas conquistas. Tudo o que tenho, sou e conquistarei agradeço a vocês, pois o amor recebido é o que me fortalece cada dia mais. Minhas conquistas vos concedo, **sempre!**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **Deus**, com certeza, pois sempre que vou perdendo minhas forças sinto uma energia renascer em mim em meio a toda escuridão que sei que vem de ti Senhor. E, também, pelo dom da vida, fé e sabedoria para concretização desse trabalho.

Aos **meus lindos pais, Juscelino e Gorete**, por todo esforço que sempre fizeram pra que eu pudesse estudar. Ao falar em vocês meu peito se enche de orgulho e agradeço infinitamente a Deus por serem meus pais, os melhores pais. Amo vocês! *“Deus não podia estar em todas partes ao mesmo tempo, e por isso criou as mães e os pais”*.

Aos **meus irmãos: Naína** pela cumplicidade e ombro amigo, como é bom ter duas pessoas em uma só (irmã-amiga) você é essencial pra mim sempre me ajudando a fazer as melhores escolhas. **Janga** pelas gargalhadas, por ter um coração tão generoso e sempre me ajudar com todo carinho do mundo. **Dy** por todo carinho, amor e fraternidade recebido de você sempre. **Dilma** por acreditar no meu potencial e está sempre disposta a ajudar. Vocês são tudo pra mim, pois nos ajudamos apesar da distância, choramos juntos e celebramos nossas conquistas.

Ao meu amado **Levi** por toda força que sempre me deu, me encorajando nos momentos de fraquezas, por sempre querer me agradar, me ver bem, pelas tantas risadas e momentos de descontração compartilhados. Porque é muito bom ter alguém para dividir a vida.

Ao meu **pequeno Gabriel** pelos nossos momentos de descontração e carinho. Me deixa muito feliz ver sua alegria sempre que falo que vou viajar para ver vocês. Ser tia é maravilhoso.

Aos meus queridos avós maternos Vovô Nivaldo e Vóiza (Luiza) e meus avós paternos Vovô Paulino (*in memorian*) e Vómira (Zumira – *in memorian*). **“Penso em vocês, vejo o amor”**.

À **minha família aqui em João Pessoa**: Ana, Pio, Anarita, Islaine e Neto. Vocês foram minha base aqui me dando teto, carinho e amor. Eu realmente me senti em casa com vocês. Tenho tanto a agradecer diante dos momentos de descontração, almoços de domingo e apoio nas horas mais difíceis. Meu amor por vocês é enorme.

A **todos meus familiares** pelo apoio incondicional, estes que sofrem e comemoram junto.

Ao **meu orientador Ian Porto** por ter sido um excelente orientador e professor, pois além de orientar ele foi muito paciente e muitas vezes estava na bancada executando os trabalhos com o grupo. O fascinante é o amor que ele tem por sua profissão, sempre disposto a ensinar. Peça fundamental para concretização desse trabalho, pois mesmo com toda precariedade dos

subsídios à pesquisa científica não mediu esforços para que os trabalhos fossem executados. O carinho, respeito e admiração é grande demais.

Ao **professor Luis Fernando Fernandes Marins** da FURG pela parceria para o desenvolvimento da linhagem transgênica.

A minha **coorientadora Tatjana Keesen** por sempre está disposta a ajudar. O carinho que tenho por você é enorme.

Aos **meus fofos do LABOrA. Marcinha** (a viajante) só vive me abandonando, mas eu sempre perturbando, correndo atrás, por que é incrível a nossa afinidade pois compartilhamos das mesmas coisas. Suportamos e dividimos muitas dores, partilhamos muitos momentos de dificuldades e alegria sempre se amparando uma na outra. Com você do meu lado os problemas se tornam menores, é uma irmandade muito grande. **Anna Ju** (minha menina) por sempre me empolgar e levantar meu astral, por ter sido minha companhia em tantos momentos nesses dois anos, em especial, no experimento do fotoperíodo e nos almoços de todos os dias, você é uma fofa. **Eliza** (soninho) pelo apoio, por nossas conversas, experimentos juntas, foi tudo tão especial. Aos boys: **Rafa** pelo carinho de sempre e atenção, como a gente já riu juntos; **Lucas** pela companhia nas longas horas no microscópio em que sempre saíamos vesgos e em outros momentos também, e **Cayro** que sempre tão prestativo, disposto a ajudar (aquele em que o lab é sua primeira casa). A agregada do lab, **Alba**, pelos risos, almoços e por ser tão prestativa. Como foi especial ter sua companhia louquinha no experimento do fotoperíodo e em tantos outros momentos. Nossa convivência diária, apesar dos atritos, fez eu me apegar muito a vocês. Eu amo vocês e agradeço pelos momentos agradáveis dentro e fora do laboratório.

Aos meus amigos da graduação estes que foram literalmente amigos além da universidade e como a gente sempre dizia “ainda bem que a gente tem a gente”. Em especial as **EngGatas Rhay, Raíssa, Rayza e Dayse** que sempre estão compartilhando experiências, passando ensinamentos, dando conselhos, ajudando nas decisões e não deixando que a distância nos afaste. Vocês de uma forma ou de outra me ajudaram nesses dois anos de mestrado, pois apesar da distância se fizeram sempre presentes. **À Mila**, também, que é um “lar” aqui em JP sempre que preciso. Ao meu amigo **Leandro** (Lelê das meninas) por sempre fazer aquele esforço pra gente se encontrar sempre que vem à PB, pela amizade e carinho. **À Marreiro** que entre tapas e beijos estamos juntos desde a graduação e a gente se ajudou muito no decorrer do mestrado. Quero muito bem a vocês, meu povo!

Aos **colegas de mestrado Isabel, Gabi, Marreiro, Ricardo, Caio e Elton**. Tenho um carinho todo especial por vocês.

À James Buchmeier por estar sempre disposto a ajudar.

Aos **professores que ministraram as disciplinas do programa** contribuindo com minha formação.

Aos **inúmeros laboratórios** para que a realização desse trabalho fosse possível: Lab. De Biotecnologia de Organismos Aquáticos, Lab. de Biotecnologia Celular e Molecular, Lab. de Controle Neural da Circulação e Hipertensão Arterial, Lab. de Imunologia de Doenças Infecciosas, Lab. de Imunofarmacologia, Lab de Biotecnologia Aplicada à Parasitologia e Vetores e Lab. Multiusuário (do DBM/CCEN).

À **secretária do Programa de Pós-Graduação Tânia Alves** pela paciência e disponibilidade.

À **coordenadora do programa Sandra Mascarenhas** por todo apoio e carinho.

Aos **membros da banca examinadora** Adna Cristina Barbosa de Sousa e Ranilson de Souza Bezerra por aceitarem o convite. A contribuição de vocês será muito valiosa, desde já muito obrigada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Centro de Biotecnologia (**CBiotec**) e à Universidade Federal da Paraíba (**UFPB**), fundamentais para realização deste trabalho.

“Agradecer... Oba oba oba ê.” pois **“a gratidão é a memória do coração”**.

*“Só existe uma maneira de se viver para sempre irmão
Que é compartilhando a sabedoria adquirida
E exercitando a gratidão, sempre
É o homem entender que ele é parte do todo
É sobre isso que o manifesto fala
Nem ser menos e nem ser mais, ser parte da natureza, certo
Ao caminhar na contramão disso, a gente caminha
Pra nossa própria destruição.”*

(LENINE)

RESUMO

A maioria dos organismos apresentam ritmos circadianos em torno de um período de 24 horas que são gerados por um mecanismo endógeno, o relógio molecular, que tem a capacidade de sincronizar-se com sinais ambientais. Este mecanismo tem fundamental importância na homeostase dos tecidos que estão sob sua influência. Dentre os genes que compõem a maquinaria do relógio molecular os genes *clock* e *bmal* são os reguladores positivos do mecanismo desse relógio e apresentam expressão com perfil sigmoide em tecido como o músculo do peixe-zebra (*Danio rerio*), participando da ativação de alguns fatores regulatórios miogênicos (MRFs – *myoD*, *myog*, *myf5* e *myf6*), os quais possuem importância para o desenvolvimento e diferenciação do músculo. Apesar deste conhecimento, não se sabe a importância fisiológica do ritmo de expressão circadiana no músculo esquelético de peixes. Neste sentido, o objetivo desse estudo foi investigar a taxa de transferência do transgene para a prole; se a transgenia para o gene *bmal1a* no músculo esquelético interferiu na sobrevivência e crescimento dos peixes; e avaliar se a expressão dos genes *bmal1a*, *clock1a* e MRFs apresentaram diferenças na linhagem transgênica comparada à linhagem não-transgênica (NT). Os fundadores (F0) foram obtidos após a microinjeção do plasmídeo e as larvas positivas foram observadas com coração verde fluorescente. A F1 foi obtida a partir de cruzamentos entre peixes F0 e NT. Da mesma forma, F2 foi obtida a partir da F1, os quais foram utilizados no presente estudo. A análise da expressão gênica das linhagens aos 11 meses de idade foi realizada utilizando a técnica qPCR. A linhagem transgênica foi gerada com sucesso, transmitindo o transgene para a prole seguindo a herança mendeliana. A sobrevivência e crescimento da prole F2 não apresentaram diferenças entre as linhagens, sendo 41,4±0% para a linhagem transgênica e 44,3±6% NT até 30 dpf e 3.7±0.1 cm transgênicos e 3.8±0.2 cm para NT aos 11 meses de idade, respectivamente. Dentre os genes, o *clock1a* e o *myog* apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens com perfil circadiano em peixes NT, sugerindo que *myog* seja um gene controlado pelo relógio. Os demais genes apresentaram expressão constitutiva. De um modo geral, pode-se verificar que a expressão constitutiva do *bmal1a* não apresentou alteração na expressão do relógio molecular, desta forma, não afetou a homeostasia do organismo, a sobrevivência das larvas, bem como não afetou o crescimento.

Palavras-chave: Ciclo Circadiano. CLOCK:BMAL. Crescimento Muscular. Sobrevivência. Homeostasia.

ABSTRACT

Most organisms have circadian rhythms with a periodicity of 24-hour that are generated by an endogenous mechanism, the molecular clock, which has the ability to synchronize biological functions with environmental signals. This mechanism has fundamental importance in the homeostasis of the tissues that are under its influence. Among the genes of the molecular clock machinery, the *clock* and *bmal* are positive regulators of clock mechanism and they present sigmoid expression profile in the skeletal muscle in zebrafish (*Danio rerio*). CLOCK and BMAL participate on the activation of the myogenic regulatory factors (MRFs - *myoD*, *myog*, *myf5* and *myf6*), which are important in the development and differentiation of muscle cells. Despite this knowledge, the physiological importance of circadian rhythm in skeletal muscle of fish is not known. Therefore, the objective of the present study was to produce a zebrafish transgenic lineage that expresses *bmal1a* constitutively in the skeletal muscle to investigate the role of the molecular clock in the muscle. The transfer rate of the transgene to offspring, effect of transgenesis in the survival and fish growth, and expression of the *bmal1a*, *clock1a* and MRFs were investigated. The founding transgenic population (F0) was obtained after microinjection, and positive larvae were observed as specimens which presented green fluorescent heart. F1 was obtained from natural crossings between F0 and NT fish. Likewise, F2 was obtained from F1. F2 transgenic and NT were used in this study. The transgenic lineage was successfully generated with 50% transmission from the transgene to the offspring following a Mendelian model. The analysis of gene expression was made by qPCR. The survival ($41,4 \pm 0\%$ F2 and $44,3 \pm 6\%$ NT) and growth (3.7 ± 0.1 cm F2 and 3.8 ± 0.2 cm NT) of F2 were not statistically different from NT fish. Among the genes, *clock1a* and *myog* presented statistically significant differences between the lineages with circadian profile in NT fish, suggesting that *myog* may be a clock controlled genes. The other genes (*bmal1a*, *myf5*, *myf6*, and *myoD*) presented constitutive expression. In general, it can be verified that the constitutive expression of *bmal1a* did not present change in the expression of the molecular clock, not affecting the homeostasis of the skeletal muscle, survival and growth.

Keywords: Cycle Circadian. CLOCK:BMAL. Muscle Growth. Survival. Homeostasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da maquinaria do relógio molecular em peixe-zebra	20
Figura 2 – Regulação circadiana do <i>myoD</i> pelo relógio molecular em mamíferos	25
Figura 3 – Modelo experimental utilizado no presente trabalho, peixe-zebra, na fase (a) larval com 3dpf e (b) adulta (fêmea)	29
Figura 4 – Representação de pDsRED-Express-DR e pDestTol2CG2 os plasmídeos utilizados para obtenção do plasmídeo final pTol2-cmcl2-GFP-mylz2-bmal1a-Tol2 utilizado para geração da linhagem transgênica.	34
Figura 5 – Microinjeção de embriões de peixe-zebra nos estágios iniciais de desenvolvimento e obtenção da população F0, F1 e F2	36
Figura 6 – Esquema representativo das medidas de comprimento padrão, comprimento da bifurcação e comprimento total para análise do crescimento de peixes-zebra não-transgênicos e transgênicos.....	37
Figura 7 – Imagem de microscopia de fluorescência evidenciando o coração de peixes-zebra (a) não-transgênicos e (b) transgênicos	41
Figura 8 – Comprimento total das linhagens não-transgênicas e transgênicas com 345 dias de idade.....	44
Figura 9 – Expressão gênica dos genes (A) <i>bmal1a</i> e (B) <i>clock1a</i> da alça positiva do relógio molecular em peixes-zebra não-transgênicos e transgênicos no tempo de 20h e 04h	45
Figura 10 – Expressão gênica dos fatores miogênicos (A) <i>myoD</i> , (B) <i>myog</i> , (C) <i>myf5</i> e (D) <i>myf6</i> no músculo esquelético de peixes-zebra não-transgênicos e transgênicos no tempo de 20h e 04h.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados no projeto.....	39
Tabela 2 – Taxa de transferência do transgene para a prole da F2 de peixes-zebra não-transgênicos e transgênicos.....	42
Tabela 3 – Taxa de mortalidade entre peixes-zebra não-transgênicos e transgênicos em diferentes estágios até 30 dpf.....	43
Tabela 4 – Coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> entre as variáveis de medidas de comprimento padrão, comprimento da bifurcação e comprimento total de peixes-zebra não-transgênicos e transgênicos.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix, Period-ARNT-Single-Minded domain</i> (domínio básico hélice-volta-hélice-ARNT-single-minded)
<i>bmal1</i>	<i>brain and muscle ARNT-like protein 1</i>
CCGs	<i>clock controlled genes</i> (genes controlados pelo relógio)
CB	Comprimento da bifurcação
<i>clock</i>	<i>circadian locomotor output cycles kaput</i>
<i>cmcl2</i>	miosina cardíaca de cadeia leve
CP	Comprimento padrão
<i>cry</i>	<i>cryptochrome circadian clock</i>
CT	Comprimento total
dpf	dias pós-fertilização
EGFP	Enhanced green fluorescent protein (proteína verde fluorescente melhorada)
MRFs	<i>Myogenic regulatory factors</i> (fatores regulatórios miogênicos)
<i>myf5</i>	<i>myogenic fator 5</i>
<i>myf6</i>	<i>myogenic factor 6</i>
<i>mylz2</i>	<i>myosin light polypeptide 2</i>
<i>myoD</i>	<i>myogenic differentiation facto</i>
<i>myog</i>	<i>miogenina</i>
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PAS	<i>Period-ARNT-Single-Minded domain</i> (domínio período-ARNT-single minded)
<i>per</i>	<i>period</i>
<i>rora</i>	RAR-related orphan receptor α
TIRs	<i>Terminal Inverted Repeats</i> (sequências terminais invertidas)
ZF-<i>bmal1a</i>	peixe-zebra transgênico para o gene <i>bmal1a</i>
ZF-NT ou NT	peixe-zebra não-transgênico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISAO DA LITERATURA	16
2.1 RELÓGIO MOLECULAR.....	16
2.1.1 Hierarquia de relógios moleculares em mamíferos e peixes	17
2.1.2 Elementos do relógio molecular	17
2.2 IMPORTÂNCIA DO GENE <i>bmal</i> PARA O MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	21
2.3 MIOGÊNESE E A ATIVAÇÃO DE FATORES MIOGÊNICOS PELO RELÓGIO MOLECULAR.....	22
2.4 PROCESSOS FISIOLÓGICOS CIRCADIANOS	25
2.5 PEIXES TRANSGÊNICOS E SUA IMPORTÂNCIA COMO MODELO BIOLÓGICO	26
2.6 PEIXE-ZEBRA (<i>Danio rerio</i>) COMO ORGANSIMO MODELO	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 CULTIVO DO PEIXE-ZEBRA	32
4.2 PRODUÇÃO DO CONSTRUTO CONTENDO O GENE <i>Bmal1a</i> DIRIGIDO PELO PROMOTOR DA MIOSINA ESQUELÉTICA.....	32
4.3 OBTENÇÃO DAS POPULAÇÕES F0, F1 E F2 DE PEIXES-ZEBRA TRANSGÊNICOS E DETERMINACAO DA TAXA DE TRANSFERÊNCIA DO TRANSGENE.....	34
4.4 ANÁLISE DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DA F2	37
4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DO RELÓGIO MOLECULAR E MRFs	37
4.5.1 Extração do RNA total e síntese de cDNA	38
4.5.2 PCR em tempo real	38
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5 RESULTADOS	41
5.1 PORCENTAGEM DE TRANSGENIA DOS FUNDADORES E OBTENÇÃO DA POPULAÇÃO F1	41
5.2 TAXA DE TRANSFERÊNCIA DO TRANSGENE DA POPULAÇÃO F1 PARA F2....	41
5.3 TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DA POPULAÇÃO F2 DE PEIXES-ZEBRA TRANSGÊNICOS E NT	42

5.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA POPULAÇÃO F2 DE PEIXES-ZEBRA TRANSGÊNICOS E NT	43
5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DO RELÓGIO MOLECULAR E DOS FATORES REGULATÓRIOS MIOGÊNICOS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DA POPULAÇÃO F2 DE PEIXES-ZEBRA TRANSGÊNICOS E NT	45
6 DISCUSSÃO	47
6.1 GERAÇÃO DAS POPULAÇÕES TRANSGÊNICAS F0, F1 E F2 TRANSGÊNICA E AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO	47
6.2 EXPRESSÃO DE GENES DO RELÓGIO MOLECULAR E MRFs NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LINHAGENS DE PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICOS E NT	49
7 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÊNDICE A – Curva de melt (dissociação) dos genes do relógio e fatores miogênicos	63

1 INTRODUÇÃO

Os seres vivos estão sob a influência constante de alterações diárias e sazonais resultantes da rotação do planeta e sua órbita ao redor do sol. Este padrão periódico, mais proeminentemente percebido pelo ciclo claro/escuro, levou ao estabelecimento de sistemas de temporização circadianos endógenos que sincronizam funções biológicas às condições do ambiente (ALBRECHT; EICHELE, 2003). A regulação circadiana é crucial para a saúde do organismo com capacidade de sincronizar processos bioquímicos e fluxos metabólicos com o ambiente externo, permitindo que o organismo funcione de maneira eficaz em resposta aos desafios fisiológicos previsíveis (MAZZOCCOLI; PAZIENZA; VINCIGUERRA, 2012). O ritmo e o período de processos biológicos circadianos são regulados por um mecanismo complexo de relógio molecular altamente conservado em todo o reino animal. Este mecanismo tem fundamental importância na homeostase de células e tecidos que estão sob sua influência (PEREIRA; TUFIK; PEDRAZZOLI, 2009), e apresenta um papel fisiológico importante na regulação da homeostase da massa muscular a partir dos fatores regulatórios miogênicos (ANDREWS et al., 2010; AMARAL; JOHNSTON, 2011), sendo assim interrupções no ritmo circadiano pode ser prejudicial para o organismo.

