



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS

INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO SOBRE O RELÓGIO MOLECULAR E O EIXO
SOMATOTRÓPICO DE ALEVINOS DA TILÁPIA-DO-NILO
(Oreochromis niloticus)

MÁRCIA DANTAS DOS SANTOS

JOÃO PESSOA (PB)

2017

MÁRCIA DANTAS DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO SOBRE O RELÓGIO MOLECULAR E O EIXO
SOMATOTRÓPICO DE ALEVINOS DA TILÁPIA-DO-NILO**
(Oreochromis niloticus)

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFPB como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ian Porto G. do Amaral
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

JOÃO PESSOA (PB)

2017

S237i Santos, Márcia Dantas dos.

Influência do fotoperíodo sobre o relógio molecular e o eixo somatotrópico de alevinos da Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) / Márcia Dantas dos Santos. - João Pessoa, 2017.

68 f.: il. -

Orientador: Ian Porto G. do Amaral.

Coorientador: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBiotec

1. Fisiologia. 2. Aquicultura. 3. Psicicultura. 4. *Zeitgebers*.
5. Ritmo circadiano. I. Título.

UFPB/BC

CDU: 612(043)

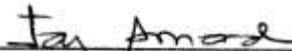
MÁRCIA DANTAS DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO SOBRE O RELÓGIO MOLECULAR E O
EIXO SOMATOTRÓPICO DE ALEVINOS DA TILÁPIA-DO-NILO
(*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFPB como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Aprovado em 31 de maio de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

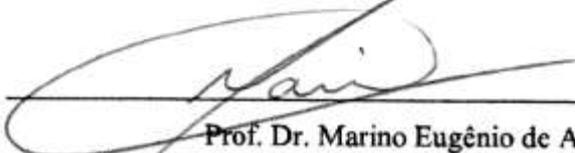
(Orientador – Departamento de Biologia Celular e Molecular/CBIOTEC/UFPB)

Prof.^a Dr.^a Camille de Moura Balarini

(Examinadora Interna – Departamento de Fisiologia e Patologia/CCS/UFPB)

Prof.^a Dr.^a Ilma Simoni Brum da Silva

(Examinadora Externa – Departamento de Fisiologia/ICBS/UFRGS)



Prof. Dr. Marino Eugênio de Almeida Neto

(Examinador Externo – Departamento de Ciência Animal/CCHSA/UFPB)

Dedico esse trabalho à DEUS e aos meus queridos e amáveis pais, Manoel Roberto e M^a Auxiliadora. Amo imensamente vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à DEUS Pai, Filho e Espírito pela graça de tê-los, de ser providência em tudo que faço e ser inspiração para minha existência. Isso reflete de maneira singular e alegre, também, na construção desse trabalho. Graças e louvores te dou e darei!

Aos meus queridos pais. Como não amar aqueles que me deram o dom da vida? Por eles e para eles repenso minhas atitudes, minhas necessidades, mas não desconstruindo aquilo que eles me ensinaram ser, “eu”. Grata pelo cuidar, amar e, sobretudo, pelo confiar. Ahhhh como sou feliz por serem em mim e ser representação concreta de DEUS para minha vida. AMOOOO VOCÊS!

Aos meus irmãos Mariele Karisssa e Marcos Roberto pelo acreditar silencioso, pelo admirar de maneira oculta e pelo amar, aos seus modos. Vocês são meus, seus chatos!

Às minhas avós Maria Erenita (marizinha) e Maria Antônia (mocinha) pelo amor e carinho que sempre foi expresso. Obrigada por todas as lágrimas derramadas, todas as preocupações, alegrias e ao entusiasmo em me ver crescer profissionalmente que sempre foi compartilhado. Lindas do meu viver!

Aos meus parentes, pelas vibrações conjuntas diante das minhas realizações.

Às girls do ap 204 na pessoa de Larissa (sempre será chamada assim. Kkkk) com seu jeito descontraído, leve e muito divertido alegrava o meu ser; à Jordana, a patricinha mãezona exacerbada e intensa que com suas “maluquices” me fazia rir à toa; e a Aninha que sempre foi minha companheira, minha confidente, pela paciência e pelo respeitar diante dos meus silêncios.

Aos meus queridos irmãos do grupo de oração Unidos pela Fé que proporcionaram diversas alegrias. Sou grata à Preta pela capacidade linda de me ajudar a enxergar as soluções quando estão além do meu olhar e pelo ombro amigo que sempre dispôs. És dom de DEUS pra mim! Aos meus queridos e dedicados pastores Bruna e Edú, aos meus meninos Breno e Jefferson por todo carinho e amor ofertado (lindos de marcinha); à Akylles pela alegria constante; ao quarteto querido Guga, Jéssica, Beth e Aline.

Aos meus “companheiros científicos” do LABOrA que passaram a ser meus queridos. À Jú, minha alma gêmea (heheh). Você foi e é demonstração do zelo de DEUS para comigo. Nos encontramos em nós mesmas, partilhamos tantas emoções (loucuras desenfreadas. kkk), tantas incertezas foram mutuamente vividas, o medo da incapacidade nos uniu tanto que em tudo passou a ser o binómio Marcinha/Jú. O que seria de mim sem a sua capacidade, girl?!!

Seria só lágrimas e medos difíceis de serem superados. Mas, como DEUS é bom e em todo tempo Ele é, você (coisa linda) veio para ser alegria e reflexo do cuidado dEle. À minha menina Anna Jú sempre amável e querida. Selamos uma amizade cheia de muito carinho partilhado, cumplicidade, intimidade e, sobretudo, irmandade. Serás sempre a minha menina querida! À Cayro por toda força e pelo grande carinho. À Eliza que com seu jeito “um tanto peculiar” ajudou muito na minha adaptação ao lab. Muito obrigado pelo dispor! À Lucas que no seu silêncio me ajudou diante das minhas dúvidas. À Rafa pelo menino super legal que é. E aos agregados Alba, a minha linda menina travessa que arranca de mim um bem querer e um querer cuidar e a Marrero que, mesmo sendo indiscreto, tenho um grande carinho.