O tecido muscular de peixes é o principal produto da indústria da aquicultura, sendo de interesse o estudo dos mecanismos moleculares que influenciam seu desenvolvimento e crescimento. Dentre os modelos experimentais, o peixe-zebra (*Danio rerio*), tropical de água doce, vem sendo inserido na comunidade científica com utilização em estudos em diversas áreas de pesquisa (ARUNACHALAM et al., 2013) pelo fato de apresentar alta reprodução em um curto período de tempo e facilidade de visualização da expressão de genes repórteres em linhagens transgênicas por possuírem embriões transparentes. Nesse contexto, a construção desse trabalho surgiu diante da necessidade de averiguar a importância do gene *bmal1a* no relógio molecular do músculo esquelético do peixe-zebra, a partir de modificações na expressão do gene *bmal1a* desse organismo, uma vez que a importância do relógio molecular para a fisiologia desse tecido em peixes não está elucidada. Nisso, investigar a expressão constitutiva do gene supracitado poderá nos ajudar a compreender a importância do relógio molecular periférico na homeostasia do músculo esquelético em peixes teleósteos, visando o melhor entendimento dos fatores moleculares que influenciam o crescimento muscular em peixes.

2 REVISAO DA LITERATURA

2.1 RELÓGIO MOLECULAR

Grande parte dos seres vivos são submetidos a ciclos diários de luz e temperatura devido ao movimento de rotação da Terra em torno do seu próprio eixo. No decorrer da evolução, os organismos evoluíram desenvolvendo estratégias fisiológicas e comportamentais que permitissem adaptarem-se às variações ambientais. Desta forma, diversas espécies passaram a apresentar oscilações diárias de respostas biológicas à luz, temperatura, pressão com um período próximo a 24 horas, em que essas oscilações foram denominadas de “ritmos circadianos”. Esta periodicidade de atividade biológica é gerada por um mecanismo endógeno, o relógio molecular, o qual tem a capacidade de sincronizar-se com fatores externos gerando o ritmo circadiano endógeno. Os relógios circadianos (*circa diem*: “cerca de um dia”) controlam uma grande variedade de processos fisiológicos e comportamentais importantes para a sobrevivência, como padrões de sono e metabolismo. Fatores ambientais como luz, alimentação, temperatura e pressão foram denominados de *zeitgebers*. O *zeitgeber* é definido como um sincronizador que arrasta os ritmos biológicos em sua periodicidade, amplitude e fase, sendo capazes de controlar esses ritmos. Todavia esses ritmos podem, também, ser apenas caracterizados endogenamente (TAKAHASHI, 1995; PEREIRA; TUFIK; PEDRAZZOLI, 2009). Dos fatores citados, as variações diárias e sazonais da luz visível, claro/escuro (fotoperíodo) (EDERY, 2000; CHALLET et al., 2003; KORF; VON GALL, 2006) e a temperatura (EDERY, 2000) são os sinais ambientais sincronizadores mais importantes na natureza, como já descrito em cianobactérias, fungos, plantas verdes, metazoários, peixe-zebra e ser humano (EDERY, 2000; DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010).

O sistema de temporização circadiana é normalmente composto por três partes interligadas: recepção de sinais ambientais (vias aferentes), o relógio molecular (marca-passo), e as respostas aos sinais ambientais (vias eferentes). A informação dos ciclos ambientais é transmitida ao relógio endógeno por vias aferentes. O relógio uma vez sincronizado passa a informação para outras partes do organismo por meio de vias eferentes gerando ritmos sincronizados de resposta biológica (TAKAHASHI, 1995; EDERY, 2000; ALBRECHT, 2012; BUHR; TAKAHASHI, 2013).

2.1.1 Hierarquia de relógios moleculares em mamíferos e peixes

O sistema circadiano de mamíferos engloba todos os órgãos, tecidos e células, tendo o cérebro uma posição especial, pois é nesse órgão que localiza-se o núcleo supraquiasmático (NSQ) (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010), no qual encontra-se o relógio central responsável por sincronizar e coordenar os ciclos biológicos periféricos. Os relógios periféricos estão presentes em outros órgãos, como o fígado, intestino e coração (REPPERT; WEAVER, 2002). No peixe-zebra, ainda não existem evidências diretas para um relógio central como observado em mamíferos e é possível que não exista um marca-passo central neste organismo. Na hipótese de não haver um relógio molecular central, o sistema molecular circadiano seria composto por vários marca-passos distribuídos pelo animal, os quais seriam independentemente sincronizados pela luz ou outros fatores ambientais (CAHILL, 2002).

Nos mamíferos, a entrada da luz para o relógio é percebida por um conjunto de células fotossensíveis do gânglio retinal nos olhos (VATINE et al., 2011; ALBRECHT, 2012). A informação fótica atinge o oscilador fótico no NSQ a partir do trato retino-hipotalâmico, induzindo a transcrição de genes do relógio e sincronizando a atividade rítmica neuronal (MAYWOOD et al., 2007). Os sinais do NSQ regulam a atividade de muitos outros alvos como a síntese da melatonina durante a noite pela glândula pineal (KORF; VON GALL, 2006). Nos peixes, a glândula pineal contém um relógio circadiano intrínseco que dirige a síntese rítmica do hormônio melatonina, visto que a pineal de peixes são células fotorreceptoras com semelhanças estruturais e funcionais para fotorreceptores da retina (VATINE et al., 2011). Em resumo, ritmos moleculares circadianos de mamíferos são controlados quase que exclusivamente pelo NSQ e em vertebrados inferiores, como o peixe-zebra, a glândula pineal possui um relógio endógeno responsável pela biossíntese da melatonina e expressão gênica (NOCHE et al., 2011), mas que não necessariamente é o relógio central do organismo.

2.1.2 Elementos do relógio molecular

Os elementos centrais de um relógio são designados como genes dos quais seus produtos proteicos são fundamentais para a geração e regulação dos ritmos circadianos nas células (TAKAHASHI, 2004). As primeiras evidências do relógio circadiano foram publicadas em 1971 e o gene *per* foi o primeiro a ser descrito. Para tanto, submeteram a *Drosophila melanogaster* a mutagênicos químicos e, posteriormente, isolaram três mutantes que exibiam

padrões atípicos nos ritmos de emergência de pupas e de insetos adultos. As mutações foram mapeadas em um mesmo locus chamado de *period*, e os mutantes foram denominados de *pershort* (*pers*), linhagem com período menor do que 24h, *perlong* (*perl*), linhagem com período maior do que 24h, e *per01* para a linhagem arritmica (KONOPKA; BENZER, 1971).

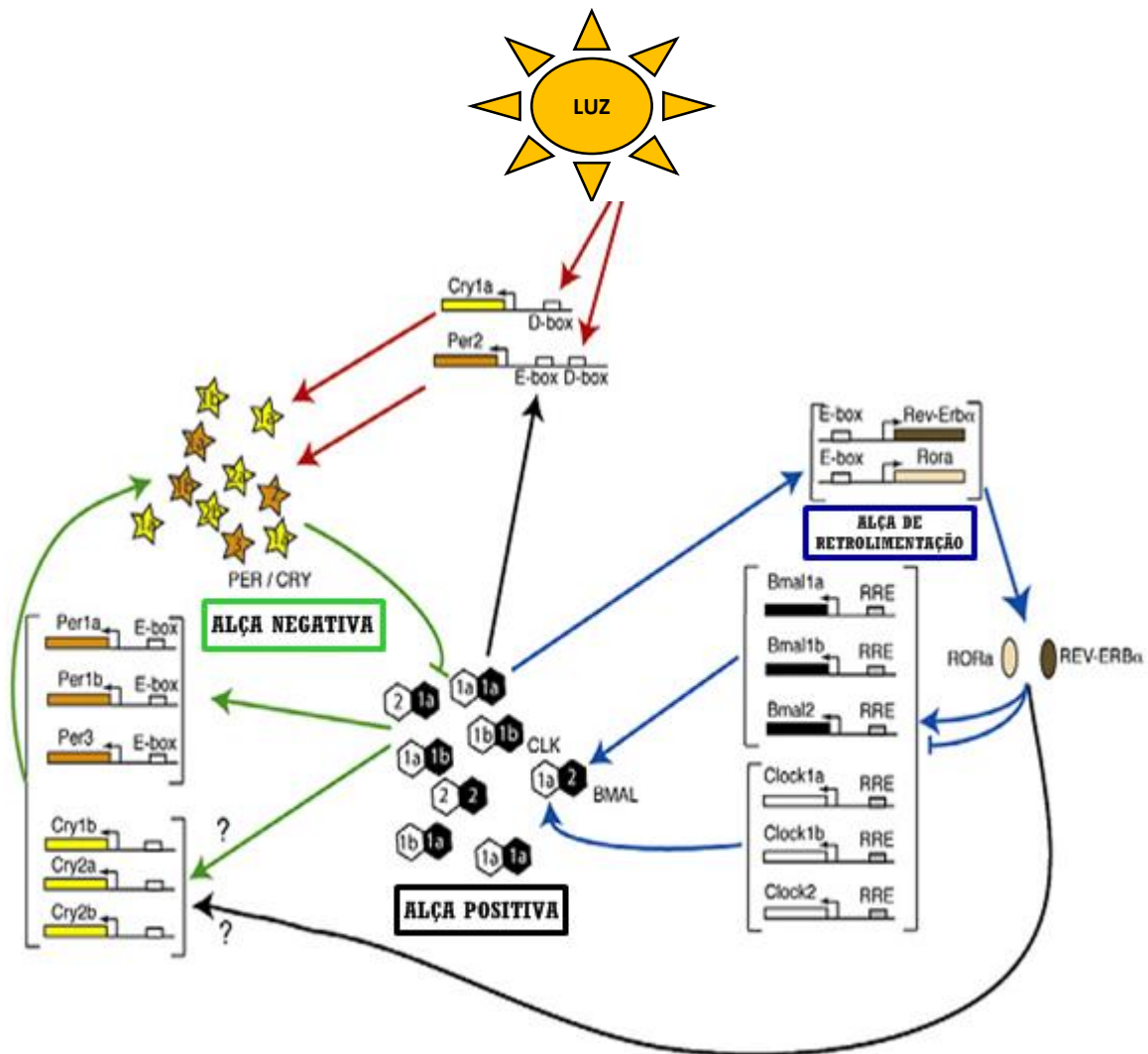
Os genes do relógio molecular codificam fatores de transcrição que interagem para sincronizar e controlar este relógio (CERMAKIAN et al., 2000). De um modo geral, o mecanismo do relógio molecular é baseado em processos de transcrição, tradução e interações entre proteínas e proteína-DNA, em que fatores de transcrição podem estimular ou inibir a síntese de transcritos (CECON; FLÔRES, 2010). Os fatores de transcrição que estimulam a síntese de transcritos são considerados elementos positivos do mecanismo, enquanto que aqueles que inibem são considerados elementos negativos. Após a transcrição e a tradução, as proteínas codificadas por esses genes migram para o núcleo (processo de translocação) e funcionam como elementos positivos, interagindo e ativando os genes codificantes dos elementos negativos, enquanto que os elementos negativos formados translocam-se para o núcleo e inibem a atividade dos elementos positivos, diminuindo-se assim a expressão dos próprios genes do relógio.

Nos vertebrados, o relógio circadiano é regulado por elementos positivos, CLOCK (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) e BMAL (*Brain and Muscle ARNT-like protein*) que dirigem a expressão de elementos negativos, *per* (*period*), *cry* (*cryptochrome*) e dos elementos da alça auxiliar *rora* (RAR-related orphan receptor α) e *rev-erba*, que por sua vez regulam negativamente a expressão desses fatores positivos, funcionando como um sistema de retroalimentação negativa, permitindo o início de um novo ciclo, com exceção da proteína codificada pelo *rora* que ativa a expressão do *bmal* (REPPERT; WEAVER, 2002; VATINE et al., 2011). Diante de um estímulo, *clock* e *bmal* são transcritos e traduzidos em proteínas no citoplasma e o domínio PAS (*Period-ARNT-Single-Minded*) permite que essas proteínas interajam formando o heterodímero CLOCK:BMAL. O domínio bHLH (*basic Helix-Loop-Helix, Period-ARNT-Single-Minded*) lhe garante a capacidade de se ligar aos elementos *E-box* (CACGTG) localizados nos promotores dos genes *per*, *cry*, *rora* e *rev-erba*. Além de controlar positivamente a expressão de elementos do relógio molecular, o heterodímero CLOCK:BMAL também é capaz de ligar-se à região promotora de genes controlados pelo relógio (CCGs), que, em última análise, são os elementos responsáveis pela resposta biológica. CLOCK:BMAL liga-se aos elementos *E-box* da região promotora de *per* e *cry*, e induz sua transcrição (JETTEN, 2009; MAYEUF-LOUCHARTE; STAELS; DUEZ, 2015). Após a tradução no citoplasma, as proteínas PER e CRY são dimerizadas e translocadas para o núcleo, em que ao atingir um nível

elevado interagem fisicamente e inibem a ativação da transcrição dirigida pelo complexo CLOCK:BMAL (REPPERT; WEAVER, 2002; HIROTA; FUKADA, 2004; JETTEN, 2009; VATINE et al., 2011). Paralelamente, o heterodímero CLOCK:BMAL inicia outra alça de retroalimentação para ativação da transcrição do gene *rev-erba* e *rora*. As moléculas de mRNA migram para o citoplasma e o RNA é traduzido em proteínas. Suas respectivas proteínas, REV-ERB α e ROR α , competem pela ligação ao elemento responsivo RORE (ROREs – *Retinoic Acid-Related Orphan Receptor Response Element*), presente no promotor do gene *bmal*, desempenhando ações antagônicas: ROR α ativa a transcrição de *bmal* enquanto que REV-ERB α a inibe (GUILLAUMOND et al., 2005; KO; TAKAHASHI, 2006; GEYFMAN et al., 2012). O aumento da concentração de *bmal* promove a sua própria inibição da transcrição por meio do aumento dos níveis do gene *rev-erba*, *per* e *cry*. Logo, quando as proteínas REV-ERB α , PER e CRY estão ausentes a transcrição do gene *bmal* é então liberada, ocorrendo novamente a formação do heterodímero CLOCK:BMAL com reinício de um novo ciclo. Esses eventos, em conjunto, levam cerca de 24h para se completarem e a concentração física dessas diferentes proteínas é o que constitui a base molecular do relógio biológico, em que o nível de expressão dos genes variam dependendo do período do dia, com ativação da transcrição dos genes *per* e *cry* por CLOCK:BMAL nas primeiras horas do período claro. O mecanismo do relógio molecular do peixe-zebra pode ser melhor compreendido a partir da Figura 1.

Uma das características do mecanismo do relógio molecular em alguns organismos é a presença de cópias (denominados parálogos) de genes-chave do relógio (VATINE et al., 2011), os quais podem desempenhar funções distintas. Com algumas exceções, a fase de expressão desses genes duplicados ao longo da evolução tem sido largamente conservadas (LI et al., 2013). Por exemplo, o relógio molecular no peixe-zebra é constituído por 3 parálogos do gene *bmal* – o *bmal1a*, *bmal1b* e o *bmal2* –, por 3 do *clock* – o *clock1a*, *clock1b* e o *clock2* –, 6 do *cry* – o *cry1a*, *cry1b*, *cry21*, *cry2b*, *cry3* e o *cry4* – e 4 do *per* – *per1a*, *per1b*, *per2* e o *per3*. Pode ser verificado ainda a partir da Figura 1 que os genes *cry1a* e *per2* além de serem ativados pelo heterodímero CLOCK:BMAL1 são, também, ativados pela luz. Além do mais, existem algumas diferenças nas expressões dos parálogos do peixe-zebra, visto que o *bmal1* deste teleósteo, por exemplo, liga-se mais firmemente ao *clock* do que o *bmal2*, enquanto *bmal2* é mais potente quanto a ativação da transcrição do que *bmal1*, indicando que as duas proteínas podem exercer funções circadianas distintas (CERMAKIAN et al., 2000). Com isso, podemos asseverar que o mecanismo do relógio circadiano em peixes é mais complexo do que em mamíferos, pelo fato de existirem múltiplas cópias dos genes que compõem esse relógio (VATINE et al., 2011), algumas com características distintas entre si.

Figura 1 – Representação da maquinaria do relógio molecular em peixe-zebra.



Fonte: Adaptado de Vatine et al. (2011).