Aos meus colegas de mestrado Clênia, Taísa, Cris, James e Atalia. Obrigado, sobretudo, pela força, ajuda e animação para comigo. Cada um com seu jeitinho conquistou meu coração. Sou uma pessoa muito fácil (Kkk). Vocês são ótimooooos!

Aos professores e colegas que conquistei em Porto Alegre Thaisa linda que não media esforços pra me ajudar, a Gabriel sapeca, Emílio besta, querida Carmem, a gaúcha Jordana e a baiana Amanda. Vocês contribuíram para que o retorno ao meu estado se tornasse difícil (heheh). Muito feliz por conhecê-los.

À todos com quem tive a enorme alegria de conviver durante o meu experimento no setor de Aquicultura. Aos funcionários na pessoa de seu Doda, seu Zezinho, Francélio e Sil. Muito obrigado pela disponibilidade incansável e os ensinamentos que, por sinal, foram muitos. Aos estudantes Felipe que contribuiu de maneira singular para os meus experimentos no setor; a Rony, que com seu jeito de ser me fazia rir mesmo quando o choro se fazia presente, você é demais, boy!; à Matheus pela simplicidade, ajuda e todo carinho ofertado; à Fabiano pelo carinho e cuidado; Renne pelo jeitão “pidão” e amável de ser; à Ery e a Josuel. As minhas queridas estagiárias Mylle e Cynthia que chegaram de forma inusitada e tanto me ajudaram. A menina Mylle pela disponibilidade e o grande respeito e a Cynthia pelo companheirismo, por me permitir adentrar sua intimidade como se fosse a sua melhor amiga (que Milena não veja isso. kkk) e me ajudar enxergar o mundo e as pessoas sob uma nova ótica. E por fim, minha querida Milena pelo ser humano divino e maravilhoso que é, que me fez e faz sentir a pessoa mais querida do mundo. Seu cuidado, seu amor encanta meu coração (você é o meu amorzinho, linda do meu ser). Todos me ajudaram no trabalho físico, me ajudaram lidar com minhas emoções diante das dificuldades e cuidaram de mim de forma muito carinhosa. “Muito thanksssssss”!

Ao professor Carlos por todo carinho, ajuda ofertada e disponibilidade!

Ao querido professor Marino. Sou imensamente grata pela sua disponibilidade, pelo seu cuidado, pelos seus “SIMs” cruciais para realização da minha pesquisa. Na última instância o conheci e você me acolheu de maneira muito querida e tudo providenciou na minha estadia ao setor de Aquicultura. Obrigada pela oportunidade que me destes em aprender de forma bastante concreta e prática. Viestes para somar em tudo, prof!

Ao meu orientador Ian. Ser sua orientanda foi uma graça vinda do céu pra esse tempo. A princípio, o que estaria por vir inflamava o meu coração de medo e insegurança. Viver o novo ao seu olhar, ao seu ensinar tranquilizava o meu ser porque era uma forma leve de me ajudar a transpor as minhas limitações. Durante esse tempo adquiri conhecimento em áreas diversas a partir dos seus ensinamentos. Muitíssimo agradecida por tudo que aprendi, desde o transpor dados no excel à análise de expressão gênica. Oh vida suada e aluna complicada, não é?!(kkk). Você não apenas tem o dom da docência, mas o de conquistar as pessoas ao seu redor pelo ser humano que és. Muito e muito obrigada pela disponibilidade, paciência de ensinar e me escutar.

À minha co-orientadora Tatjana que sempre se dispôs a ajudar. Muito obrigado por todo incentivo!

À todos os laboratórios parceiros.

À Agência financiadora CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela oportunidade e a bolsa concedida.

Vocês todos foram cuidado de DEUS para comigo.

MUITO GRATA!

*Te chamam de Deus e de Senhor
Te chamam de Rei, de Salvador
E eu me atrevo a Te chamar de meu Amor
Yeshua, Yeshua
Tu és tão lindo
Que eu nem sei me expressar
Yeshua, Tu és tão lindo [...]*

RESUMO

A maioria dos organismos vivos possuem um ciclo habitual do qual desenvolve todas suas atividades. Estas são geradas internamente pelo relógio molecular e sincronizadas pelos fatores abióticos a um período em torno de 24 horas. Para os peixes, o fotoperíodo é um dos sincronizadores ambientais que apresenta uma grande influência sobre o relógio molecular, coordenando fatores ambientais com sua fisiologia. Um dos sistemas que parece estar sob a influência do relógio molecular endógeno é o sistema endócrino, precisamente, o eixo somatotrópico. Para investigar a relação entre o relógio e o sistema endócrino, objetivamos analisar a expressão de um gene do relógio molecular, o *clock1a*, e o gene do eixo somatotrópico, *gh*, de alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) quando expostos aos fotoperíodos de 12h:12h claro:escuro(C:E) e 24h (C:C); e verificar a influência do fotoperíodo sobre o comprimento, massa, crescimento corporal e fator de condição. Os alevinos foram mantidos no fotoperíodo por 52 dias e a biometria foi realizada nos dias 0, 7, 22, 37 e 52. Ao final da exposição, os animais foram sacrificados e o cérebro foi extraído para quantificação da expressão gênica. Em relação ao comprimento não observamos diferenças em função do fotoperíodo, exceto, nos tempos 22 e 37 (dias), cujas médias foram de $4,95 \pm 0,36$, $4,75 \pm 0,41$ e $6,65 \pm 0,66$, $6,39 \pm 0,68$ cm para o C:C e C:E, respectivamente. No tocante a massa corporal, teve-se diferença apenas no dia 7, com $1,08 \pm 0,23$ C:C e $0,98 \pm 0,23$ g C:E, respectivamente. No que se refere ao crescimento, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, exceto entre o dia 7 e 37 que apresentaram um crescimento diferenciado entre os fotoperíodos. Com relação ao fator de condição, os dados não revelaram diferenças significativas. Os genes analisados não apresentaram padrão circadiano de expressão, mas o gene *clock1a*, apresentou diferenças nos seus níveis diários, isto é, entre os pontos de amostragem para aos dois fotoperíodos. Também foram observadas oscilações de expressão maiores para o fotoperíodo C:E para o gene *clock1a*. O *gh*, por sua vez, não apresentou um ritmo biológico como também ausência de diferenças entre os tempos. Por fim, foi testada a possibilidade de uma correlação entre os genes supracitados nas suas respectivas condições de fotoperíodo. Contudo, os escores resultantes foram altamente distantes de qualquer correlação. Em síntese, a exposição aos fotoperíodos não interferiram de maneira significativa em relação as variáveis biométricas e entre os genes do relógio molecular e do eixo somatotrópico.

Palavras-chave: Ritmo circadiano. *Zeitgebers*. Fisiologia. Desenvolvimento. Aquicultura.

ABSTRACT

The most of living organisms have a habitual cycle from which they perform all their activities. These are generated internally by the molecular clock and synchronized by the abiotic factors to a period around 24 hours. For fish, the photoperiod is one of the environmental synchronizers that has a great influence on the molecular clock, coordinating environmental factors with its physiology. One of the systems that seems to be under the influence of the endogenous molecular clock is the endocrine system, precisely the somatotrophic axis. To investigate the relationship between the clock and the endocrine system, we aimed to analyze the expression of a molecular clock gene, *clock1a*, and the gene of the somatotrophic axis, *gh*, of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings when exposed to photoperiods from 12h: 12h light: dark (C: E) and 24h (C: C); And to verify the influence of the photoperiod on the length, mass, body growth and condition factor. The fingerlings were kept in the photoperiod for 52 days and biometry was performed on days 0, 7, 22, 37 and 52. At the end of the exposure, the animals were sacrificed and the brain was extracted for quantification of gene expression. Regarding the length, we observed no differences as a function of the photoperiod, except at times 22 and 37 (days), whose averages were 4.95 ± 0.36 , 4.75 ± 0.41 and 6.65 ± 0.66 , 6.39 ± 0.68 cm for C: C and C: E, respectively. Regarding body mass, difference was only observed on day 7, with 1.08 ± 0.23 C: C and 0.98 ± 0.23 g C: E, respectively. Regarding the growth, no significant differences between treatments were observed, except between day 7 and 37 that presented a differentiated growth between the photoperiods. Regarding the condition factor, the data did not reveal significant differences. The analyzed genes did not present a circadian pattern of expression, but the *clock1a* gene showed differences in their daily levels, that is, between the sampling points for the two photoperiods. Also, larger expression oscillations were also observed for the C: E photoperiod for the *clock1a* gene. The *gh*, in turn, did not present a biological rhythm as well as absence of differences between the times. Finally, the possibility of the correlation between the genes mentioned above in their respective photoperiod conditions was tested. However, the resulting scores were highly distant from any correlation. In summary, exposure to photoperiods did not significantly interfere with the biometric variables and between the molecular clock genes and the somatotrophic axis.

Keywords: circadian rhythm. *Zeitgebers*. Physiology. Development. Aquaculture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Evolução histórica sobre a descoberta do relógio molecular.....	18
Figura 2 – Ilustração simplificada do mecanismo do relógio molecular em vertebrados.....	20
Figura 3 – Vias de sinalização do ritmo biológico em vertebrados	23
Figura 4 – Distribuição geográfica das principais espécies produzidas pela aquicultura no Brasil.....	27
Figura 5 – Sistema de cultivo utilizado no experimento.....	34
Figura 6 – Pontos de medição para avaliação do comprimento.....	35
Figura 7 – Desenho experimental: esquematização do experimento de fotoperíodo e de amostragem do tecido cerebral	37
Figura 8 – Comprimento Padrão (CP) das tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C a partir dos dias 0, 7, 22, 37 e 52.....	40
Figura 9 – Massa corporal das tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C a partir dos dias 0, 7, 22, 37 e 52.....	41
Figura 10 – Crescimento das tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C a partir dos dias 0, 7, 22, 37 e 52.....	42
Figura 11 – Relação massa corporal/comprimento total das tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C.....	13
Figura 12 – Expressão gênica do <i>clock1a</i> e <i>gh</i> do cérebro das tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers e suas sequências.....	38
Tabela 2 – Coeficiente de correlação de <i>Pearson</i> entre as variáveis de medidas CP, CB e CT de tilápias submetidas a um ciclo de C:C e C:E.....	39
Tabela 3 – Fator de condição das tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C.....	43
Tabela 4– Coeficiente de correlação de <i>Spearman</i> entre os genes <i>clock1a</i> e <i>gh</i> de tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

ANA	Agência Nacional de Água
<i>Aanat</i>	<i>arilalquilamina N-acetiltransferase</i>
<i>Aanat2</i>	parálogo do gene <i>anat</i>
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>
C:C	claro:claro
C:E	claro:escuro
CCGs	<i>clock controlled genes</i> (genes controlados pelo relógio)
<i>clock</i>	<i>circadian locomotor output cycles kaput</i>
<i>cry</i>	<i>cryptochrome circadian clock</i>
CP	comprimento padrão
CB	comprimento da bifurção
CT	comprimento total
GH	Hormônio do crescimento
GHRH	Hormônio liberador do hormônio do crescimento
GHR	Receptor do hormônio do crescimento
HIOMT	hidroxi-indol-O-metiltransferase
IGFs	fatores de crescimento semelhantes à insulina
<i>myf6</i>	<i>myogenic factor 6</i>
<i>myoD</i>	<i>myogenic differentiation factor</i>
NAT	N-acetiltransferase
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PACAP	peptídeo pituitário ativador da adenilato ciclase
PAS	<i>Period-ARNT-Single-Minded domain</i> (domínio período-ARNT-single minded)
<i>Per</i>	<i>Period</i>
ROREs	<i>Retinoic Acid-Related Orphan Receptor Response Element</i>),