O heterodímero CLOCK:BMAL se liga aos elementos *E-box* e conduz a expressão rítmica dos genes *per* e *cry*. O heterodímero PER:CRY é então formado e iniciada a alça de retroalimentação negativa com a translocação do heterodímero PER:CRY para o núcleo e, após atingir determinada concentração, inibe a ação do heterodímero CLOCK:BMAL. Os níveis de mRNA e de suas respectivas proteínas, PER e CRY, vão decrescendo e param de inibir a atividade do heterodímero CLOCK:BMAL. Os parálogos *per2* e *cry1a* são também ativados pela luz. Enquanto isso, outra alça de retroalimentação é ativada pelo heterodímero CLOCK:BMAL a partir da ativação da transcrição dos genes *Rev-Erba* e *Rora*. As proteínas desses genes desempenham funções antagônicas ao se ligarem ao componente responsivo ao ROR (RORs), presente no promotor de *bmal1*: RORα ativa a transcrição de *bmal1* e REV-ERBα a inibe. O aumento da concentração da proteína BMAL promove a inibição da transcrição do seu gene *bmal* por meio do aumento dos níveis de REV-ERB, PER e CRY, as quais por conseguinte são inibidas por seus respectivos genes por não serem ativados pelo complexo CLOCK:BMAL devido a diminuição da formação do dímero, reiniciando um novo ciclo.

A interrupção do ritmo biológico pode afetar o bem-estar e desencadear diversas doenças como depressão, problemas cardíacos, insônia e câncer (HUNT; SASSONE-CORSI, 2007). De acordo com Sato et al. (2004), ratos com mutações no gene *rev-erba* expressam

constitutivamente níveis elevados de *bmal1* causando encurtamento nos ritmos da atividade. Curiosamente, enquanto que tanto *clock* quanto *bmal* apresentam expressão rítmica do mRNA destes genes em tecidos adultos, esta expressão está ausente nos estágios embrionários iniciais, evidenciando que nesses estágios iniciais não há apenas a criação do relógio, mas também a sincronização desses relógios por *zeitgebers*, tais como a luz (VATINE et al., 2011).

2.2 IMPORTÂNCIA DO GENE *bmal* PARA O MÚSCULO ESQUELÉTICO

Interrupções no ritmo circadiano pode ser prejudicial para a homeostase do músculo esquelético (ANDREWS et al., 2010). Estudos indicam que alterações no relógio por meio de deleção ou mutação de seus componentes induzem defeitos no músculo esquelético os quais estão associados a distúrbios metabólicos (MAYEUF-LOUCHART; STAELS; DUEZ, 2015). Dentre os genes do relógio molecular, Chatterjee e colaboradores (2013) demonstraram que o *bmal1*, altamente expresso no músculo esquelético, possui expressão à noite (período escuro), uma vez que os seus picos de expressão foram observados durante a fase escura tanto no bacalhau Atlântico (LAZADO et al., 2014) quanto no peixe-zebra (AMARAL; JOHNSTON, 2011). Esse gene é um regulador positivo chave para promover a diferenciação miogênica, a partir da ativação de genes do músculo esquelético ao se ligar aos elementos *E-box* presentes na região promotora desses genes (CHATTERJEE et al., 2013). Entretanto não se sabe de fato como ele participa do crescimento do músculo esquelético (CHATTERJEE et al., 2013; CHATTERJEE; MA, 2016).

Estudos demonstraram que a indução da perda da expressão de *bmal1a* causada por mutação nula induzida em ratos denominados *bmal1-null* (*bmal1*^{-/-}) no músculo causou redução da massa muscular total, com diminuição do diâmetro da fibra muscular em músculos dos membros, com uma maior frequência de fibras de diâmetros menores. Os autores sugerem que *bmal1* seja importante para o crescimento do músculo na fase pós-natal ou na manutenção da massa muscular nesta fase. O *bmal1-null* não apresentou efeito no músculo cardíaco, uma vez que o peso dos corações foi semelhante em ratos controle, sugerindo que a função deste gene no crescimento muscular é específica para o músculo esquelético (CHATTERJEE et al., 2013). Perda da expressão do *bmal1* no músculo provoca, também, mudanças significativas nos ossos e cartilagens em todo o corpo, demonstrando a importância do relógio molecular na regulação sistêmica (SCHRODER et al., 2015). Goljanek-Whysall e colaboradores (2016)

sugerem, também, que *bmal1* possua papel importante na manutenção do músculo esquelético, bem como no envelhecimento.

2.3 MIOGÊNESE E A ATIVAÇÃO DE FATORES MIOGÊNICOS PELO RELÓGIO MOLECULAR

O relógio circadiano constitui-se um mecanismo regulatório chave para a fisiologia do músculo (CHATTERJEE; MA, 2016) a partir de genes que não fazem parte de sua maquinaria, mas que são diretamente controlados por ele, denominados de genes controlados pelo relógio (CCGs, do inglês *clock controlled genes*). Os CCGs são regulados de forma direta mediante a ligação do heterodímero CLOCK:BMAL1 aos elementos *E-box* presentes na sua região promotora, sendo responsáveis pela codificação de proteínas que irão conferir uma atividade biológica com ritmo circadiano (ALBRECHT, 2012; CHATTERJEE; MA, 2016).

A miogênese é o processo de formação do músculo e pode ser dividido em duas fases: determinação e diferenciação. A determinação é o evento em que as células pluripotentes se multiplicam transformando-se em mioblastos. O processo de formação do músculo esquelético em vertebrados é bastante organizado, envolvendo diversos eventos como adesão celular, migração e interação célula-célula com início de desenvolvimento na fase embrionária em compartimentos celulares denominados de somitos, os quais são encontrados em pares ao longo do eixo do corpo e separados pela notocorda e tubo neural (BUCKINGHAM et al., 2003; MAYEUF-LOUCHART; STAELS; DUEZ, 2015). O músculo esquelético é derivado de somitos, com exceção de alguns músculos da cabeça que provavelmente devem surgir da mesoderme cefálica (XU et al., 2000). A quantidade de fibras musculares é determinada na fase embrionária e também nessa fase os somitos sofrem compartimentalizações, dando origem aos mioblastos (BUCKINGHAM et al., 2003; MAYEUF-LOUCHART; STAELS; DUEZ, 2015). Os mioblastos são mononucleados e caracterizados pela expressão de membros da família dos Fatores Regulatórios Miogênicos (MRFs, do inglês *Myogenic regulatory factors*) que são eles: o *myoD* (*myogenic differentiation factor*), o *myf5* (*myogenic fator 5*), o *myf6*/MRF4 (*myogenic fator 6*) e o *myog* (*miogenina*) (BERKES; TAPSCOTT, 2005; BISMUTH; RELAIX, 2010; MAGUIRE; ISAACS; POWNALL, 2012). O tecido muscular esquelético embrionário é regulado pela expressão de *myoD* e *myf5*, sendo fatores determinantes da linhagem muscular primária, com função parcialmente redundante para estabelecer a identidade de células progenitoras musculares (WOOD et al., 2013). Pesquisas mostraram que o músculo esquelético

em ratos desenvolve-se relativamente de forma normal sem *myoD* ou *myf5*. No entanto, a interrupção da expressão de ambos genes resulta na ausência de células do músculo esquelético, o que indica que estes genes são necessários para estabelecer uma linhagem muscular viável (RUDNICKI et al., 1993). Peixes-zebra com gene *myoD* mutante não têm a capacidade de se alimentarem e morrem durante o período larval (HINITIS et al., 2011). O *myoD* possui ritmo circadiano em camundongos, sugerindo que seja um CCG sob o controle transcricional direto de CLOCK:BMAL, com regulação morfológica e funcional do músculo deste organismo, Figura 2 (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011). A modificação do relógio molecular afeta a expressão do *myoD* em camundongos, o que resulta na diminuição da força de tensão das fibras musculares e na capacidade respiratória do tecido (ANDREWS et al., 2010). Em peixe-zebra não foi encontrada nenhuma evidência de expressão circadiana de *myoD*, sendo que o gene *myf6* apresentou perfil circadiano no músculo esquelético, evidenciando que esse fator miogênico é diretamente controlado pelo relógio molecular (AMARAL; JOHNSTON, 2011). A capacidade de *myoD* para converter os fibroblastos e outros tipos de células no músculo esquelético indicou fortemente que pode ter um papel central na miogênese e estudos subsequentes têm procurado determinar o seu papel biológico no desenvolvimento (TAPSCOTT, 2005).

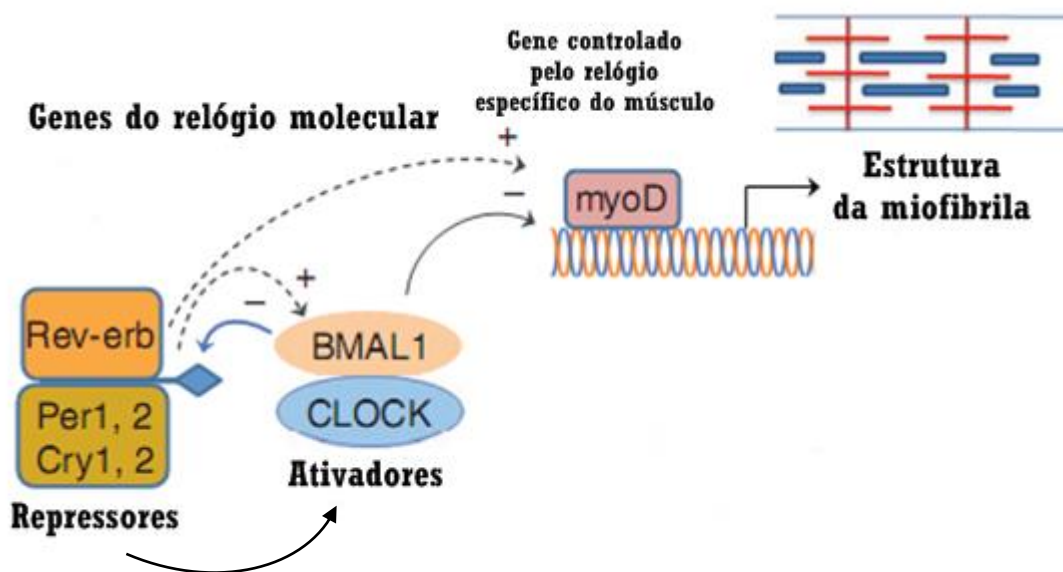
Os mioblastos que saem do período do ciclo celular, que expressam *myf5* e *myoD*, tornam-se miócitos diferenciados e iniciam a expressão dos MRFs *myog* e *myf6*, os quais são fundamentais para regulação da diferenciação dessas células em fibras musculares (MEGENEY; RUDNICKI, 1995). Acredita-se que *myoD* possua importância tanto na determinação quanto na diferenciação do músculo esquelético (BERKES; TAPSCOTT, 2005; MAGUIRE; ISAACS; POWNALL, 2012). Na diferenciação, os mioblastos irão proliferar e migrar para locais específicos, se diferenciando em miotubos, agrupando-se e formando as fibras musculares (BUCKINGHAM et al., 2003). Em peixe-zebra, as células dos somitos diferenciam-se em miotómo constituído, basicamente, de quatro fibras musculares que são as células musculares pioneiras, músculo lento, músculo rápido e músculo intermediário (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011). Músculos de contração lenta consistem na maioria das fibras oxidativas, contendo grande quantidade de mitocôndrias, com função de oxidar lipídios e glicose. Estão envolvidos em exercícios de baixa intensidade com resistência e longa duração. Em contraste, os músculos de contração rápida são compostos, principalmente, por fibras glicolíticas e estão envolvidos em exercícios de curta duração e alta intensidade (MAYEUF-LOUCHART; STAELS; DUEZ, 2015). As fibras lentas, nas primeiras horas após

a formação do somito, surgem a partir de células adaxiais adjacentes e as fibras rápidas a partir de células somíticas laterais (DEVOTO et al., 1996).

O *myog* e o *myf6* têm funções cooperativas com *myoD* e *myf5*, e são reguladores de fatores de transcrição de proteínas contráteis do músculo (LASSAR et al., 1991). O *knockdown* de *myoD* e *myf5* inibe a expressão de *myog* causando ablação das fibras de contração rápida. Mutações nulas em *myog* é letal devido a uma falha na diferenciação terminal de uma grande proporção de mioblastos em alguns músculos (HINITTS et al., 2009), além do mais alguns autores reportaram que embriões de ratos deficientes em *myog* morrem no período perinatal devido à falha na diferenciação dos miócitos, evidenciada pela quase total ausência de fibras musculares nesses mutantes (HASTY et al., 1993; NABESHIMA et al., 1993). *Myf5* mutantes morrem durante o crescimento das larvas, enquanto *myf6* mutantes são viáveis. Fibras de músculo lento e rápido necessitam de *myf5* ou *myoD* para que ocorra a miogênese, uma vez que a miogênese lateral é dirigida apenas pelo *myoD*. *Myf6* não controla o início da miogênese no peixe-zebra, sendo expresso tardiamente como o *myog*, com papel importante no comprometimento muscular, uma vez que não foi observada início do processo de miogênese por *myf6* na ausência de *myf5* e *myoD* (HINITTS et al., 2009; ROSSI, MESSINA, 2014). O *myf6* possui papel importante no alinhamento das fibras do músculo em peixe-zebra, fator este confirmado a partir da técnica de *knockdown* por morfolino com fibras musculares altamente desordenadas (WANG et al., 2008).

O músculo esquelético é um tecido altamente complexo e heterogêneo servindo para uma multiplicidade de funções no organismo (BENTZINGER; WANG; RUDNICKI, 2012), sendo sua principal função produzir força e possibilitar a locomoção, além do mais é utilizado como reserva de aminoácidos a partir de proteínas sarcoméricas, permitindo assim a manutenção da síntese de proteína em outros tecidos (HARFMANN; SCHRODER; ESSER, 2015). Em peixes, grande parte da massa do corpo é composta por tecido muscular constituindo 60% do corpo de peixes teleósteos adultos (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011) sendo a proporção desse tecido bem maior do que em outros vertebrados, uma vez que em mamíferos constituem 40% do corpo. É, também, um grande órgão metabólico altamente sensível à insulina (MAYEUF-LOUCHART; STAELS; DUEZ, 2015). A atividade locomotora é a função essencial do músculo esquelético para todas as espécies de animais e está sob controle direto do relógio circadiano a partir dos ciclos de sono-vigília, sendo essa interação entre o relógio e a fisiologia do músculo esquelético um evento evolutivamente conservado para garantir a sobrevivência (CHATTERJEE; MA, 2016).

Figura 2 – Regulação circadiana do *myoD* pelo relógio molecular em mamíferos.



Fonte: Adaptado de Johnston, Bower e Macqueen (2011).

O relógio molecular possui genes denominados de *bmal1* e *clock*, que além de ativarem os próprios genes do relógio como *Rev-erb*, *Per1,2* e *Cry1,2* (genes que possuem a função de inibir o gene *bmal1*) possuem a função de ativar a transcrição de genes presentes em diversos tecidos do organismo, como é o caso do gene *myoD*. Esse gene possui papel importante para regulação da miogênese e é regulado pelo dímero CLOCK:BMAL em mamíferos (ANDREWS et al., 2010).

Nesse âmbito, o *myl2* constitui-se como um excelente marcador para avaliar o desenvolvimento do músculo esquelético. O mRNA do *myl2* é especificamente expresso no músculo esquelético (XU et al., 1999, 2000), com expressão limitada aos precursores do músculo de contração rápida e detectado apenas nas células musculares profundas no somito, não sendo expresso no músculo de contração lenta (JU et al., 2003). É expresso, também, em botões das nadadeiras e músculos da cabeça, incluindo olhos, mandíbula e músculos das gelras (JU et al., 2003). O músculo esquelético, como praticamente todas as células do corpo, tem ritmos circadianos (ANDREWS ET AL., 2010) e sua principal função é regular o tempo dos processos fisiológicos e metabólicos de acordo com as condições ambientais (HODGE et al., 2015).

2.4 PROCESSOS FISIOLÓGICOS CIRCADIANOS

O sistema circadiano no peixe-zebra tem sido reconhecido como sendo altamente descentralizado, isto é, não possui um relógio central, com relógios circadianos distribuídos em diversos tecidos e diretamente sensíveis a luz (WHITMORE; FOULKES; SASSONE-CORSI,

2000). *Clock1a* e *bmal1a*, genes que compõem a alça positiva do relógio molecular, são fundamentais para ativação de CCGs com importância na homeostasia de tecidos como o músculo (CHATTERJEE; MA, 2016), sendo assim organismos podem controlar seu comportamento fisiológico a partir de ritmos circadianos (LI et al., 2013).

A ritmicidade circadiana na atividade locomotora de peixe-zebra mantido em condições constantes demonstra que o comportamento nessa espécie é regulado pelo relógio molecular. Alguns autores verificaram que quando mantidos em ambientes de luz ou escuro constante há uma redução na atividade locomotora, indicando que a luz é capaz de regular a atividade locomotora (HURD et al., 1998). Em condições de fotoperíodo claro:escuro, a atividade locomotora é alta no período claro e baixa no período escuro (BLANCO-VIVES; SÁNCHEZ-VÁSQUEZ, 2009; ESCH et al., 2012). A diminuição da atividade locomotora do peixe-zebra no período escuro é devido a resposta à produção de melatonina (ZHDANOVA, 2001). Para algumas espécies submetidas a fotoperíodos longos, o crescimento pode indiretamente ser alterado ao provocar um aumento na ingestão de alimentos, além do mais pode proporcionar um aumento na massa muscular a partir do aumento da atividade locomotora (BOEUF; BAIL, 1999). Outro fato que acontece com os animais que são submetidos a condições constantes é que exibem um comportamento denominado de atividade antecipatória alimentar (AAA) ao passo que o alimento é fornecido no mesmo horário diariamente. Resultando em um aumento da atividade locomotora pouco tempo antes do horário da alimentação (MISTLBERGER, 1994). O peixe-zebra tem apresentado essa habilidade de sincronizar seu comportamento e fisiologia ao horário da alimentação. De um modo geral o relógio circadiano sincroniza processos comportamentais e fisiológicos, uma vez que a atividade locomotora é tida como um *zeitgeber* sincronizador (PEEK et al., 2015).

2.5 PEIXES TRANSGÊNICOS E SUA IMPORTÂNCIA COMO MODELO BIOLÓGICO

O surgimento da biologia molecular foi certamente um dos maiores passos das ciências biológicas e biotecnologia durante o século XX. Além do mais, a descoberta da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) trouxe inúmeros benefícios e desenvolvimento científico, como o sequenciamento de genomas, a expressão de genes em sistemas recombinantes, o estudo de genética molecular e o diagnóstico de doenças infecciosas (ALMEIDA et al., 2010). O princípio desta técnica é a amplificação de um segmento específico de uma molécula de DNA a partir de dois *primers* (um *forward* e um *reverse*) complementares às extremidades do segmento que se

quer amplificar e uma DNA polimerase (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004; ALMEIDA et al., 2010). A técnica foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis, que recebeu o prêmio Nobel de XXX em 1994 (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004). O desenvolvimento da PCR e da restrição enzimática possibilitou avanços significativos na manipulação do material genético (AZEVEDO; FUNGARO; VIEIRA, 2000).