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 RELÓGIO BIOLÓGICO: ASPECTOS CONCEITUAIS	17
2.1.1 Divisão do relógio biológico e sincronização: relógios centrais e periférico	20
2.1.1.1 Relógio biológico em peixes teleósteos	22
2.2 EIXO SOMATOTRÓPICO	24
2.3 AQUICULTURA E PISCICULTURA: PANORAMA MUNDIAL E NACIONAL	26
2.3.1 Características gerais da tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	28
2.3.2 Fotoperíodo e sua relação com aspectos fisiológicos da tilápia-do-Nilo.....	29
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO GERAL	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1 CULTIVO DA TILÁPIA-DO-NILO.....	33
5.2 Medidas biométricas: comprimento, massa corporal.....	34
5.3 Amostragem: ritmo circadiano do gene <i>gh</i> e do relógio molecular <i>clock</i> em alevinos ..	36
5.4 Extração do RNA total do tecido cerebral e síntese de cDNA	37
5.5 PCR quantitativa (qPCR).....	37
5.6 Análise estatística	38
6 RESULTADOS	39
6.1 EFEITO DO FOTOPERÍODO EM PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	39
6.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO <i>clock1a</i> E <i>gh</i> DO TECIDO CEREBRAL NOS FOTOPERÍODOS C:E E C:C	43
7 DISCUSSÃO	46
7.1 EFEITO DO FOTOPERÍODO EM PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	46
7.1.1 Análise biométrica	46
7.1.2 Fotoperíodo	47
7.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RELÓGIO MOLECULAR E DO EIXO SOMATOTRÓPICO DA TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDAS AOS FOTOPERÍODOS C:E e C:C	49
8 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICE A – Curvas de dissociação (<i>melting</i>) para o produto do gene do relógio molecular, do eixo somatotrópico e os genes de referência.....	66

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, os seres vivos foram expostos continuamente a diversas mudanças provocadas, principalmente, pelas variações do meio ambiente. Com isso, desenvolveram estratégias de adaptação que, através de reajustes internos diários, possibilitaram sua sobrevivência. Assim, os organismos tornam-se capazes de gerar e coordenar oscilações rítmicas endógenas sincronizadas com as modificações cíclicas diárias do meio ambiente. Estas oscilações rítmicas diárias levaram à denominação do ciclo circadiano (do Latim: *circa*= cerca; *diem*= dia) (RIVAS, 2012).

Atividades biológicas com ciclo circadiano, por sua vez, são aquelas marcadas por eventos moleculares, fisiológicos e comportamentais que variam em torno de 24 horas, controlados por fatores externos como luz, temperatura, alimentação, dentre outros. Internamente estes ciclos são regulados pelo relógio molecular (PEREIRA; TUFIK; PEDRAZZOLI, 2009). Em sua maioria, os organismos vivos têm seus hábitos coordenados pelo fotoperíodo, que corresponde à duração do tempo de luz em um ciclo de 24 horas (HARB, 2013). Em mamíferos, os relógios são regidos por estímulos ambientais, a exemplo da luz e da temperatura, principalmente (DIBNER ; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010). O relógio é composto por uma gama de genes envolvidos em processos de expressão gênica, responsáveis na geração dos ritmos biológicos (TOLOZAVILLA-LOBOS; ARROYO; OPAZO, 2015).

No caso dos peixes, o fotoperíodo é o sincronizador ambiental que apresenta maior influência sobre o relógio molecular, agindo sobre os aspectos alimentares, locomotores e somáticos (VERAS, 2011), os quais recebem controle do eixo somatotrópico. Por exemplo, foi observado em salmão do Atlântico que constituintes do eixo somatotrópico apresentaram um padrão circadiano de atividade em conformidade com os genes do relógio molecular (KIM; WHITE; DEVLIN, 2015).

Acredita-se que no eixo somatotrópico contém um relógio endógeno envolvido na sinalização da produção dos hormônios hipotalâmicos (BECQUET et al., 2014), responsáveis direta ou indiretamente em regular múltiplas funções no organismo como o crescimento e desenvolvimento corporal por meio da modulação do hormônio de crescimento (GH) (COSTA, 2015).

Em vista disso, os organismos estão susceptíveis a sofrer variações internas, modulações em toda a fisiologia quando expostos aos sincronizadores que possuem habilidade em agir sobre os ritmos biológicos. No caso de peixes, a manipulação do fotoperíodo tem sido um agente

colaborador para o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de cultivo de espécies de interesse comercial (TAYLOR; MIGAUD, 2009; BIZARRO, 2013).

Apesar de existirem pesquisas recentes de caracterização do ritmo circadiano em algumas espécies de peixe, informações acerca do mecanismo do relógio endógeno em espécies tropicais de interesse comercial e sua importância para a fisiologia do crescimento ainda são escassas. Acerca disso, foi observado até o momento, apenas, o trabalho de Costa (2016), de caracterização do relógio em tilápias por meio da análise do tectum óptico e hipotálamo.

Assim, objetivamos analisar a expressão de um gene do relógio, o *clock1a*, e do gene do hormônio de crescimento, *gh*, no cérebro de alevinos da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) quando expostos aos fotoperíodos de 12h:12h e 24h:0h claro:escuro. Nossa hipótese é que a condição de 24h claro constante resultará numa expressão diferenciada, podendo estar envolvida no aumento do tamanho, peso e crescimento da espécie, que são características biométricas relatadas na literatura para um fotoperíodo de luz constante.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RELÓGIO BIOLÓGICO: ASPECTOS CONCEITUAIS

A maioria dos seres vivos, se não todos, possuem um ciclo habitual no qual desenvolve todas suas atividades (BELLPEDERSEN et al., 2005; ANDREWS et al., 2010). Estas são geradas por um relógio interno, o relógio molecular, que faz com que esses ritmos sigam um ciclo diário (KORENČIČ et al., 2014). É uma maquinaria molecular composta por uma rede de genes que se diferencia em quantidade e em natureza entre as espécies, envolvidos nos processos de expressão gênica culminando em fatores de transcrição (proteínas), os quais são responsáveis por gerar os processos biológicos (TOLOZAVILLA-LOBOS; ARROYO; OPAZO, 2015).

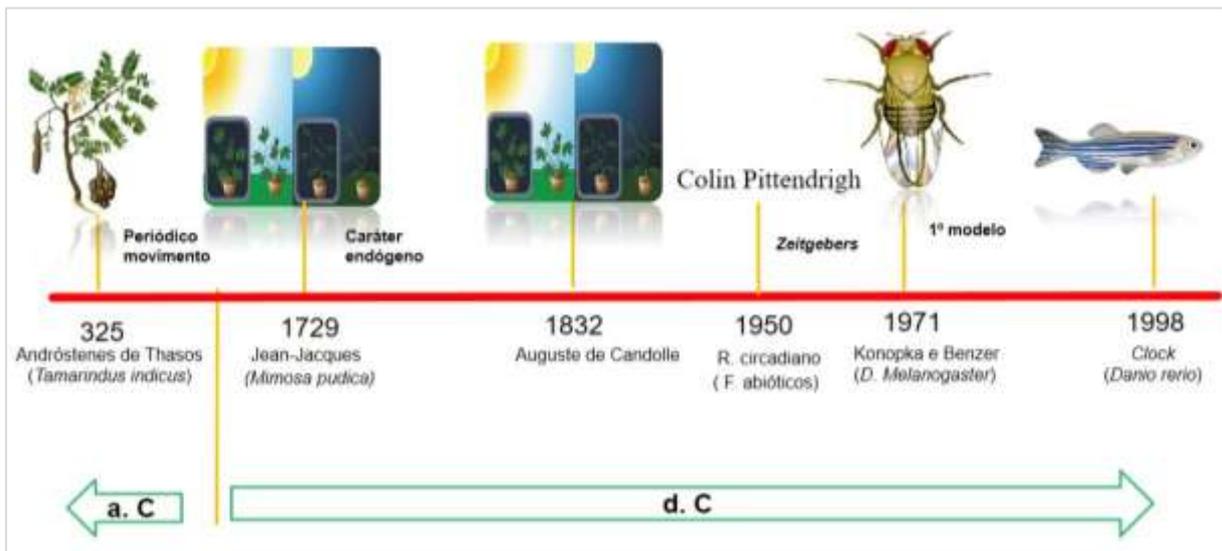
Um dos primeiros indícios acerca de ritmos biológicos surgiu por volta do ano de 325 a. C, por meio de observações empíricas sobre o movimento periódico diário foliar da espécie *Tamarindus indicus* (tamarindo) pelo historiador Thasos. Ao longo da história acreditou-se que esse relógio era regido por fatores abióticos. No entanto, apenas no ano de 1729 se questionou a existência de um sincronizador interno. O mesmo foi conceituado posteriormente de relógio molecular, diante de um experimento realizado pelo astrônomo francês Jean-Jacques que, ao aclimatar a planta dormideira (*Mimosa pudica*) a um ciclo de escuro constante, observou que o abrir e fechar das folhas se mantinha semelhante a um ciclo de fotoperíodo normal, demonstrando o caráter endógeno do relógio molecular (MOORE-ED; SULZMAN; FULLER, 1982; MARQUES; MENNA-BARRETO, 1999; FREITAS, 2015).

Em 1832, o botânico Augustin de Candolle ao submeter a dormideira a um período de escuro constante constatou um atraso diário no seu movimento foliar, um período de 22 a 23 horas, o qual, posteriormente, foi designado como período de livre-curso. Por volta de 1950 foi demonstrado por Colin Pittendrigh que esse período de livre-curso poderia ser sincronizado, “acertado”, a um ciclo de 24 horas por fatores abióticos (PITTENDRIGH, 1993; FOSTER; KREITZMAN, 2005; AMORETTY, 2013). A primeira elucidação acerca do relógio molecular surgiu em 1971 a partir de um estudo realizado com moscas da espécie *Drosophila melanogaster*. As investigações evoluíram e, hoje, sabe-se que a maioria dos seres vivos possui diversos relógios moleculares (KONOPKA; BENZER, 1971; HARB, 2013) nos diferentes tecidos e atuando de maneira independente, como evidenciado pela expressão do *clock* no

cérebro e em órgãos periféricos de vertebrado não mamífero, peixe-zebra (*Danio rerio*) (WHITMORE et al., 1998). Ver Figura 1.

Nos mamíferos, o relógio molecular é constituído de pelo menos 12 proteínas distintas e, dentre elas, as mais relevantes são: BMAL1 (do inglês, *brain and muscle Arnt-like-protein 1*); CLOCK (do inglês, *circadian locomoter output cycles kaput*); PER (period1, 2, e 3); CRY (cryptochrome 1 e 2); e os receptores órfãos REV-ERBa e ROR (PANDO; SASSONECORSI, 2001; HONMA et al., 2002; DARDENTE; CERMAKIAN, 2007; CECON; FLÔRES, 2010). A base do funcionamento do relógio, que permite a sincronização do ambiente com as atividades biológicas, se dá por mecanismos homeostáticos denominados de alça de retroalimentação negativa e positiva (TOSINI et al., 2008; MOTA, 2010).

Figura 1 – Sequenciamento de relatos históricos sobre o relógio molecular.



Fonte: a autora (2017).

Em 325 a. C surgiu a primeira observação sobre a existência de ritmos biológicos, através de Thasos que observou o movimento foliar do tamarindo. No ano de 1729 Jean submeteu a planta dormideira a um ciclo de escuro constante e notou que o abrir e fechar das folhas se mantinha semelhante a um ciclo de fotoperíodo normal, demonstrando o caráter endógeno do relógio molecular. O botânico Augustin percebeu que acontecia um atraso no movimento foliar na ausência do fotoperíodo. Em 1950 Colin demonstrou que esse ciclo poderia ser sincronizado, “acertado”, a um ciclo de 24 horas pelos *zeitgebers*. E no ano de 1971 surgiu a primeira comprovação do relógio molecular a partir de um estudo realizado com moscas da espécie *Drosophila melanogaster*.