A tecnologia do DNA recombinante permite o isolamento de um gene de um dado organismo e sua transferência para outro organismo. Quando há a inserção de um gene de uma espécie em outra o indivíduo é denominado transgênico, caso a inserção seja de um gene para um indivíduo da mesma espécie é denominado de organismo geneticamente modificado (AZEVEDO; FUNGARO; VIEIRA, 2000). Em resumo, os animais transgênicos são caracterizados por possuírem uma característica genética que foi introduzida artificialmente por intervenção do homem, sendo que de outro modo não a possuiria (HOUDEBINE, 2002; GIBBONS et al., 2014). A transgênese é uma das ferramentas mais importantes da biologia molecular para estudar a expressão e função de um gene (HOUDEBINE, 2002; LIN, CHIANG; TSAI, 2016) para tanto peixes transgênicos tem sido produzido e utilizado como modelo biológico, como é o caso do peixe-zebra (LIN, CHIANG; TSAI, 2016) e medaka (*Oryzias latipes*) (PORAZINSKI; WANG; FURUTANI-SEIKI, 2010).

A produção de animais transgênicos é uma técnica trabalhosa e de alto custo e depende de técnicas avançadas em biologia molecular, cultura de células, biologia reprodutiva e bioquímica (KUES; NIEMANN, 2011). A primeira transferência de DNA recombinante em peixes foi realizada em 1985 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), e em 1988 o primeiro peixe-zebra transgênico da germ-line (STUART; McMURRAY; WESTERFIELD, 1988). Atualmente já existem inúmeros peixes transgênicos e que são utilizados em diversos campos da ciência. Os peixes GloFish® são um exemplo de peixe-zebra transgênico fluorescente desenvolvido para ser utilizado como indicador de poluição e, atualmente, também estão sendo comercializados para fins ornamentais (TONELLI; ARAÚJO; RESENDE, 2013). Modelos de peixes-zebra transgênicos vem sendo utilizados, também, para compreender retinite pigmentosa e distúrbios na retina, devido às semelhanças de anatomia, fisiologia e vias de sinalização da retina dessa espécie com os seres humanos (RAGHUPATHY; PATNAIK; SHU, 2013). A produção de peixe-zebra transgênico para o hormônio de crescimento foi desenvolvida, sendo um importante modelo para a aquicultura (FIGUEIREDO et al., 2007). No estudo de cânceres, a transparência do peixe-zebra no estágio larval e a disponibilidade de linhas de células marcadas com fluorescência oferece oportunidades atraentes para compreender os mecanismos de tumorigênese (LIESCHKE; CURRIE, 2007). Além do mais, a análise de um tecido ou órgão

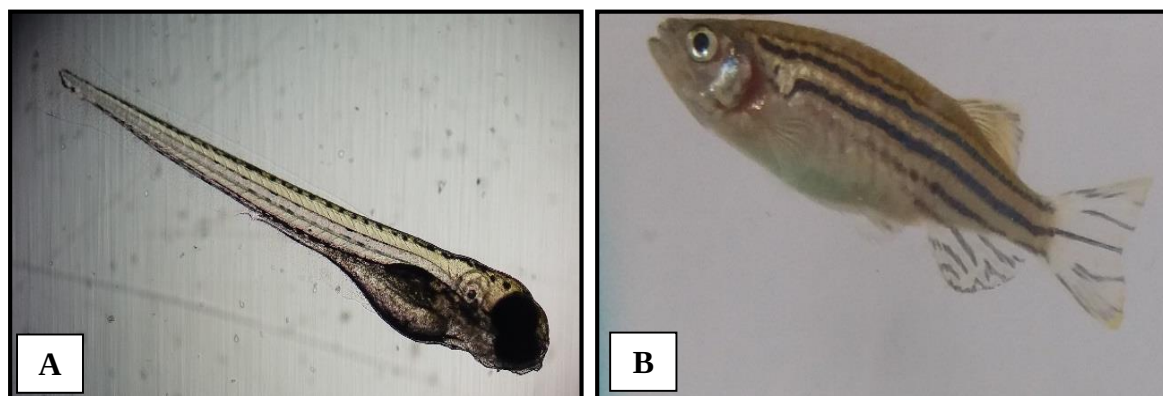
particular é facilitada pela utilização de peixes-zebra transgênicos que expressam a proteína verde fluorescente (GFP), a partir de um promotor específico para determinado tecido (SUMANAS; LIN, 2004). Desta forma, tem-se empregado amplamente proteínas fluorescentes como genes repórteres em organismos transgênicos. Dentre essas proteínas, a EGFP tem sido amplamente utilizada para geração de peixes-zebra transgênicos com expressão dirigida pelo promotor *cmcl2*, por exemplo. Essa geração de EGFP dirigida pelo *cmcl2* foi estabelecida anteriormente por Huang e colaboradores (2003).

Para geração das linhagens transgênicas, os transposons vem sendo bastante empregados, uma vez que permitem a integração do construto no genoma do organismo de maneira eficiente. Os transposons são sequências de DNA constituída por repetições terminais invertidas (ITRs) e constituem o vetor de clonagem. Nisso, o DNA flanqueado pelas ITRs é reconhecido por uma enzima denominada transposase e o material genético é enzimaticamente integrado ao DNA nuclear do modelo de interesse. De um modo geral, em um sistema de dois componentes, o transposon é integrado apenas a partir da atividade de tran-suplementação da transposase (HOUDEBINE, 2002; YERGEAU et al., 2010; CLARK et al., 2011; KUES; NIEMANN, 2011). Numerosas famílias de transposons já foram identificadas (HOUDEBINE, 2002), no entanto o Tol2 é a principal escolha para a geração de peixes-zebra transgênicos (CLARK et al., 2011). Dentre as técnicas, a microinjeção tem sido a mais utilizada quando se trabalha com peixes-zebra visando inserção da molécula de DNA recombinante (TONELLI; ARAÚJO; RESENDE, 2013; KARDASH, 2013), uma vez que outras metodologias, incluindo eletroporação, transferência de genes assistida por esperma e *gene guns* foram testadas quanto à sua capacidade para produzir peixes transgênicos, entretanto nenhuma destas tecnologias proporcionou melhores resultados comparado a microinjeção (KUES; NIEMANN, 2011).

2.6 PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) COMO ORGANISMO MODELO

Os animais utilizados mais comumente nas pesquisas biológicas são os roedores, mais especificamente camundongos e ratos perfazendo 95% dos estudos experimentais (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). No entanto, um novo modelo experimental vertebrado foi introduzido recentemente, e com êxito, no cenário científico: o peixe-zebra (*Danio rerio*) também conhecido como paulistinha ou zebrafish (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012; ARUNACHALAM et al., 2013).

Figura 3 – Modelo experimental utilizado no presente trabalho, peixe-zebra, na fase (a) larval com 3dpf e (b) adulta (fêmea).



Fonte: a autora (2016).

O peixe-zebra é um peixe teleósteo, exibindo esqueleto ósseo em sua constituição, tropical de água doce e originário da Ásia Central, encontrado principalmente na Índia (ENGESZER et al., 2007). Se reproduzem o ano todo (SPENCE et al., 2008), com tempo de geração curto, visto que embriões eclodem com 3 dpf (Figura 3-A), apresentam alta fecundidade e produzem prole em grande quantidade, uma vez que apenas um casal de peixes é capaz de gerar, em uma noite, centenas de ovos (BEN-MOSHE; FOULKES; GOTHILF, 2014). Atingem a maturidade sexual de 10 a 12 semanas (WESTERFIELD, 2007; BEN-MOSHE; FOULKES; GOTHILF, 2014), apresentando-se em pequeno tamanho (atingindo, em média, de 3 a 5 cm, Figura 3B), proporcionado assim facilidade de manutenção mesmo em grande número, o qual do ponto de vista biotecnológico, é uma das grandes vantagens da utilização do peixe-zebra visto que o pouco espaço necessário reduz os custos de manutenção. Um grupo de peixe-zebra pode manter-se numa fração do espaço necessário para manter um grupo equiparável de trutas ou salmões, os quais são modelos biológicos em investigação (LELE; KRONE, 1996).

Constituem-se por embriões transparentes, uma característica que inicialmente foi preponderante para seu uso como modelo experimental em embriologia e que hoje é utilizada na observação de linhagens transgênicas (SUMANAS; LIN, 2004; VATINE et al., 2011; BEN-MOSHE; FOULKES; GOTHILF, 2014), uma vez que a transparência óptica do peixe-zebra permite a análise de um tecido ou órgão particular utilizando proteínas fluorescentes (SUMANAS; LIN, 2004; LIESCHKE; CURRIE, 2007), sendo assim um excelente modelo para transgenia e outras ferramentas de manipulação (RAGHUPATHY; PATNAIK; SHU, 2013).

O sistema circadiano do peixe-zebra é semelhante ao dos seres humanos, pois assim como os humanos esta espécie é diurna (BEN-MOSHE; FOULKES; GOTHILF, 2014). Por esta razão, este animal tem se tornado um dos organismos modelos *in vivo* preferidos para estudo de diversos processos como embriogênese, migração celular, formação de órgãos, comportamento e sono, dentre vários outros. Recentemente passou a ser utilizado, também, em outras áreas de pesquisas biomédicas devido sua potencialidade para descoberta de novos medicamentos em vários modelos para doenças (KARDASH, 2013), bem como aplicação em uma infinidade de técnicas em Genética Molecular, ferramentas de Bioinformática, incluindo métodos como transgênese, mutagênese, *knockdown* de genes e modificações no genoma (BEN-MOSHE; FOULKES; GOTHILF, 2014). Seu genoma foi sequenciado sendo constituído de 25 cromossomos com um Comprimento Total de 1.412 gigabases, 26.206 genes codificadores de proteínas (RAGHUPATHY; PATNAIK; SHU, 2013) permitindo sua maior utilização nessas áreas supracitadas. O sequenciamento completo do genoma deste peixe possibilitou ainda o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares para a investigação que tornaram possível testar os efeitos de uma determinada condição experimental sobre a expressão genética de uma espécie ou estágio de desenvolvimento e, juntamente com estratégias quantitativas com a PCR em tempo real, permitem ter uma resposta integrada sobre as alterações que ocorrem num determinado grupo de genes selecionados (CONCEIÇÃO et al., 2009).

Por fim, estudos do genoma de peixes nos ajudarão a entender melhor a variação do número de cópias nas famílias de genes associados com o relógio circadiano dos peixes teleósteos e sua importância fisiológica (TOLOZA-VILLALOBOS; ARROYO; OPAZO, 2015). Além do mais, o aumento da disponibilidade de recursos para sequenciamento de espécies de teleósteos, juntamente com os recentes avanços na Biologia Celular, tem contribuído grandemente para o estudo sobre os mecanismos de crescimento muscular, com extrema importância para a indústria da aquicultura mundial, no que diz respeito à produção e qualidade (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011). Entretanto, o conhecimento atual sobre a relevância do ritmo circadiano na fisiologia do músculo esquelético, em peixes, ainda é muito limitado (LAZADO et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Modificar a expressão do gene *bmal1a* no músculo esquelético do peixe-zebra e avaliar seus efeitos comparados a uma linhagem não-transgênica (NT).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir um plasmídeo de expressão específica para o músculo esquelético do peixe-zebra para o gene *bmal1a*.
- Obter linhagens transgênicas para o gene *bmal1a* e calcular a taxa de transferência do transgene *bmal1a* para a progênie;
- Analisar a expressão dos genes *clock1a* e *bmal1a* no músculo esquelético de linhagens NT e transgênicas do peixe-zebra;
- Verificar a expressão dos fatores regulatórios miogênicos *myoD*, *myog*, *myf5* e *myf6* no músculo esquelético de linhagens NT e transgênicas do peixe-zebra;
- Averiguar os efeitos da transgenia na sobrevivência e crescimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A produção da linhagem transgênica foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Luis Fernando Fernandes Marins, nas instalações do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os demais experimentos deste trabalho foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos (LABOrA) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (CBiotec/UFPB). O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba sob número de protocolo 145/2015.

4.1 CULTIVO DO PEIXE-ZEBRA

Os peixes-zebra adquiridos de lojas de aquarismo de João Pessoa-PB e peixes-zebra transgênicos, descrito no item 4.2, foram utilizados nos experimentos. Estes animais foram mantidos em aquários de 20L com água doce, recirculação da água, temperatura em torno de 28°C, iluminação artificial (12:12h claro/escuro) e alimentados com ração comercial Tropical DISCUS GRAN (Tropical ®) duas vezes ao dia até saciedade.

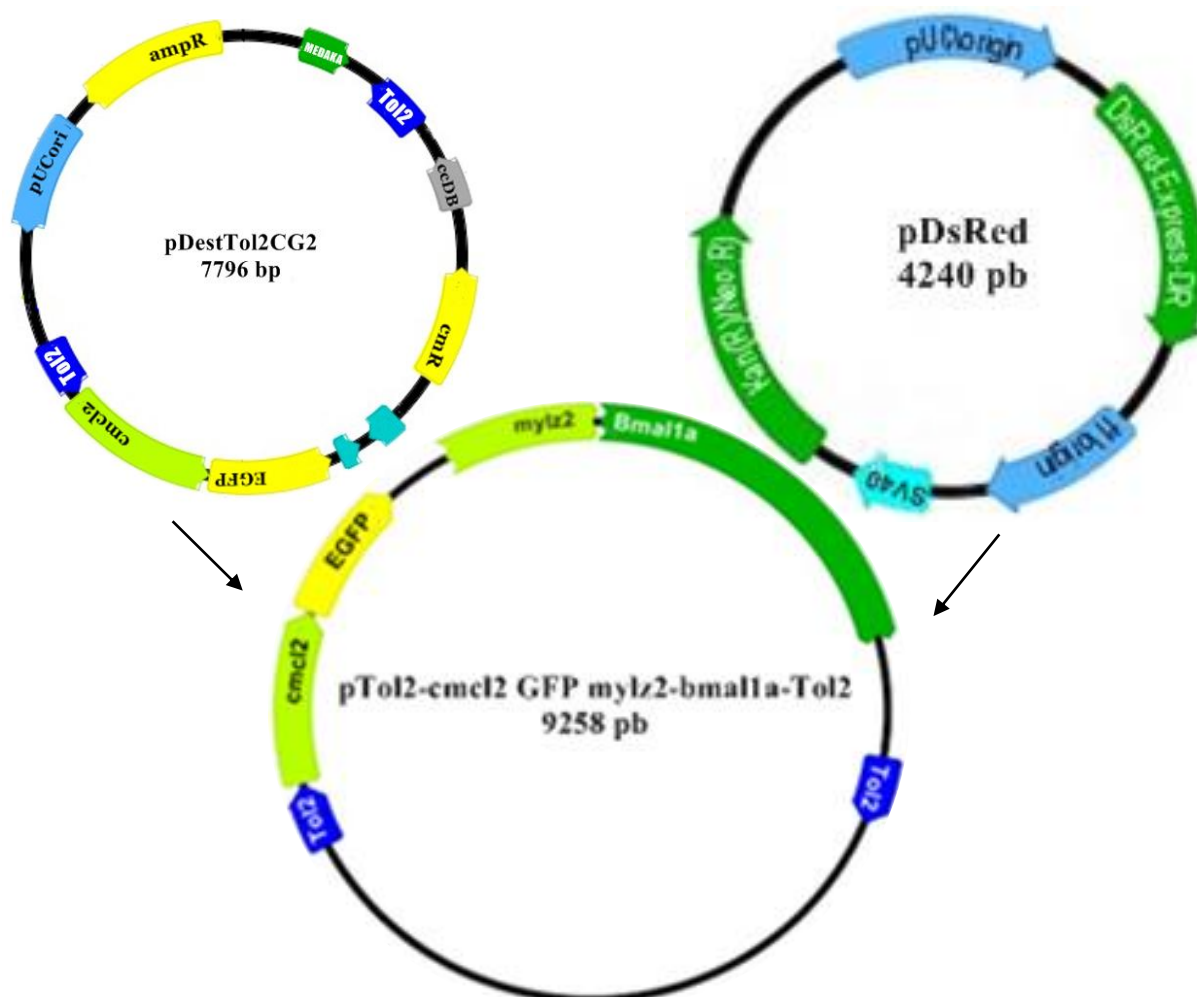
4.2 PRODUÇÃO DO CONSTRUTO CONTENDO O GENE *Bmal1a* DIRIGIDO PELO PROMOTOR DA MIOSINA ESQUELÉTICA

Os peixes-zebra transgênicos para o gene *Bmal1a* foram obtidos a partir de microinjeção com um plasmídeo denominado pTol2-cmcl2-GFP-mylz2-bmal1a-Tol2 produzido em laboratório. A construção deste plasmídeo foi baseada em dois plasmídeos: o pDsRED-Express-DR (Clontech Laboratories, Inc) e o pDestTol2CG2 (KWAN et al., 2007). As manipulações descritas aqui tiveram os seguintes objetivos: (1) obter a região flanqueada pelas sequências TOL do pDestTol2CG2, que serve como sequências de inserção no genoma do peixe-zebra; (2) obter a região que contém um gene repórter (EGFP) cuja expressão é dirigida pelo promotor da miosina cardíaca do peixe-zebra (Cmcl2); (3) obter a região de clonagem do plasmídeo pDsRED-Express-DR; e (4) inserir a sequência codificadora do *bmal1a* do peixe-zebra na região de clonagem, com expressão controlada pelo promotor da miosina de cadeia leve 2 (Mylz2) do peixe-zebra. Inicialmente, o plasmídeo pDsRED-Express-DR foi amplificado utilizando os primers

DsREDTe4-For, 5'-CGCGTACGTGGCAAGTGTAGCGGTCACGC-3' e DsREDTe4-Rev, 5'-CGACGCGTCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTC-3' e o plasmídeo pDestTol2CG2 utilizando TOL2e4-For, 5'-CGCGTACGGCCTCCCCGGTCCATCTACCC-3' e o TOL2e4-Rev, 5'-CGACGCGTAGCTGTTTCCTGCTCGAGGGC-3' ambos com sítios de restrição para as enzimas *BsiWI* e *MluI*. Os produtos gerados foram ligados resultando no plasmídeo pDsRED-Tol2b (5023pb). Em seguida, os plasmídeos pDsRED-Tol2b e pDestTol2CG2 foram amplificados utilizando os *primers* DsREDCore-FOR, 5'-CGTCCGGAAGTTATTACTAGCGCTACCGGACTCA-3' e DsREDCORE.REV, 5'-CGGCTAGCTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGC-3', CoreGFP-FOR, 5'-CGTCCGGATCAGGGGGAGGTGTGGGAGGT-3' e CoreGFP-VER, 5'-CGGCTAGCGGGCTTGCTGAAGGTAGGGGGT-3', respectivamente, com restrição pelas enzimas *KpnII* e *NheI*. Os produtos gerados foram ligados resultando no plasmídeo p-Tol2-GFP-MCS-DsRED-Tol2 (7413bp).