Inicialmente, para que haja a interação das moléculas do relógio faz-se necessário a presença de dois domínios em sua estrutura: o PAS (do inglês, *Per-Arnt-Single minded*) e o bHLH (do inglês, *basic helix loop helix*). O Primeiro permite a interação entre os fatores de transcrição CLOCK e BMAL1 para formar o heterodímero CLOCK:BMAL1. O segundo permite que o heterodímero se ligue a elementos Ebox, que são sequências nucleotídicas na região promotora de alguns genes, como os de *per* (1, 2 e 3) e *cry* (1 e 2). Em suma, esses

domínios são necessários para que as proteínas se liguem ao DNA e ativem a transcrição de genes do relógio molecular (MURRE et al., 1989; GEKAKIS et al., 1998; CECON; FLÔRES, 2010). A alça de retroalimentação negativa acontece através da inativação do CLOCK:BMAL1 pelo PER E CRY. O CLOCK e BMAL1 são transcritos e traduzidos em proteínas no citoplasma. Nesta etapa, forma-se o heterodímero CLOCK:BMAL1 que é translocado para o núcleo celular para ativar outros genes, entre eles, o *per* e *cry*. Quando *per* e *cry* são traduzidos em proteínas e, ao atingirem altos níveis de concentração citoplasmáticos, retornam ao núcleo por um processo de translocação para interagirem com o heterodímero CLOCK:BMAL1 e inativar sua ativação. Assim sendo, não haverá mais transcrição do *per* e *cry*, resultando num perfil sigmóide de expressão dos fatores positivos e negativos em fases contrárias. Experimentos realizados em peixe-zebra indicaram que a luz tem um controle sob a ativação do *per2* (VATINE et al., 2009) e do *cry1a* por meio da ativação dos elementos Ebox destes genes, os quais tem ação inibitória sobre o heterodímero CLOCK:BMAL (TAMAI; YOUNG; WHITMORE, 2007). Contudo, os níveis de PER e CRY vão decrescendo até se tornarem insuficientes para reprimir CLOCK:BMAL, reiniciando um novo ciclo (LEE et al., 2001; PREITNER et al., 200; SATO et al., 2004; TAKAHASHI et al, 2008). A alça positiva acontece através da ativação do CLOCK:BMAL1, que irá promover a autoativação contínua, ativação de genes participantes da maquinaria do relógio e de outros que não fazem parte do mesmo, mas que estão interligados com o relógio, como os CCGs, genes controlados pelo relógio (do inglês, *clock-controlled genes*). CCGs integram informações do relógio (moléculas) com a fisiologia (MARKUS; BARBOSA-JUNIOR; FERREIRA, 2003; SCHIBLER, 2007; HASTINGS; MAYWOOD; READDY, 2008; HARB, 2013) como foi constatado com o *MyoD*, o qual possui um ritmo circadiano que está envolvido na regulação morfológica e funcional do músculo esquelético de ratos (ANDREWS et al., 2010). Além da via de ativação positiva do CLOCK:BMAL1 e da alça de retroalimentação negativa PER:CRY, foi identificada uma via auxiliar envolvida na ativação e inibição do CLOCK:BMAL1. Esta via alternativa é baseada na transcrição de *rev-erba* e *rora*, os quais, traduzidos em proteínas, competem entre si pela ligação aos elementos responsivos ao ROR (ROREs – *Retinoic Acid-Related Orphan Receptor Response Element*), presentes no promotor de *bmal1*. O RORA ativa a transcrição de *bmal1* enquanto que REV-ERB promove sua inibição (YOO et al., 2005; KO; TAKAHASHI, 2006; JETTEN, 2009; CECON; FLÔRES, 2010). Esses ciclos são finalizados em um período de 24 horas (WU et al., 2014), sendo que pela manhã os fatores de transcrição CLOCK e BMAL1 são ativados, e à noite os genes *per* e *cry* são reprimidos até iniciar um novo ciclo (LEE et al., 2001;

para a maioria dos seres, influente no deslocamento de fase do relógio (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010). Essa via luminosa é indispensável e suficiente para sincronizar o núcleo supraquiasmático (NSQ) em mamífero, no sistema nervoso central, ao ciclo ambiental (GIBSON; WILLIAMS; KRIEGSFELD, 2009; MOTA, 2010).

Hierarquicamente, o relógio circadiano de mamíferos se divide em dois grandes grupos: o relógio molecular central localizado no NSQ no hipotálamo, considerado o “marcapasso” do relógio biológico; e os relógios moleculares periféricos (RICHARDS; GUMZ, 2012; HARB, 2013), presentes na maioria dos tecidos dos organismos vivos. Dessa forma, a atuação do relógio central é sincronizar todos os relógios e integrar informações da periferia para gerar ritmos sistêmicos coordenados no organismo (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010). Em relação a peixes, evidências indicam que a glândula pineal tem agregado funções análogas ao do NSQ em mamíferos, que vão desde a fotorrecepção à síntese e liberação hormonal. No entanto, o papel da glândula pineal como órgão central no relógio biológico de peixes ainda é muito discutido (KORF; SCHOMERUS; STEHLE, 1998; BEM-MOSHE; FOULKES; GOTHILF, 2014).

O mecanismo de captação da luz ocorre da seguinte forma: a informação a respeito do ciclo claro e escuro é conduzida via aferente pela retina e transmitida através do trato retino-hipotalâmico ao NSQ que, posteriormente, por eferência, transmite informações para os osciladores periféricos via fatores humorais ou através da inervação autonômica (HASTING; HERZOG, 2004; HARB, 2013). No caso dos mamíferos, a glândula pineal é considerada a via eferente responsável por transmitir a informação fotoperiódica circadiana e sazonal, que se efetua através da secreção de melatonina (BROMAGE et al., 1995; SINGH; SINGH; TRIPATHI, 2012), a qual confere ritmicidade metabólica para o restante do corpo (AMARAL, 2011).