O promotor utilizado para expressão específica e constitutiva do gene *bmal1a* no músculo esquelético foi o da miosina de cadeia leve 2 (*myl2*) do peixe-zebra. O *myl2* foi amplificado através de reação de PCR com os *primers* longo.For.myl2, 5'-CGAATTCGGATATTTTCAAAGCCAATCG-3' e longo.Rev.myl2, 5'-CGGATCCGTCGAGACGGTATGTGTGAAG-3' com restrição por *EcoRI* e *BamHI* e ligação com o template pDsRED-Express-DR. Em seguida, foi realizada uma segunda amplificação com o curto.For.myl2, 5'-GGCGAATTCTGACCGGGTGAGGTCATAGGTCG-3' e curto.Rev.myl2, 5'-CGCGGTACCTGGATCCGTCGAGACGGTATGTGT-3' utilizando as mesmas enzimas de restrição, resultando no p-Tol-GFP-MCS-myl2-DsRED-Tol (7401pb). A estratégia utilizada para retirar o gene da proteína DsRed foi a partir da restrição do plasmídeo p-Tol2-GFP-MCS-myl2-DsRED-Tol2 com as enzimas *KpnI* e *NotI* (New England Biolabs, reações de acordo com as recomendações do fabricante). Em seguida, a sequência codificadora do gene *bmal1a* do peixe-zebra (ENSDART00000023959 – base de dados Ensembl), foi amplificada por reação de PCR utilizando os *primers* bmal1a.CDS.For, 5'-ATAGGTACCTGTGCGGATGATCTAATGGCAGACCA-3' e bmal1a.CDS.Rev, 5'-ATTGCGGCCGCCTTCACAAAGGCCAGGGCAGGTC-3'. Após restrição com as enzimas *KpnI* e *NotI*, os produtos de restrição do plasmídeo e do gene foram ligados com a enzima T7 DNA ligase (New England Biolabs), resultando no plasmídeo final pTol2-cmcl2-GFP-myl2-bmal1a-Tol2 (9258bp) que foi utilizado para geração da linhagem transgênica (ZF-*bmal1a*), ver Figura 4.

Figura 4 – Representação de pDsRED-Express-DR e pDestTol2CG2 os plasmídeos utilizados para obtenção do plasmídeo final pTol2-cmcl2-GFP-mylz2-bmal1a-Tol2 utilizado para geração da linhagem transgênica.



Fonte: a autora (2016).

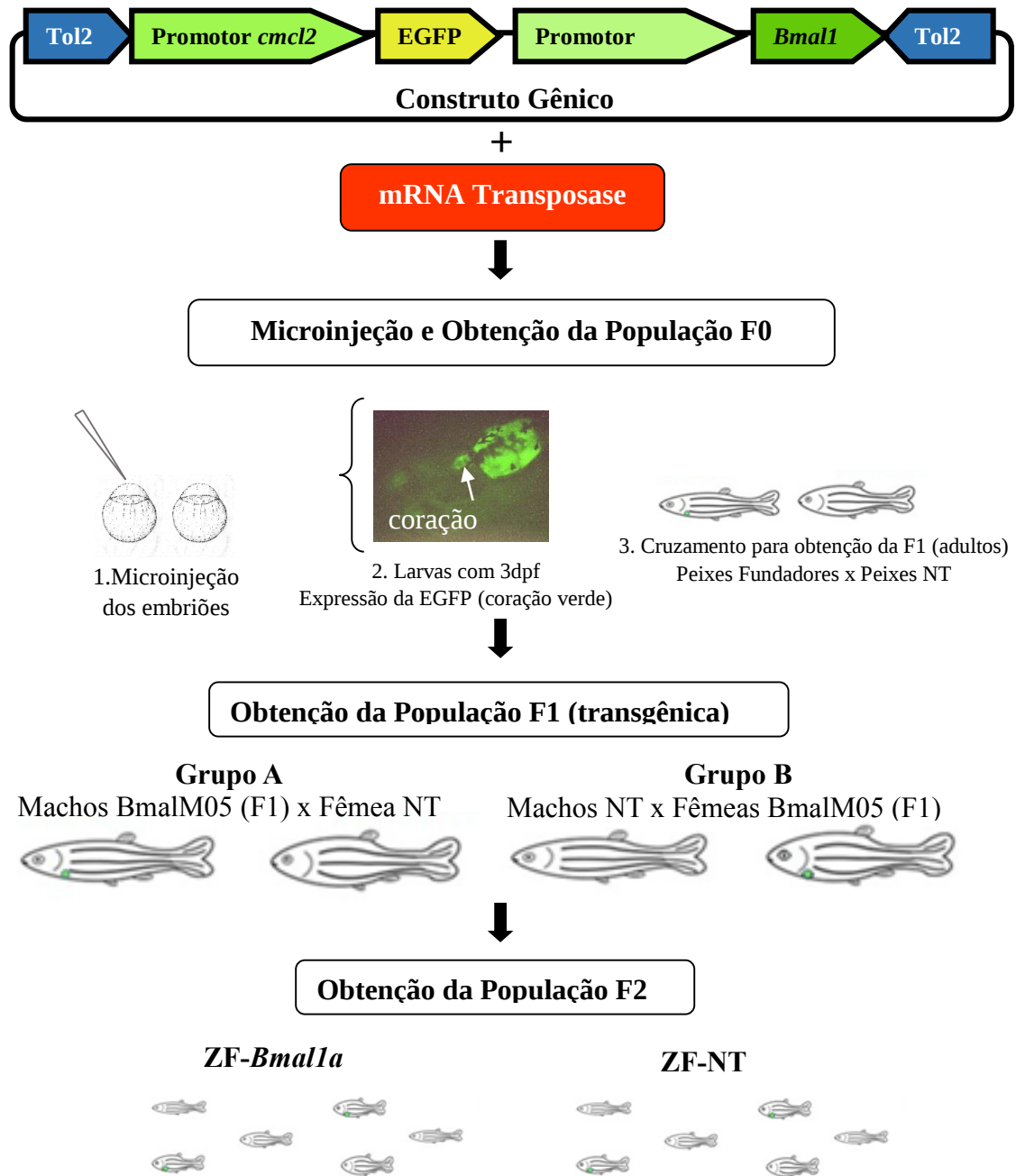
4.3 OBTENÇÃO DAS POPULAÇÕES F0, F1 E F2 DE PEIXES-ZEBRA TRANSGÊNICOS E DETERMINAÇÃO DA TAXA DE TRANSFERÊNCIA DO TRANSGENE

Para a obtenção de peixes transgênicos foi utilizada a técnica de transgenia utilizando transposons. Desta forma, o plasmídeo pTol2-Cmcl2-GFP-Mylz2-Bmal1a-Tol2 foi microinjetado, juntamente com o mRNA sintético que codifica a transposase, Figura 5, em 90 embriões de peixes-zebra NT recém-fertilizados e no estágio de uma célula (aproximadamente 20 minutos pós-fertilização) de acordo com protocolo estabelecido anteriormente (FIGUEIREDO et al., 2007). Vale salientar que os embriões utilizados para microinjeção foram obtidos a partir de cruzamentos entre as linhagens de peixes-zebra NT do Prof. Dr. Luis Fernando Fernandes Marins da FURG-RS, uma vez que os experimentos para obtenção da

linhagem transgênica foram realizados nessa universidade. O plasmídeo foi constituído de elementos transponíveis do tipo II (Tol2) em suas extremidades, constituídos por ITRs. Nisso, a proteína foi traduzida a partir do mRNA injetado, catalisando a excisão do TOL2, presente nas extremidades do plasmídeo, a partir dos ITRs conduzindo a integração estável do DNA excisado no genoma em um processo denominado de transposição. O mRNA injetado e a proteína de transposase são degradados gradualmente depois que a atividade da transposase termina e as inserções Tol2 tornam-se estáveis (KAWAKAMI; SHIMA, 1999; KAWAKAMI, 2007). Após a microinjeção, os embriões foram mantidos a 28°C e, aproximadamente, 3 dpf quando as larvas já haviam eclodido, foram observadas em microscópio de epi-fluorescência (Microscópio BA410 acoplado ao módulo EF-UPR-III, Motic) no filtro para FITC (EX D350/50x e BA D46050) para determinação dos organismos em que o plasmídeo havia sido integrado em seu genoma. Os peixes positivos para a transgenia apresentaram coração com coloração verde (devido à presença da proteína verde fluorescente, cuja expressão é dirigida pelo promotor da miosina cardíaca), enquanto que o coração de animais negativos para a transgenia apresentara-se sem coloração verde. Os peixes positivos obtidos a partir da microinjeção foram denominados de fundadores (F0).

A partir do cruzamento dos fundadores com peixes NT foi obtida a população F1. Para a obtenção da população F2, os peixes-zebra transgênicos F1 foram cruzados com peixes NT e separados em dois grupos de reprodução para determinação da taxa de transferência do transgene. O grupo A foi constituído de três machos transgênicos (machos BmalM05) e três fêmeas NT e o grupo B de três machos NT e três fêmeas transgênicas (fêmeas BmalM05). Os casais foram colocados em tanques individuais de reprodução e realizaram a desova em um recipiente, denominado armadilha, depositado na parte inferior do tanque. A armadilha foi constituída de plantas de plástico para simular o ambiente natural, e uma rede para que os ovos fossem separados dos casais, evitando o canibalismo. Os embriões foram coletados com pipeta *Pasteur*, desinfetados com hipoclorito de sódio, depositados em potes de plástico, com uma distribuição de 30 embriões/100 mL de água, e mantidos a 28°C. Após a eclosão (aproximadamente 3 dpf), as larvas foram visualizadas em microscópio de epi-fluorescência MOTIC modelo MHG-100B no filtro FITC (EX D480/30x e BA D535/40m) para identificação dos peixes-zebra transgênicos e NT e, também, nos filtros TEXAS RED, DAPI e campo claro no aumento de 10x. A taxa de transferência do transgene para a prole foi calculada a partir da determinação da quantidade de larvas transgênicas e NT, em que o número de transgênicos e NT foi relacionado com o número total de larvas obtidas. Esse experimento foi realizado em triplicata. A linhagem F2 foi utilizada nos experimentos subsequentes.

Figura 5 – Microinjeção de embriões de peixe-zebra nos estágios iniciais de desenvolvimento e obtenção da população F0, F1 e F2.



Fonte: a autora (2016).

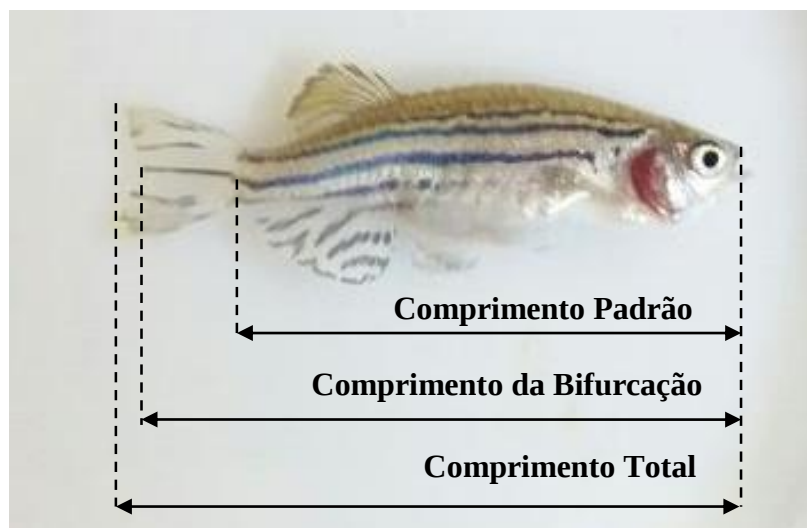
Na primeira parte é mostrado o construto gênico, contendo os elementos transposons (Tol2) em suas extremidades, o promotor da miosina cardíaca de cadeia leve (*cmcl2*) dirigindo a expressão da proteína verde fluorescente melhorada (EGFP) e o promotor da miosina esquelética de cadeia leve (*mylz2*) dirigindo a expressão do gene *bmal1a*. Este construto foi microinjetado juntamente com o mRNA Transposase em embriões de peixe-zebra no estágio de uma célula (em torno de 20 minutos pós-fertilização). A transposase reconhece os elementos Tol2 e integra o construto no genoma do organismo. Os embriões microinjetados foram denominados de fundadores (F0) a partir da confirmação da transgenia por microscopia (visualização do coração verde devido a expressão da EGFP) e ao atingirem a idade adulta foram cruzados com peixes NT para obtenção da população F1. A população F1, após a confirmação da transgenia, foi cruzada com peixes-zebra NT, os quais foram divididos em dois grupos de reprodução para obtenção da população F2, que foram utilizadas neste estudo.

4.4 ANÁLISE DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DA F2

A análise da taxa de sobrevivência dos animais foi realizada em três períodos do desenvolvimento: (1) de 3 até 7 dpf, período em que o animal se alimenta de reservas do saco vitelínico, (2) de 8 até 15 dpf, período de adaptação a alimentação exógena; e (3) de 16 até 30 dpf, período de transição para a fase juvenil. Para tanto foram utilizados 70 peixes transgênicos e 70 NT em duplicata.

Os peixes-zebra transgênicos e NT foram analisados, também, quanto ao crescimento. Para tanto, os animais 12 peixes-zebra transgênicos e 12 NT foram anestesiados com MS-222, dispostos em papel milimetrado e fotografados para medição do comprimento: comprimento padrão (CP), o qual corresponde da cabeça até o pedúnculo, comprimento da bifurcação (CB), o qual corresponde da cabeça até a bifurcação, e comprimento total (CT), da cabeça até a nadadeira caudal, Figura 6. Os dados referentes as medições foram obtidos utilizando o software ImageJ V 1.49 (National Institutes of Health, USA).

Figura 6 – Esquema representativo das medidas de comprimento padrão, comprimento da bifurcação e comprimento total para análise do crescimento de peixes-zebra não-transgênicos e transgênicos.



Fonte: a autora (2016).

4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DO RELÓGIO MOLECULAR E MRFs

Para análise da expressão dos genes do relógio molecular e dos fatores miogênicos no músculo esquelético, foram utilizados 12 peixes transgênicos e 12 peixes NT adultos com idade

de 11 meses submetidos ao fotoperíodo de 12:12h claro/escuro. Com base no trabalho Amaral e Johnston (2012), foi escolhido o tempo de 20h (ZT14), o qual corresponde ao pico de expressão do gene *bmal1a*, e 04h (ZT22), corresponde ao período de expressão basal do referido gene, para coleta do músculo esquelético e avaliação da expressão gênica. Em cada período, foram eutanasiados 6 animais transgênicos e 6 NT.

Os animais foram anestesiados por absorção com adição de 30 µg de ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (MS-222, Sigma-Aldrich) para cada 100 mL de água do sistema de cultivo. A diminuição de respostas a estímulos externos e da velocidade de natação foram os sinais de que os peixes estavam levemente anestesiados. Após a verificação destes sinais, os peixes foram imersos em solução contendo três vezes a concentração inicial do MS-222 e ao observar sinais de perda completa do equilíbrio, com a parada dos movimentos operculares, foi realizada a dissecação e extração do tecido muscular. As amostras foram colocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 500 µL de RNA later® (Sigma-Aldrich) e armazenadas em freezer (-20°C) até a extração do RNA total.

4.5.1 Extração do RNA total e síntese de cDNA

A extração de RNA total foi realizada a partir do músculo esquelético do peixe-zebra pelo método de fenol-clorofórmio utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação e a pureza do RNA total foram mensuradas pela técnica de espectrofotometria com o aparelho NanoDrop® spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). A integridade do RNA total foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose. O *Quantitect reverse transcription kit* (Qiagen Hilden Germany) foi utilizado para realizar a síntese de cDNA a partir de 1,0 µg de RNA total conforme as instruções do fabricante.

4.5.2 PCR em tempo real

As reações de PCR quantitativa (qPCR) foram realizadas para avaliar a expressão de genes da alça positiva do relógio molecular, *bmal1a* e *clock1a*, e fatores regulatórios miogênicos, *myf5*, *myf6*, *myoD* e *myog*, utilizando *b-actina* e *ef1a* como genes de referência (Tabela 1). A reação para qPCR foi composta de 7,5µL do reagente Brilliant II SYBR QPCR Low Rox Master Mix (*Stratagene*), 6µL do cDNA diluído 40 vezes, 0,25µmol.L⁻¹ de cada *primer* e água livre de nuclease (*Sigma*) para um volume final de 15µL em placas de 96 poços

(Applied Biosystems). As reações foram realizadas em duplicata e executadas no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com o seguinte 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 término da reação de qPCR foi gerada a curva de dissociação de 55 a 95 °C, para verificar a presença de um único pico das amostras para os genes utilizados individualmente (Apêndice A). A eficiência dos pares de *primers* foi verificada a partir do software LinRegPCR versão 12.5 (RUIJTER et al., 2009). Os dois genes de referência utilizados, *ef1a* e *β-actin2*, foram normalizados utilizando o software Genorm versão 3.5 (VANDESOMPELE et al., 2002), para o valor de M<1.5. A expressão de genes alvo foram normalizadas para a média geométrica dos genes de referência, sendo exibida como unidades arbitrárias. Os *primers* utilizados nesse estudo foram desenhados por Amaral e Johnston (2011).