A melatonina é um dos principais fatores humorais que atuam e sincronizam os relógios periféricos com os centrais (KORF; VON-GALL, 2006). A ativação desse hormônio acontece quando o relógio molecular ao ser ativado no NSQ emite projeções neurais para o núcleo paraventricular (PVN), após para o gânglio cervical superior (SCG) e glândula pineal, estimulando-a (TAKAHASHI, 1994). A síntese da melatonina se dá através da ativação da enzima N-acetiltransferase (ANAT), que ao ser ativada no escuro, metaboliza a serotonina em N-acetil-serotonina e, ao sofrer ação da enzima hidroxil-indol-O-metiltransferase (HIOMT), é metabolizada em melatonina e lançada na circulação. Foi constatado em peixes que o heterodímero CLOCK:BMAL1 é responsável por dirigir a transcrição da *aanat2* na pineal

culminando com a produção da proteína AANAT2 (N-acetiltransferase) (FALCON et al., 2011). A melatonina deixa de ser produzida quando a ANAT sofre degradação pelos proteossomas, um processo iniciado na luz (MARKUS; BARBOSA-JUNIOR; FERREIRA, 2003; ACÚRCIO; RODRIGUES, 2009). Logo após ser secretada, a melatonina se distribui para diversos tecidos e, depois de metabolizada, é excretada (REITER, 1991; SOUZA NETO; CASTRO, 2008). O pico da melatonina plasmática ocorre entre o período de 2 a 6 horas da manhã (DOUGLAS, 2006; TEUBNER; BARTNESS, 2009; MOTA, 2010). O perfil do nível plasmático da melatonina é igual nos peixes e nos mamíferos, e é tida como marcador temporal, uma vez que sua expressão muda conforme o tempo, notadamente, à noite ela está ativa. Por isso, se destaca e é caracterizada como uma molécula de cronometragem que contribui para melhor compreensão do ritmo circadiano (UNDERWOOD, 1989; ARENDT, 1997; EKSTRZM; MEISSL, 1997; FALCÓN et al., 2007).

2.1.1.1 Relógio biológico em peixes teleósteos

O número de genes envolvidos no relógio molecular não é igual para todas as espécies. No caso de peixes teleósteos (peixes ósseos), acredita-se que isso deve-se à duplicação de todo o genoma que ocorreu em seu ancestral comum (TOLOZAVILLA-LOBOS; ARROYO; OPAZO, 2015). Como exemplo de um teleósteo tem-se o peixe-zebra, no qual foram identificados vários genes do relógio molecular e estes exibem um número de cópias diferentes dos mamíferos, possuindo três parálogos para o gene *bmal* (*bmal1a*, *1b* e *bmal12*), três para o *clock* (*clock1a*, *1b* e *clock2*), quatro para o *per* (*per1a*, *per1b*, *per2* e *per3*), e seis *cry* (*cry1a* e *1b*, *cry2a* e *2b*, *cry3* e *cry4*) (VATINE et al., 2011).

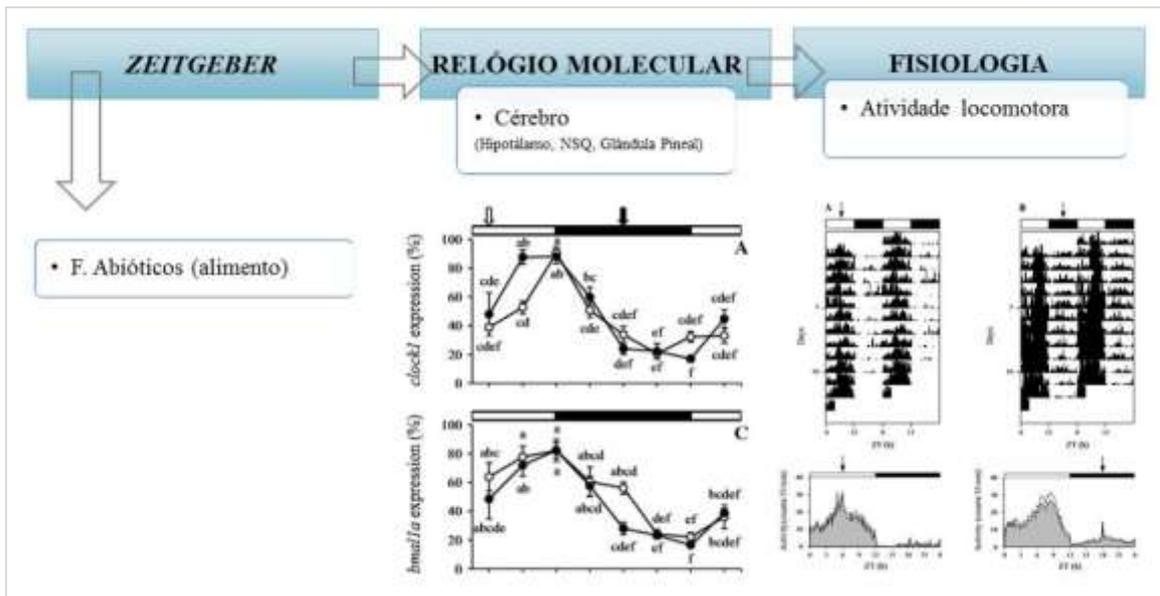
O mecanismo de captação da luz em peixes acontece em diferentes zonas anatômicas, seja através dos olhos, através da pineal e/ou, provavelmente, pelos fotorreceptores localizados no cérebro (GERN et al., 1992; MIGAUD et al., 2006, 2007; FALCÓN et al., 2010). Também é discutida a possibilidade de fotorrecepção nos tecidos periféricos diretamente (WHITMORE et al., 1998).

Foi identificado em teleósteo uma estrutura anatomofisiologicamente similar ao NSQ de mamíferos, no entanto, em peixe-zebra mutante (embriões) para a região do cérebro ventral ausente, a qual inclui o NSQ, não se encontrou alterações dos ritmos circadianos na pineal podendo ser iniciados e mantidos na ausência dessa região. Porém, observou-se uma redução da intensidade dos ritmos em condições constantes de fotoperíodo 14h:10h claro:escuro. Observou-se também que, ao submeterem os embriões mutantes a condições ambientais

constantes, os níveis de expressão da *Aanat2* (um parálogo do gene *ANAT* que funciona na síntese da melatonina) mantiveram-se sem mudanças rítmicas (NOCHE et al., 2011). Nesse sentido, fica evidente que o NSQ não é crucial para o funcionamento circadiano do peixe-zebra no período embrionário, visto que o ritmo circadiano se manteve na pineal. Seu papel como órgão central ainda é muito discutido, uma vez que um estudo realizado com órgãos periféricos do peixe-zebra em cultura revelou que quando estes eram submetidos diretamente à luz o relógio biológico era sincronizado no seu respectivo tecido (WHITMORE et al., 1998). A expressão de alguns genes do relógio como também de seus parálogos se diferencia, apresentando picos robustos, no mesmo tecido e de tecido para tecido. Isto é, em peixes observou-se oscilação de sua expressão em diferentes tecidos, diferentemente do que se observa em mamíferos, os quais apresentam um padrão de expressão constante. Sugerindo, assim, a existência de relógios periféricos que são sincronizados independentemente de uma via central (CERMAKIAN et al., 2000).