Tabela 1 – *Primers* utilizados no projeto.

Ensembl Gene	f/r Sentido do <i>Primer</i> 5'-3'	Produto,pb	Tm, °C	E,%	R ²	Ensembl Gene ID
Genes de referência						
<i>ef1a</i>	f: GAGGAGTGATCTCTCAATCTTGAAAC r: CCCTTGCCCATCTCAGCG	191	79.6	81.7	0.999	ENSDARG00000020850
<i>β-actina2</i>	f: CCCAAACCCAAGTTCAGCC r: GAAGACAGCACGGGGAGCA	112	79.3	96.9	0.999	ENSDARG00000037870
Genes circadianos						
<i>bmal1a</i>	f: GTCACAGACAAGTGCTACAGATGCG r: TCCCTCCGCCATCTCCTGA	261	79.8	85.6	0.999	ENSDARG00000006791
<i>clock1a</i>	f: GGTTC AAGGACAGGGTTACAGATG r: GGTGACCTCTGAGACTGCTGG	280	85.3	81.0	0.999	ENSDARG00000011703
Fatores Regulatórios Miogênicos						
<i>myoD</i>	f: CGTCCACCAACCCGAACC r: TCCGTGCGTCAGCATTTGG	270	81.0	79.2	0.999	ENSDARG00000030110
<i>myog</i>	f: ACATACTGGGGTGTGCTCCTCTA r: CCACTGGAGTCGCCTCTGTT	209	84.4	95.3	0.999	ENSDARG00000009438
<i>myf5</i>	f: CAGAGAGCATGGTTGACTGCAAC r: TTGGACTGTCTGGAGAACTGCAC	243	81.2	85.9	0.999	ENSDARG00000007277
<i>myf6</i>	f: CAACGAAGCTTTTGACGCG r: AACACGGCTCCTTCTCTATGACC	291	81.3	83.9	0.999	ENSDARG00000029830

Fonte: Amaral e Johnston (2011).

Nota: Símbolo do gene no Ensembl, sequência forward (f) e reverse (r) dos *primers*, tamanho do produto, temperatura de melting (Tm), eficiência dos *primers* (E) e ID do gene no Ensembl.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados quanto à sua distribuição. Para tanto, foi realizado o teste de Kolmogorov-Sminorv a fim de determinar se as amostras apresentavam distribuição normal. Os dados de crescimento e expressão gênica foram testados e confirmados se seguiam distribuição normal, subsequente foi realizado o teste-t com a finalidade de verificar se houve diferença de expressão dentro e entre os grupos. Foi realizado, também, o teste de correlação de *Pearson* entre as variáveis de medidas CP, CB e CT. O teste do Qui-quadrado foi realizado o para os dados de sobrevivência e taxa de transferência do transgene, a fim de verificar possíveis divergências entre as frequências observadas e esperadas. Foram consideradas médias estatisticamente diferentes aquelas cujos resultados do teste estatístico foram menores que 0.05 ($p < 0.05$). As análises estatísticas foram realizadas no programa IBM SPSS Statistics 21.

5 RESULTADOS

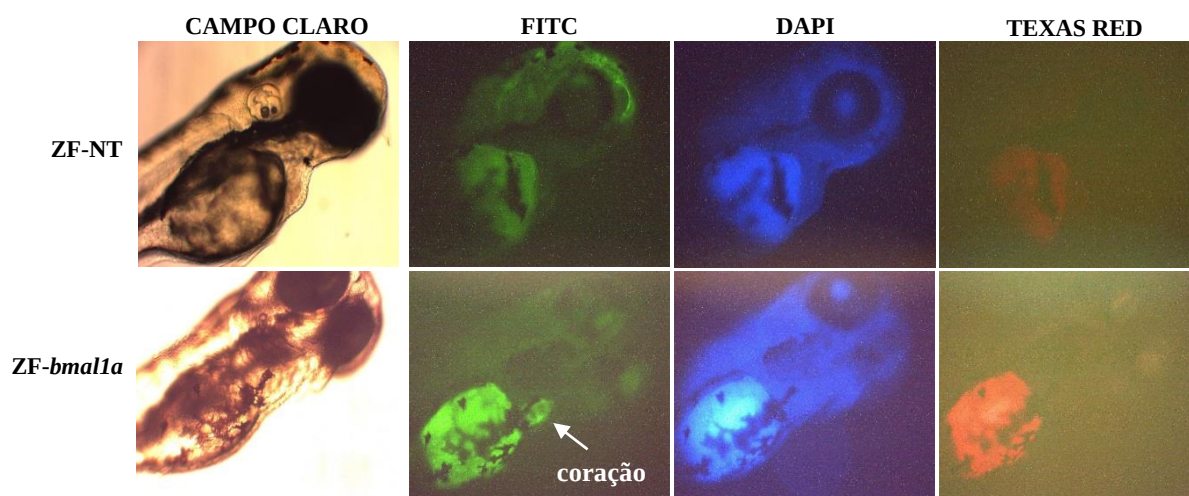
5.1 PORCENTAGEM DE TRANSGENIA DOS FUNDADORES E OBTENÇÃO DA POPULAÇÃO F1

Dos 90 embriões NT injetados com o transgene, 13 apresentaram fluorescência no coração, representando cerca de 14% de transgenia. Destes, apenas 7 chegaram à fase adulta, sendo 2 fêmeas e 5 machos. Cada um desses peixes representa uma população fundadora (F0), que foram cruzados com peixes-zebra NT para obter a população F1. Foram consistentemente obtidas proles transgênicas apenas para três peixes da população F0. Estas populações F01 foram denominadas fêmea01, macho01, e macho05, que foram cruzadas com peixes NT para a obtenção da população F02 (a população F02 do macho 05 foi utilizada neste estudo).

5.2 TAXA DE TRANSFERÊNCIA DO TRANSGENE DA POPULAÇÃO F1 PARA F2

O cruzamento entre peixes-zebra transgênicos da geração F01 e NT (prole macho05) deu origem à prole F2, a qual foi constituída de peixes transgênicos e NT. A prole transgênica e NT foi determinada pela microscopia de fluorescência sob 4 filtros de luz (campo claro, FITC, DAPI e TEXAS RED).

Figura 7 – Imagem de microscopia de fluorescência evidenciando o coração de peixes-zebra (a) não-transgênicos e (b) transgênicos.



Fonte: a autora (2016).

As larvas foram submetidas a emissão de luz branca (CAMPO CLARO), verde (FITC), azul (DAPI) e vermelha (TEXAS RED) com um aumento de 10x. No FITC, observa-se a larva de peixe-zebra transgênico (ZF-*bmal1a*) com o coração verde fluorescente e a larva não-transgênica (ZF-NT) com o coração sem coloração.

Dentre esses filtros, o filtro de luz verde foi o utilizado para visualização da expressão da EGFP, desta forma os peixes que apresentaram o coração verde fluorescente constituíram a prole transgênica, pelo fato de exibir expressão da EGFP no coração, e os peixes que apresentaram o coração sem coloração verde constituíram a prole NT, Figura 7.

Ao identificar a prole transgênica e a NT foi determinada a taxa de transferência do transgene para a prole com o teste do Qui-Quadrado (Tabela 2). Para tanto, foram testados seis casais, divididos em dois grupos: o grupo A consistiu de três machos transgênicos e três fêmeas NT, e o grupo B de três fêmeas transgênicas e três machos NT. Dentre os grupos, os casais do grupo B não apresentaram reprodução. No grupo A, o casal 03 apresentou problemas na reprodução. Os casais 01 e 02, do referido grupo, reproduziram-se e os dados estão apresentados na Tabela 2. A partir dos dados pode-se verificar que não houve diferenças significativas entre as duas linhagens considerando o $p < 0.05$, isto é, a prole F2 é 50% transgênica e 50% NT.

Tabela 2 – Taxa de transferência do transgene para a prole da F2 de peixes-zebra não-transgênicos e transgênicos.

	ZF-NT (%)	ZF- <i>bmal1a</i> (%)	p
Casal 01A	53,1±2	46,9±2	0,55
Casal 02A	53,8±6	46,2±6	0,39

Fonte: a autora (2016).

Nota: Valores apresentados em $m \pm dp$ (média $\pm$ desvio padrão) com $n \approx 100$ peixes em duplicata para as duas linhagens.

ZF-NT: peixes-zebra não-transgênicos e ZF-*bmal1a*: peixes-zebra transgênicos para o gene *bmal1a*.

5.3 TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DA POPULAÇÃO F2 DE PEIXES-ZEBRA TRANSGÊNICOS E NT

O peixe-zebra é um animal que apresenta uma alta taxa de mortalidade na fase larval. Para tentar reduzir essa mortalidade os parâmetros que afetam a qualidade da água foram verificados e controlados. A densidade de larvas por litro de água também foi monitorada seguindo o proposto por Westerfield (2007) o qual sugere a relação de 50 larvas/L de água. A sobrevivência das linhagens foi verificada em diferentes estágios de desenvolvimento, o qual compreendeu da fase larval até a fase juvenil. De acordo com a Tabela 3, verificamos que o período crítico, isto é, período em que foi verificada uma alta taxa de mortalidade compreendeu entre 8 e 15 dpf, com um percentual de 37.9 ± 7 e 42.9 ± 2 , para a linhagem NT e transgênica, respectivamente. Enquanto que, a menor taxa de mortalidade compreendeu o período de

nascimento até 7dpf, com $1.4\pm0\%$ e $3.6\pm1\%$. No período entre 16 e 30 dpf, as larvas apresentaram uma mortalidade moderada com $16.4\pm1\%$ e $12.1\pm1\%$ para peixes-zebra NT e transgênicos, respectivamente.

Tabela 3 – Taxa de mortalidade entre peixes-zebra não-transgênicos e transgênicos em diferentes estágios até 30 dpf.

	ZF-NT	ZF- <i>bmal1a</i>	p
Mortalidade até 7 dpf (%)	1,4±0	3,6±1	0,07
Mortalidade de 8 até 15 dpf (%)	37,9±7	42,9±2	0,30
Mortalidade de 16 até 30 dpf (%)	16,4±1	12,1±1	0,25
Mortalidade até 30 dpf (%)	55,7±0	58,6±8	0,57

Fonte: a autora (2016).

Nota: Valores apresentados em $m\pm dp$ (média $\pm$ desvio padrão) com $n=70$ peixes em duplicata para as duas linhagens.

ZF-NT: peixes-zebra não-transgênicos e ZF-*bmal1a*: peixes-zebra transgênicos para o gene *bmal1a*.

De acordo com o teste do Qui-quadrado verificamos que não houve diferenças na mortalidade das larvas nos três períodos de vida analisados entre os grupos transgênicos e não-transgênicos, com o valor de p de 0,07; 0,30 e 0,25, respectivamente. Após 30 dpf, período em que atingem a fase juvenil, foi verificada ausência de mortalidade. De um modo geral, a linhagem NT teve uma sobrevivência de $44,3\pm6\%$ e a transgênica de $41,4\pm0\%$, com ausência de diferença estatística entre estas médias.

5.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA POPULAÇÃO F2 DE PEIXES-ZEBRA TRANSGÊNICOS E NT

Os peixes-zebra transgênicos e NT foram medidos com relação ao CP, CB e CT. A partir dos valores dessas medidas de tamanho dos 12 peixes-zebra das duas linhagens, foram estimados os coeficientes de correlação de *Pearson*. Os valores referentes aos coeficientes de correlação estão apresentados na Tabela 4 e são extremamente significativos, evidenciando uma correlação altamente positiva entre as três variáveis analisadas para as duas linhagens em estudo variando entre 0,885 e 0,969. Uma vez que os escores apresentaram resultados positivos, o CT foi tomado como medida para analisar o crescimento, com um $p<0.001$.

Tabela 4 – Coeficiente de correlação de *Pearson* entre as variáveis de medidas de comprimento padrão, comprimento da bifurcação e comprimento total de peixes-zebra não-transgênicos e transgênicos.

	ZF-NT		ZF- <i>bmal1a</i>	
	CP	CB	CP	CB
	0,969 p<0,001		0,885 p<0,001	
CB				
CT	0,962 p<0,001	0,986 p<0,001	0,940 p<0,001	0,948 p<0,001

Fonte: a autora (2016).

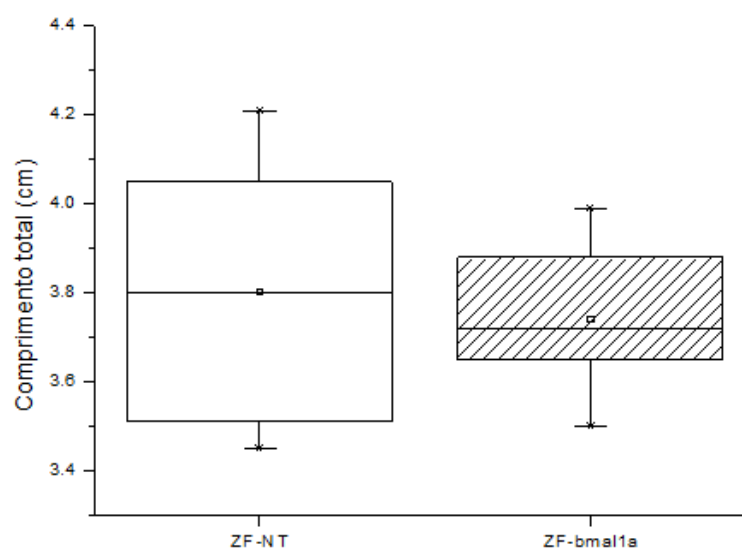
Nota: n=12 peixes-zebra ZF-NT e ZF-*bmal1a*.

ZF-NT: peixes-zebra não-transgênicos e ZF-*bmal1a*: peixes-zebra transgênicos para o gene *bmal1a*.

CP= comprimento padrão, CB= comprimento da bifurcação e CT= comprimento total.

Na Figura 8, temos os dados de comprimento padrão da linhagem transgênica e NT apresentados em gráfico boxplot (gráfico de caixa). A partir desses dados, verificamos que o tamanho das linhagens com 345 dias de vida apresentou valor médio de 3.7 ± 0.1 cm e 3.8 ± 0.2 cm para a linhagem transgênica e NT, respectivamente. Os dados seguiram distribuição normal e o teste-t indicou que os valores de CT não diferiram entre as linhagens, evidenciando ausência de diferenças significativas entre os dados.

Figura 8 – Comprimento total das linhagens não-transgênicas e transgênicas com 345 dias de idade.



Fonte: a autora (2016).

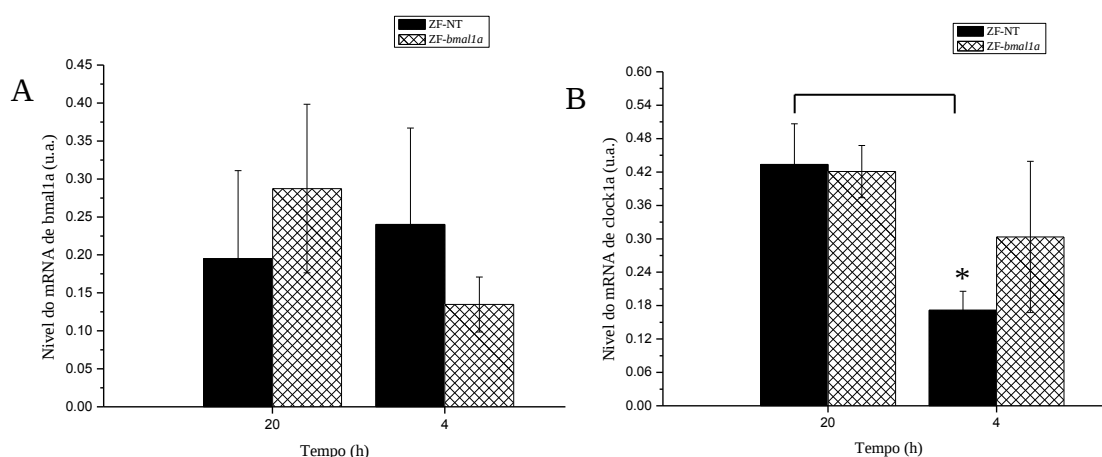
Nota: n=12 peixes-zebra ZF-NT e ZF-*bmal1a*.

ZF-NT: peixes-zebra não-transgênicos e ZF-*bmal1a*: peixes-zebra transgênicos para o gene *bmal1a*.

5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DO RELÓGIO MOLECULAR E DOS FATORES REGULATÓRIOS MIOGÊNICOS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DA POPULAÇÃO F2 DE PEIXES-ZEBRA TRANSGÊNICOS E NT

A PCR em tempo real foi utilizada para estabelecer os níveis de expressão de mRNA de genes da alça positiva do relógio molecular, *bmal1a* e *clock1a*, e dos fatores miogênicos, *myoD*, *myog*, *myf5* e *myf6*, no músculo esquelético da linhagem transgênica frente a linhagem NT. A eficiência da reação de PCR foi similar entre os genes alvo e os genes de referência e, desta forma, a normalização dos resultados foi realizada utilizando o genorm. Os genes de referência *ef1a* e β -*actin2* apresentaram-se como bons normalizadores com valor de M equivalente a 0.392. A partir da Figura 9A, pode-se verificar que não houve diferença na expressão do gene *bmal1a* no tempo de 20 e 04h dentro e entre o grupo transgênico e o NT. Com relação à expressão do gene *clock1a*, Figura 9B, verificamos que houve diferença na expressão no grupo NT entre o tempo de 20 e 04h, enquanto que para a linhagem transgênica não houve diferença de expressão. Entre as linhagens, nos referidos tempos 20 e 04h, não houve diferença de expressão.

Figura 9 – Expressão gênica dos genes (A) *bmal1a* e (B) *clock1a* da alça positiva do relógio molecular em peixes-zebra não-transgênicos e transgênicos no tempo de 20 e 04 h.



Fonte: a autora (2016).

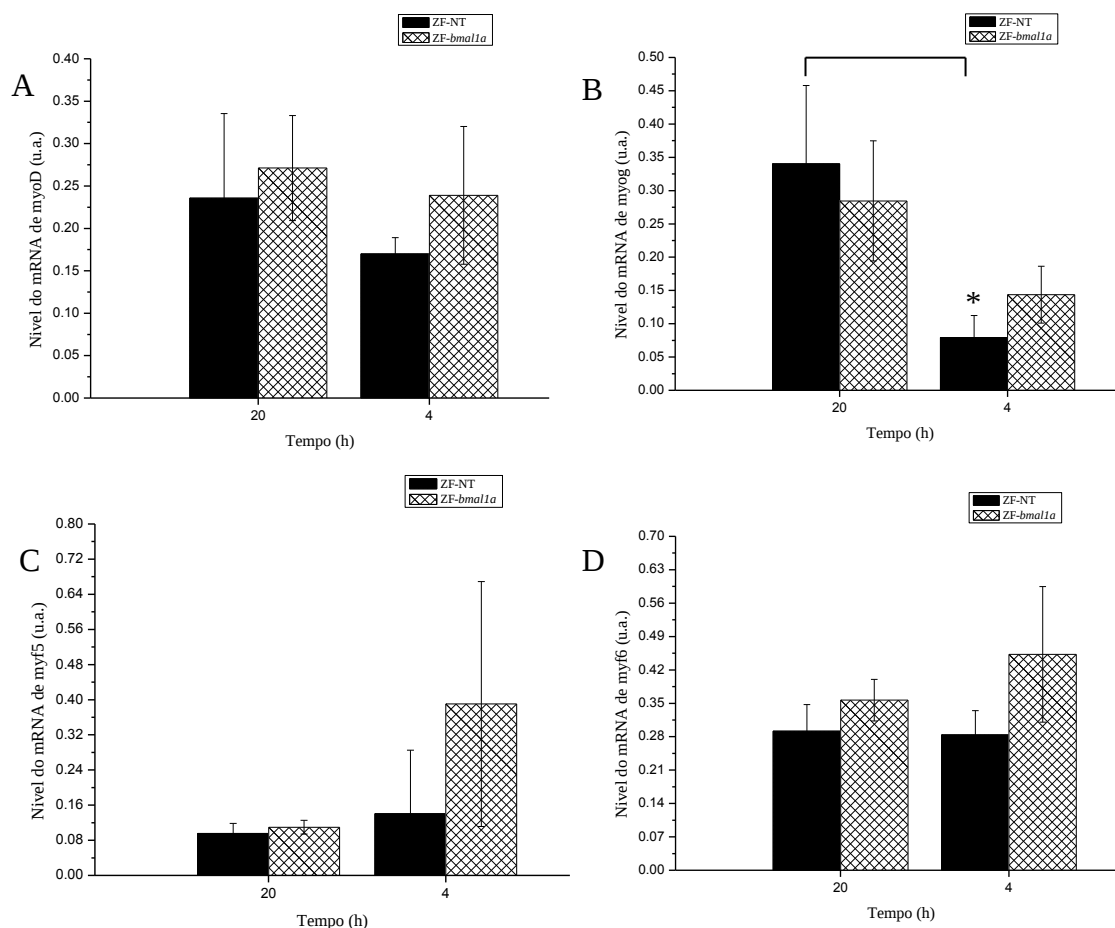
Nota: n=12 peixes-zebra ZF-NT e ZF-*bmal1a*.

ZF-NT: peixes-zebra não-transgênicos e ZF-*bmal1a*: peixes-zebra transgênicos para o gene *bmal1a*.

O asterisco indica diferença de expressão do gene entre os tempos para a mesma linhagem.

A expressão dos genes *myoD*, *myf5* e *myf6* não apresentou diferença na expressão dentro do grupo transgênico e do NT, bem como entre os grupos nos tempos de análise 20 e 04h. Entretanto, para o gene *myog* foi verificada diferença significativa na sua expressão no grupo NT, tempo de 20 e 04h, enquanto que para o grupo transgênico não foi evidenciada diferença significativa na expressão desse gene. Entre os grupos, não observou-se diferença de expressão para os tempos de 20 e 04h.

Figura 10 – Expressão gênica dos fatores miogênicos (A) *myoD*, (B) *myog*, (C) *myf5* e (D) *myf6* no músculo esquelético de peixes-zebra não-transgênicos e transgênicos no tempo de 20h e 04h.



Fonte: a autora (2016).

Nota: n=12 peixes-zebra ZF-NT e ZF-bmal1a.

ZF-NT: peixes-zebra não-transgênicos e ZF-bmal1a: peixes-zebra transgênicos para o gene *bmal1a*.

O asterisco indica diferença de expressão do gene entre os tempos para a mesma linhagem.

6 DISCUSSÃO

6.1 GERAÇÃO DAS POPULAÇÕES TRANSGÊNICAS F0, F1 E F2 TRANSGÊNICA E AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO

A estratégia, desse trabalho para geração da linhagem transgênica utilizando EGFP constituiu-se um sucesso, além do mais o fato das larvas de peixe-zebra apresentarem-se transparentes facilitaram o monitoramento de transmissão do transgene para a prole. A utilização de genes repórteres para determinação de linhagens transgênicas é um método bastante confiável, uma vez que a proteína fluorescente quando expressa nas células do organismo produz fluorescência após excitação das células a partir de luz com comprimento de onda específico. O coração das larvas da linhagem transgênica, com 3 dpf, apresentou coloração verde no filtro específico para visualização da EGFP e a fluorescência observada nos demais filtros constitui-se como uma fluorescência endógena natural do organismo, visto que a linhagem NT também apresentou essa fluorescência, configurando-se como uma fluorescência inespecífica. Kawakami (2007) confirmou a confiabilidade na utilização de proteínas fluorescentes para determinação de organismos transgênicos, em que os embriões EGFP negativos de seu estudo também foram negativos para PCR, concluindo que, utilizando esta estratégia, peixes transgênicos que carregam outros genes em sua inserção sempre expressarão EGFP.

Além da revolução de proteínas fluorescentes, a utilização de transposons tem auxiliado ainda mais a engenharia genética (CLARK et al., 2011). A transgenia mediada por Tol2 é muito eficiente, tornando-se possível obter linhas transgênicas mesmo quando injeta-se o material genético após a fase de 1 célula ou com o DNA de qualidade reduzida (BALCIUNIENE; BALCIUNAS, 2013) e essa ferramenta vem sendo demonstrada ser extremamente eficaz para geração de linhagens estáveis de peixe-zebra (KAWAKAMI, 2007; SUSTER et al., 2009). No presente estudo, a taxa de transgenia dos fundadores de peixe-zebra foi de 14% a partir do construto Tol2-cmcl2 -EGFP- mylz2-bmal1a-Tol2, enquanto que o peixe haplochromine (*Astatotilapia burtoni*), apresentou uma sobrevivência de apenas 14% (5dpf) e destes fundadores sobreviventes metade apresentavam o Tol2-Efl α Promoter-GFP-Tol2 (JUNTTI; HU; FERNALD, 2013), sendo verificado que não sabe-se o real valor dessa taxa de transferência pelo fato de não ter sido determinada a taxa de transferência do transgene nas larvas que morreram. Em outra espécie de peixe, o Killifish (*Nothobranchius furzeri*), 36% dos

embriões foram positivos para transgenia a partir do construto Tol2-Cska-GFP-cmcl2-mCherry-Tol2 (VALENZANO; SHARP; BRUNET, 2011). Pode-se verificar uma ampla faixa da frequência de transgenia em diferentes espécies ou até mesmo na mesma espécie, mesmo assim essa técnica é considerada positiva por diversos pesquisadores, visto que essa variação pode ser devido a constituição do construto inserido, uma vez que quanto mais simples for o construto, maior a eficiência. A expressão do transgene permanece por inúmeras gerações, sugerindo que os transgene desenvolvido juntamente com Tol2 não sofre efeitos de silenciamento gênico (KAWAKAMI, 2007). Os fundadores de peixe-zebra transgênico para o gene *bm11a* que foram capazes de transmitir o transgene para a próxima geração, representando 50% de transmissão. Esse valor é bastante significativo, uma vez que foi apenas 5% para uma linhagem de peixe-zebra de Suster e colaboradores (2011) e de 30% para uma linhagem de peixe-zebra em um estudo desenvolvido por Feng e colaboradores (2016).

Em relação aos testes de reprodução da geração F1 obtida a partir do macho01 fundador, foi verificado problemas de reprodução para os casais do grupo B e um casal do grupo A. Para os casais do grupo B (cruzamento: FBmalM05xMNT) um dos fatores pode ter sido a idade dos machos NT, visto que os mesmos estavam com idade superior a dois anos, sendo que o período de reprodução ideal desse teleósteo se dá entre 3 e 18 meses de idade (AVDESH et al., 2012). Além do mais a endogamia, isto é, o cruzamento entre casais aparentados pode afetar o desenvolvimento sexual, reduzindo as taxas de fecundidade (BROWN et al., 2012). Entretanto, a ocorrência de endogamia entre os casais desse estudo é baixa, uma vez os peixes transgênicos foram oriundos da FURG do Rio Grande e os peixes NT de lojas de aquarismo de João Pessoa-PB. Vale salientar, também, que em reproduções realizadas anteriormente esses machos NT haviam apresentado resultados positivos.

Dentre os casais que se reproduziram, foi verificado que as fêmeas sempre realizavam a desova nas primeiras horas da manhã, corroborando com o achado de Blanco-Vives e Sánchez-Vázquez (2009) em que a acrofase da desova de fêmeas submetidas a um fotoperíodo de C10:E14, juntamente com machos da linhagem de peixe-zebra, foi de 3 horas após as luzes acenderem na parte da manhã, afirmando-se assim que a desova apresenta um comportamento rítmico sendo regulada pelo relógio circadiano. A partir dos dados obtidos da reprodução dos casais, verificou-se que a população F1 estava transmitindo o transgene para a prole seguindo a herança mendeliana em que se espera como resultado do cruzamento da F1, entre transgênicos e NT, uma população 50% transgênica e 50% NT na F2, corroborando com os resultados de Ju et al. (2003) o qual cruzou um peixe GFP-positivo e um tipo selvagem e obteve uma F2 50% transgênica. Outro fator observado na prole F2 foi a sobrevivência, verificando que não diferiu

entre as linhagens, entretanto constatou-se que os alevinos de peixe-zebra apresentaram alta taxa de mortalidade de 8 a 15 dpf pelo fato de que as larvas estão em uma fase de adaptação a alimentação exógena nesse período, enquanto que até 7dpf período em que alimentam-se de fonte endógena, isto é, reservas do saco vitelínico a mortalidade foi bem mais baixa, e entre 15 e 30 dpf a mortalidade foi moderada pelo fato desses alevinos apresentarem-se mais resistentes e em período de transição para a fase juvenil. A sobrevivência até 30 dpf, em torno de 40%, foi bastante positiva, e um pouco maior que a sobrevivência das linhagens de peixe-zebra investigadas por Amaral e Johnston (2012) a qual foi em torno de 33% e menor que a sobrevivência das larvas de peixe-zebra em pesquisa desenvolvida por Villamizar et al. (2014) a qual foi em torno de 60%. Villamizar e colaboradores, investigaram ainda o efeito de diferentes condições de luminosidade na sobrevivência e desenvolvimento das larvas, verificando que em escuro constante houve 100% de mortalidade das larvas até 18 dpf, confirmando a influência significativa que o fotoperíodo possui sobre a embriogênese, crescimento larval, desenvolvimento no peixe-zebra, bem como na sincronização do relógio molecular. No presente estudo, a transgenia poderia ser um fator a interferir na sobrevivência das larvas, entretanto verificou-se que isto não ocorreu, inferindo-se assim que a transgenia para o gene *bmal1a* não afetou a sobrevivência das larvas, bem como não afetou o crescimento dos peixes na fase adulta, uma vez que o TT das linhagens não diferiu aos 345 dias.

6.2 EXPRESSÃO DE GENES DO RELÓGIO MOLECULAR E MRFs NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LINHAGENS DE PEIXE-ZEBRA TRANSGÊNICOS E NT

O gene *bmal1a* possui expressão circadiana no músculo esquelético conforme reportado na literatura (AMARAL; JOHNSTON, 2011), bem como no cérebro, olhos, coração, rim, fígado, glândula pineal e baço de peixe-zebra (CERMAKIAN et al., 2000) e de outros organismos como os ratos. Nos pontos experimentais, ZT14 e ZT22, em que foi verificada a expressão do gene *bmal1a*, no presente trabalho, não foi verificada diferença na sua expressão tanto para a linhagem transgênica quanto para a linhagem controle, em contraste com o resultado observado por Amaral e Johnston (2011). O bacalhau do atlântico também apresenta acrofase no ZT14 (LAZADO et al., 2014), em contraste, os ratos apresentam pico de expressão nas primeiras horas do período claro e expressão basal em torno do fim desse período (McCARTY et al., 2007). Logo, podemos verificar que a expressão deste gene em roedores e peixes é quase anti-fase. Não se sabe se esse fato reflete as diferenças profundas na organização

do relógio molecular desses organismos ou se reflete o fato de que os roedores são noturnos ao passo que os peixes são diurnos (CERMAKIAN et al., 2000).

O gene *bmal1a* inserido no organismo, em que sua expressão foi dirigida pelo promotor *mylz2*, deveria apresentar um perfil de expressão constitutiva, entretanto não foram realizadas modificações na composição do gene inserido e nem retirado o gene nativo do organismo. Então, ao verificar a expressão do *bmal1a* avalia-se ao mesmo tempo a expressão do gene nativo do organismo e do gene inserido, pelo fato de apresentarem a mesma sequência, sendo que apresentam perfis de expressão diferenciados por serem dirigidos por promotores diferentes. Desta forma, esperava-se uma tendência para um pico de expressão circadiano maior na linhagem transgênica, uma vez que a expressão do gene constitutivo iria somar o *bmal1a* no mecanismo do relógio para algumas funções, do que na linhagem NT que apresenta apenas a expressão do *bmal1a* dirigido pelo promotor do relógio molecular. Entretanto, não foram verificadas diferenças na expressão do gene *bmal1a* no ZT14, pico de expressão reportado por Amaral e Johnston (2011), e ZT22, expressão basal também reportada por esses autores, tanto para a linhagem transgênica quanto para linhagem NT. Esses resultados inferem uma expressão constitutiva desse gene para ambas as linhagens nos tempos analisados. Logo, algumas considerações podem ser feitas em relação a esse fato, uma vez que há uma tendência para uma expressão circadiana para esse gene nas referidas linhagens. O número amostral, por exemplo, pode ter sido um fator responsável pela ausência de resultados estatisticamente significantes. Esse problema do número amostral foi decorrente da extração de RNA em que algumas amostras foram perdidas, podendo-se assim ter afetado a qualidade dos resultados, refletindo num alto erro experimental. Outro fator a ser considerado, que pode ter afetado a expressão dos genes, é o deslocamento de fase do ritmo ocorrendo um atraso ou avanço de fase, que de acordo com Lefta, Wolff e Esser (2011) um avanço de fase é uma mudança no tempo da fase a ocorrer mais cedo e um atraso de fase é uma mudança para um momento posterior, então o pico de expressão do gene *bmal1a*, a expressão basal, bem como os genes ativados por ele podem ter sido afetados caso esse fato tenha acontecido, ocorrendo em tempos diferentes ao reportado por Amaral e Johnston (2011). Além do mais, também é possível que as alças de regulação do relógio molecular endógeno tenham compensado a expressão do gene *bmal1a* inserido no peixe-zebra, mantendo-se a homeostasia do sistema.

Com relação a expressão do gene *clock1a* no músculo esquelético foi verificado um perfil circadiano na linhagem controle corroborando com o trabalho de Amaral e Johnston (2011) e a linhagem transgênica apresentou um perfil de expressão constitutiva, assim como o gene *bmal1a* dessa linhagem. Sendo assim, outra sugestão é que com a superexpressão do *bmal1a*, a

expressão dos seus parálogos *bmal1b* e *bmal2* (VATINE et al., 2011; LIU et al., 2015) possa ter diminuído e/ou ter sido reprimida, não contribuindo assim para a formação dos heterodímeros BMAL1a:CLOCK1a e BMAL2:CLOCK1a, haja visto a desproporção dos níveis dos fatores de transcrição de BMAL1a para com o CLOCK1a. Somado assim, foi verificado que o *bmal1a* desse vertebrado liga-se mais firmemente ao *clock* do que o *bmal2* (CERMAKIAN et al., 2000).

O heterodímero CLOCK:BMAL1a é importante para a ativação de MRFs, dentre estes Andrews et al. (2011) verificou que o *myoD* em ratos é um CCG. Em contraste, Amaral e Johnston (2011) verificaram que apenas o fator miogênico *myf6* apresentou perfil circadiano em peixe-zebra, denotando que esse gene é controlado pelo relógio molecular. Ao contrário disso, o *myf6* teve um padrão de expressão constitutiva, no presente estudo, para ambas as linhagens investigadas. Esse gene *myf6* é expresso tardiamente durante a embriogênese, bem como em animais adultos e parece compartilhar muitas de suas funções com o *myog* (LUDOLPH; KONIECZNY, 1995). Em consonância com os achados de Amaral e Johnston (2011), observou-se que os genes *myoD* e *myf5* apresentaram expressão constitutiva para as duas linhagens, transgênica e NT, não diferindo entre as linhagens pelo fato do relógio molecular não intervir na expressão desses genes como reportado. Contrário a esses autores, o *myog* apresentou um perfil circadiano na linhagem NT, em que segundo Schiaffino, Blaauw e Dyar (2016) oscilações circadianas de genes musculares significa que são genes controlados diretamente pelo relógio muscular ou ainda por fatores extrínsecos, como a alimentação, sinais hormonais e influências neurais. Segundo Schierholt e colaboradores (2008), esse gene possui extrema importância durante a miogênese, visto que sua expressão marca o início da diferenciação e, conseqüentemente, o desenvolvimento das fibras musculares a partir dos mioblastos previamente formados. Sendo assim, esse gene pode ser melhor estudado pelo fato de ter sido observado um perfil circadiano podendo afirmar que seja controlado pelo relógio molecular a partir dos resultados dos pontos experimentais averiguados, além do mais outros fatores podem ter interferido na sua expressão como citado.

Embora existam poucos estudos a respeito da avaliação do efeito do relógio molecular no desenvolvimento e manutenção do músculo esquelético em peixe-zebra várias linhas de evidência em outros vertebrados tem reportado a importância dos ritmos circadianos para fisiologia desse tecido, sendo necessário para organização estrutural, metabolismo da glicose e produção de energia. Pode-se verificar que a expressão do *bmal1a* dirigida pelo promotor *myl2* não afetou a homeostasia do organismo, bem como não interferiu na sobrevivência e crescimento da linhagem. Entretanto, outros estudos devem ser realizados a fim de elucidar a

importância desse mecanismo no crescimento do tecido muscular em peixes, uma vez que é o produto de maior valor agregado na piscicultura e de amplo interesse industrial.

7 CONCLUSÕES

- O plasmídeo para os genes EGFP e *bmal1a* foi construído com sucesso, visto que foi observada expressão desses genes na linhagem transgênica;
- O transgene foi transmitido para a prole seguindo herança mendeliana;
- A expressão do gene *bmal1a* na linhagem transgênica dirigida pelo promotor *mylz2* apresentou expressão constitutiva, porém o mesmo foi observado na linhagem NT;
- Dentre a expressão dos fatores miogênicos foi verificada uma tendência do *myog* ser um gene controlado pelo relógio molecular;
- A transgenia para o gene *bmal1a* não afetou a sobrevivência das larvas, bem como não afetou o crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHT, U. Timing to Perfection: The Biology of Central and Peripheral Circadian Clocks. **Neuron**, v. 74, n. 2, p. 246–260, 2012.
- ALBRECHT, U.; EICHELE, G. The mammalian circadian clock. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 13, p. 271–277, 2003.
- ALMEIDA, A. P; et al. Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.133-148, jul./set. 2010.
- AMARAL, I. P. G.; JOHNSTON, I. A. Circadian expression of clock and putative clock-controlled genes in skeletal muscle of the zebrafish. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, p. R193–R206, 2011.
- AMARAL, I. P. G.; JOHNSTON, I. A. Experimental selection for body size at age modifies early life-history traits and muscle gene expression in adult zebrafish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 22, p. 3895–3904, 2012.
- ANDREWS, J. L. et al. CLOCK and BMAL1 regulate MyoD and are necessary for maintenance of skeletal muscle phenotype and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 44, p. 19090–19095, 2010.
- ARUNACHALAM, M. et al. Natural History of Zebrafish (*Danio rerio*) in India. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2013.
- AVDESH, A. et al. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. **Journal of Visualized Experiments**, n. 69, p. 1-8, 2012. doi:10.3791/4196
- AZEVEDO, J. L.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Transgênicos e evolução dirigida. **Hist. cienc. saude-Manguinhos.**, Rio de Janeiro, v. 7, n.2, jul./oct. 2000.
- BALCIUNIENE, J.; BALCIUNAS, D. Gene trapping using gal4 in zebrafish. **Journal of visualized experiments**, v. 79, n. September, p. 1–6, 2013.
- BEN-MOSHE, Z.; FOULKES, N. S.; GOTHILF, Y. Functional development of the circadian clock in the zebrafish pineal gland. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-8, 2014.
- BENTZINGER, C. F.; WANG, Y. X.; RUDNICKI, M. A. Building Muscle : Molecular Regulation of Myogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, doi:10.1101, 2012.
- BERKES, C. A.; TAPSCOTT, S. J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 16, n. 4–5, p. 585–595, 2005.
- BISMUTH, K.; RELAIX, F. Genetic regulation of skeletal muscle development. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 18, p. 3081–3086, 2010.

- BLANCO-VIVES, B.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebra fish. **Physiology and Behavior**, v. 98, n. 3, p. 268–275, 2009.
- BOEUF, G.; BAIL, P.Y.L. Does light have an influence on fish growth? **Aquaculture**, v.177, p.129-152, 1999.
- BROWN, A. R. et al. Differences in sexual development in inbred and outbred zebrafish (*Danio rerio*) and implications for chemical testing. **Aquatic Toxicology**, v. 112–113, p. 27–38, 2012.
- BUCKINGHAM, M. et al. The formation of skeletal muscle: from soma to limb. **Journal of Anatomy**, v. 202, p. 59–68, 2003.
- BUHR, E. D.; TAKAHASHI, J. S. Molecular components of the mammalian circadian clock. **Handbook of Experimental Pharmacology**, [s.v], n. 217, p. 3-27, 2013.
- CAHILL, G. M. Clock mechanisms in zebrafish. **Cell and Tissue Research**, v. 309, n. 1, p. 27–34, 2002.
- CECON, E.; FLÔRES, D. E. F. L. Regulação da expressão gênica nas engrenagens do relógio circadiano de mamíferos. **Revista da Biologia**, v. 4, 2010.
- CERMAKIAN, N. et al. Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 8, p. 4339–4344, 2000.
- CHALLET, E. et al. Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. **Biological Chemistry**, v. 384, n. 5, p. 711–719, 2003.
- CHATTERJEE, S. et al. Brain and muscle Arnt-like 1 is a key regulator of myogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. Pt 10, p. 2213–24, 2013.
- CHATTERJEE, S. MA, K. Circadian clock regulation of skeletal muscle growth and repair. **F1000Research**, v. 5, p. 1549, 2016.
- CLARK, K. J. et al. Transgenic Zebrafish Using Transposable Elements. **Methods in Cell Biology**, v. 104, p. 137–149, 2011.
- CONCEIÇÃO, L. E. C. et al. Avanços recentes em nutrição de larvas de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p.26-35, 2009.
- DEVOTO, S. H. et al. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. **Development**, v. 122, n. 11, p. 3371–80, 1996.
- DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; ALBRECHT, U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. **Annual Review of Physiology**, v. 72, n. 517–49, 2010.
- EDERY, I. Circadian rhythms in a nutshell. **Physiological Genomics**, v. 3, p. 59–74, 2000.

- ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field. **Zebrafish**, v. 4, n. 1, p. 21-38, 2007.
- ESCH, C. et al. Locomotor activity assay in zebrafish larvae: Influence of age, strain and ethanol. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 34, p. 425–433, 2012.
- FENG, LV. et al. Generation of a *mef2aa*: EGFP transgenic zebrafish line that expresses EGFP in muscle cells. **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 1–8, 2016. Doi: 10.1007/s10695-016-0286-3
- FIGUEIREDO, M. D. A. et al. Improving the production of transgenic fish germlines: In vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 31–36, 2007.
- GEYFMAN, M. et al. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1) controls circadian cell proliferation and susceptibility to UVB-induced DNA damage in the epidermis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.109, n. 2, p. 11758–11763, 2012.
- GIBBONS, A. et al. Transgénesis : una moderna biotecnología reproductiva en animales de interés zootécnico. **RIA**, v. 40, n. 2, p. 141–144, 2014.
- GOLJANEK-WHYSALL, K. et al. Ageing in relation to skeletal muscle dysfunction: redox homeostasis to regulation of gene expression. **Mammalian Genome**, v. 27, n. 7–8, p. 341–357, 2016.
- GUILLAUMOND, F. et al. Differential Control of Bmal1 Circadian Transcription by REV-ERB and ROR Nuclear Receptors. **Journal of Biological Rhythms**, v. 20, n. 5, p. 391–403, 2005.
- HARFMANN, B. D.; SCHRODER, E. A.; ESSER, K. A. Circadian Rhythms, the Molecular Clock, and Skeletal Muscle. **Journal of Biological Rhythms**, v. 30, n. 2, p. doi: 10.1177/0748730414561638, 2015.
- HASTY, P. et al. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. **Nature**, v. 364, p. 501-506, 1993.
- HINITS, Y. et al. Defective cranial skeletal development, larval lethality and haploinsufficiency in Myod mutant zebrafish. **Developmental Biology**, v. 358, n. 1, p. 102–112, 2011.
- HINITS, Y.; OSBORN, D. P. S.; HUGHES, S. M. Differential requirements for myogenic regulatory factors distinguish medial and lateral somitic, cranial and fin muscle fibre populations. **Development**, v. 136, n. 3, p. 403–14, 2009.
- HIROTA, T.; FUKADA, Y. Resetting Mechanism of Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. **Zoological Science**, v. 21, n. 4, p. 359–368, 2004.
- HODGE, B. A. et al. The endogenous molecular clock orchestrates the temporal separation of substrate metabolism in skeletal muscle. **Skeletal muscle**, v. 5, p. 17, 2015.

HOUDEBINE, L. M. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. **Journal of Biotechnology**, v. 98, n. 2-3, p. 145–160, 2002.

HUANG, C. et al. Germ-Line Transmission of a Myocardium-Specific GFP Transgene Reveals Critical Regulatory Elements in the Cardiac Myosin Light Chain 2 Promoter of Zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 228, p. 30–40, 2003.

HUNT, T.; SASSONE-CORSI, P. Riding Tandem: Circadian Clocks and the Cell Cycle. **Cell**, v. 129, n. 3, p. 461–464, 2007.

JETTEN, A. M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. **Nuclear receptor signaling**, v. 7, p. e003, 2009.

JOHNSTON, I. A; BOWER, N. I.; MACQUEEN, D. J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. **The Journal of experimental biology**, v. 214, n. Pt 10, p. 1617–1628, 2011.

JU, B. et al. Recapitulation of fast skeletal muscle development in zebrafish by transgenic expression of GFP under the mylz2 promoter. **Developmental Dynamics**, v. 227, n. 1, p. 14–26, 2003.

JUNTTI, S. A.; HU, C. K.; FERNALD, R. D. Tol2-Mediated Generation of a Transgenic Haplochromine Cichlid, *Astatotilapia burtoni*. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. 1–6, 2013.

KARDASH, E. Current Methods in Zebrafish Research. **Labome the World Laboratories**. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.2.109>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

KAWAKAMI, K. Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. **Genome Biology**, v. 8, p. S7.1-S7.10, 2007. Doi:10.1186/gb-2007-8-S1-S7

KAWAKAMI, K.; SHIMA, A. Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish (*Oryzias latipes*) that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish (*Danio rerio*). **Gene**, v. 240, n. 1, p. 239–244, 1999.

KO, C. H.; TAKAHASHI, J. S. Molecular components of the mammalian circadian clock. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 2, p. 271–277, 2006.

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.

KORF, H. W.; VON GALL, C. Mice, melatonin and the circadian system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 252, p. 57–68, 2006.

KUES, W. A.; NIEMANN, H. Advances in farm animal transgenesis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 2, p. 146–156, 2011.

KWAN, K. M. et al. The Tol2kit: A multisite gateway-based construction Kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. **Developmental Dynamics**, v. 236, n. 11, p. 3088–3099, 2007.

- LASSAR, A. B. et al. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. **Cell**, v. 66, n. 2, p. 305–315, 1991.
- LAZADO, C. C. et al. Daily Rhythmicity of Clock Gene Transcripts in Atlantic Cod Fast Skeletal Muscle. **Plos One**, v. 9, n. 6, p. 1–12, 2014.
- LEFTA, M.; Wolff, G.; ESSER, K. A. Circadian Rhythms, the Molecular Clock, and Skeletal Muscle. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 96, p. 231-271, 2011.
- LELE, Z.; KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**, v. 14, n. 1, p. 57–72, 1996.
- LI, Y. et al. Analysis of a Gene Regulatory Cascade Mediating Circadian Rhythm in Zebrafish. **Plos Computational Biology**, v. 9, n. 2, 2013.
- LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353–367, 2007.
- LIN, C.; CHIANG, C.; TSAI, H. Zebrafish and Medaka : new model organisms for modern biomedical research. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 11, p. 1–11, 2016.
- LIU, C. et al. Molecular evolution and functional divergence of zebrafish (*Danio rerio*) cryptochrome genes. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-15, n. 8113. 2015.
- LUDOLPH, C.; KONIECZNY, S. F. Transcription myogenic factor program families : muscling in on the. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 15, p. 1595-1604, 2016.
- MAGUIRE, R. J.; ISAACS, H. V.; POWNALL, M. E. Early transcriptional targets of MyoD link myogenesis and somitogenesis. **Developmental Biology**, v. 371, n. 2, p. 256–268, 2012.
- MAYEUF-LOUCHART, A.; STAELS, B.; DUEZ, H. Skeletal muscle functions around the clock. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 17, n. S1, p. 39–46, 2015.
- MAYWOOD, E. S. et al. Genetic and molecular analysis of the central and peripheral circadian clockwork of mice. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 72, p. 85–94, 2007.
- MAZZOCCOLI, G.; PAZIENZA, V.; VINCIGUERRA, M. Clock Genes and Clock-Controlled Genes in the Regulation of Metabolic Rhythms. **Chronobiology International**, v. 29, n. 3, p. 227–251, 2012.
- MCCARTHY, J. J. et al. Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle. **Physiological Genomics**, v. 31, n. 40, p. 86–95, 2007.
- MEGENEY, L.A.; RUDNICKI, M.A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochemistry and Cell Biology**, v.73, n.9-10, p.723-732, 1995.
- MINISTERIO DA SAUDE. Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil. Série B. **Textos Básicos de Saúde**, 2010, 134 p.

MISTLBERGER, R.E. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 18, n. 2, p. 171-195, 1994.

NABESHIMA, Y. et al. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. **Nature**, v.364, n.6437, p.532-535, 1993.

NOCHE, R. R. et al. Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. **BMC Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 7, 2011.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em Tempo Real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, p. 10–13, 2004.

PEEK, C. B. et al. Circadian Regulation of Cellular Physiology. **Methods in Enzymology**, p. 597-616, 2015.ISSN0076-6879.

PEREIRA, D. S.; TUFIK, S.; PEDRAZZOLI, M. Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 31, n. 1, p.63-71, 2009.

PORAZINSKI, S. R.; WANG, H.; FURUTANI-SEIKI, M. Microinjection of Medaka Embryos for use as a Model Genetic Organism. **Journal of Visualized Experiments**, n. 46, p. 1-4, 2010. doi:10.3791/1937.

RAGHUPATHY, S. K.; PATNAIK, S. R; SHU, X. Transgenic Zebrafish Models for Understanding Retinitis Pigmentosa. **Cloning and Transgenesis**, v. 2, n. 2, 2013.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, p. 935-841, 2002.

ROSSI, G.; MESSINA, G. Comparative myogenesis in teleosts and mammals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 16, p. 3081–3099, 2014.

RUDNICKI, M. A et al. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1351–1359, 1993.

RUIJTER, J. M. et al. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, 2009.

SATO, T. K. et al. A functional genomics strategy reveals rora as a component of the mammalian circadian clock. **Neuron**, v. 43, n. 4, p. 527–537, 2004.

SCHIAFFINO, S.; BLAAUW, B.; DYAR, K. A. The functional significance of the skeletal muscle clock : lessons from Bmal1 knockout models CRY. **Skeletal Muscle**, p. 1–9, 2016.

SCHIERHOLT, A. S. et al. Análise filogenética do gene da miogenina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 156–162, 2008.

SCHRODER, E. A. et al. Intrinsic muscle clock is necessary for musculoskeletal health Key points. **The Journal of Physiology**, v. 24, p. 5387–5404, 2015.

SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4-5, 2012.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 13–34, 2008.

STUART, G. W.; McMURRAY, J. V; WESTERFIELD, M. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. **Development (Cambridge, England)**, v. 103, n. 2, p. 403–412, 1988.

SUMANAS, S.; LIN, S. Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. **Drug Discovery Today: Targets**, v. 3, n. 3, p. 89–96, 2004.

SUSTER, M. L. et al. Transgenesis in Zebrafish with the Tol2 Transposon System. **Transgenesis Techniques: Methods in Molecular Biology**, v. 56, p. 41-63, 2009.

SUSTER, M. L. et al. Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish. **Nature Protocols**, v. 6, n. 12, p. 1998-2021, 2011.

TAKAHASHI, J. S. Finding New Clock Components: Past and Future. **Journal of Biological Rhythms**, v. 19, n. 5, p. 339-347, october 2004.

TAKAHASHI, J. S. Molecular Neurobiology and Genetics of Circadian Rhythms in Mammals. **Annual Review of Neuroscience**, v. 18, p. 531-53, 1995.

TAPSCOTT, S. J. The circuitry of a master switch: Myod and the regulation of skeletal muscle gene transcription. **Development**, v. 132, n. 12, p. 2685–2695, 2005.

TOLOZA-VILLALOBOS, J.; ARROYO, J. I.; OPAZO, J. C. The Circadian Clock of Teleost Fish: A Comparative Analysis Reveals Distinct Fates for Duplicated Genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 80, n. 1, p. 57–64, 2015.

TONELLI, F. P.; ARAÚJO, A. R.; RESENDE, R. R. Transgenia de peixes: a microinjeção em foco. **Instituto nano cell**, v.1, n.1, 2013.

VALENZANO, D. R.; SHARP, S.; BRUNET, A. Transposon-Mediated Transgenesis in the Short-Lived African Killifish *Nothobranchius furzeri*, a Vertebrate Model for Aging. **G3: Genes, Genomes and Genetics**, v. 1, n. 7, p. 531–8, 2011.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT -PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1–12, 2002.

VATINE, G. et al. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. **FEBS Letters**, v. 585, n. 10, p. 1485–1494, 2011.

VILLAMIZAR, N. et al. Effect of Lighting Conditions on Zebrafish Growth and Development. **Zebrafish**, v. 11, n. 2, p. 173-181, 2014.

WANG, H. et al. Inactivation of Zebrafish *mrf4* Leads to Myofibril Misalignment and Motor Axon Growth Disorganization. **Developmental Dynamics**, v. 237, p. 1043–1050, 2008.

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*)**. 5th Edition. 2007.

WHITMORE, D.; FOULKES, N. S.; SASSONE-CORSI, P. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. **Nature**, v. 404, n. 6773, p. 87–91, 2000.

WOOD, W. M. et al. MyoD-expressing progenitors are essential for skeletal myogenesis and satellite cell development. **Developmental Biology**, v. 384, n. 1, p. 114–127, 2013.

XU, Y. et al. Asynchronous activation of 10 muscle-specific protein (MSP) genes during zebrafish somitogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 219, n. 2, p. 201–215, 2000.

XU, Y. et al. Fast Skeletal Muscle-Specific Expression of a Zebrafish Myosin Light Chain 2 Gene and Characterization of Its Promoter by Direct Injection into Skeletal Muscle. **DNA and Cell Biology**, v. 18, n. 1, 1999.

YERGEAU, D. A. et al. Transposon transgenesis in *Xenopus*. **Methods**, v. 51, n. 92-100, 2010.

ZHDANOVA, I.V. et al. Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. **Brain Research Interactive**, v. 903, p. 263-268, 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Curva de melt (dissociação) dos genes do relógio e fatores miogênicos