A sinalização pela melatonina é outra possível diferença do mecanismo do relógio circadiano em peixes ósseos. Os receptores para melatonina foram identificados em diferentes regiões do cérebro e da retina (VERNADAKIS; BEMIS; BITTMAN, 1998; GAILDRAT; FALCON, 1999; MAZURASIS et al., 1999; FALCÓN et al., 2007), porém diante da variabilidade entre as espécies de teleósteos, ainda não se tem uma explicação conclusiva sobre a ação da melatonina secretada pela glândula pineal (EKSTRZM; MEISSEL, 1997; FALCÓN et al., 2009; FALCÓN et al., 2010; BEM-MOSHE; FOULKES; GOTHILF, 2014). Um dos órgãos alvo da melatonina nos peixes é o hipotálamo e/ou a hipófise. No hipotálamo age estimulando os fatores hipotalâmicos que, por sua vez, modula a secreção de vários hormônios na hipófise para agir nos tecidos periféricos, a exemplo o hormônio do crescimento. Assim, o hormônio melatonina age indiretamente na reprodução, na atividade locomotora (Figura 3), no metabolismo dos peixes e no crescimento somático (FALCÓN et al., 2010; BIZARRO, 2013).

Figura 3- Vias de sinalização do ritmo biológico em vertebrados.



Fonte: Adaptado de Costa et al. (2016).

Representação esquemática acerca das vias envolvidas na ativação do relógio biológico. Fatores externos como alimentação, temperatura e fotoperíodo sincronizam o relógio molecular, que desencadeia várias respostas fisiológicas como atividade locomotória, por exemplo.

Em teleósteos, há também vias eferentes regulada pelos CCGs, que atuam na produção de várias substâncias, dentre elas, neurotransmissores, hormônios, fatores de transcrição, e moléculas de sinalização intracelular, as quais estabelecem uma sintonia cíclica entre a fisiologia de todo o organismo (DUFFIELD, 2003; BOZEK et al., 2009; CECON; FLÔRES, 2010). Por exemplo, um dos CCGs no músculo esquelético é o *myf6* (um fator de transcrição com atividade de regulação da miogênese), o qual apresentou um padrão diário de expressão em paralelo com *bmal1* e *clock1* em peixe-zebra (AMARAL; JOHNSTON, 2012), apontando para a possível relação entre o relógio molecular e a regulação da manutenção do tecido muscular esquelético, de forma similar ao que foi observado em camundongos, sendo que o CCG nesse organismo foi o *myoD* (ANDREWS et al., 2010).

2.2 EIXO SOMATOTRÓPICO

O hipotálamo e a hipófise são glândulas bastante importantes na manutenção da fisiologia, pois produzem e controlam vários hormônios envolvidos no processo de crescimento e desenvolvimento do peixe, a exemplo do peptídeo pituitário ativador da adenilato ciclase (PACAP) e do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH). Ambos possuem características e efeitos semelhantes, porém, com eficiências diferentes. O GHRH tem efeito

quase insignificante na secreção de GH (MONTERO et al., 2000). Já o PACAP estimula a liberação do GH pela hipófise anterior com maior intensidade e efetividade. Diante disso, estudos evidenciam o PACAP como o principal estimulador fisiológico da liberação do GH em peixes (CANOSA; CHANG; PETER, 2007).

O GH age induzindo a produção de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), os quais, atuam na superfície das células sinalizando eventos intracelulares (COSTA, 2015); atuam nos respectivos receptores, em diferentes tipos celulares alvos, estimulando a transcrição gênica, sendo o IGF-1 seu principal mediador (MORIYAMA; AYSON; KAWAUCHI, 2000; BUTLER; LE ROITH, 2001; KURADOMI, 2009). Em tilápias, observou-se o aumento da expressão do GHR2 na presença do GH no fígado, mas não do GHR1. No entanto, este apresentou expressão na presença de alguns hormônios envolvidos no metabolismo, como cortisol e insulina (PIERCE et al., 2012).

Em peixes, o tecido hepático é o principal sítio para produção de IGF, não excluindo sua expressão nos demais órgãos (WOOD; DUAN; BERN, 2005; COSTA, 2015), os quais, exercem efeitos autócrino e parácrino (WOOD et al., 2005; KURADOMI, 2009). Entre os diversos fatores de transcrição e de crescimento, o IGF-1 contribui para proliferação e diferenciação das células satélites, crescimento hiperplásico e/ou hipertrófico da musculatura (MARECO, 2012).

O GH em peixes possui uma pulsatilidade em relação a sua expressão e níveis séricos, e é comumente modulado por fatores abióticos a exemplo da temperatura, fotoperíodo (BJÖRNSSON et al., 1989; KIM; WHITE; DEVLIN, 2015), salinidade e fase de desenvolvimento (AYSON; TAKEMURA, 2006; COSTA, 2015). Tem atividade multifuncional e generalizada como mobilização proteica nos diversos órgãos, melhora da conversão alimentar no período de crescimento, promoção da lipólise, glicogenólise, gliconeogênese e hiperfagia (BJÖRNSSON, 1997). Em juvenis de salmão, verificou-se que a inibição da somatostatina contribuiu de maneira acentuada para o aumento do crescimento e do peso nessa fase (MAYER et al., 1994). Já em juvenis de tilápia, administração exógena de GH não afetou a expressão do seu respectivo gene. Pois, esperava-se que pelo mecanismo de retroalimentação negativa o hormônio inibisse a sua transcrição. Excluindo, assim, o mecanismo de retroalimentação negativa como principal regulação, mas a predominante atuação da somatostatina sobre a regulação do GH (COSTA, 2015).

Em ratos, foram identificados transcritos do relógio na adenohipófise sugerindo a presença de um relógio circadiano, o qual pode estar envolvido na sinalização da produção

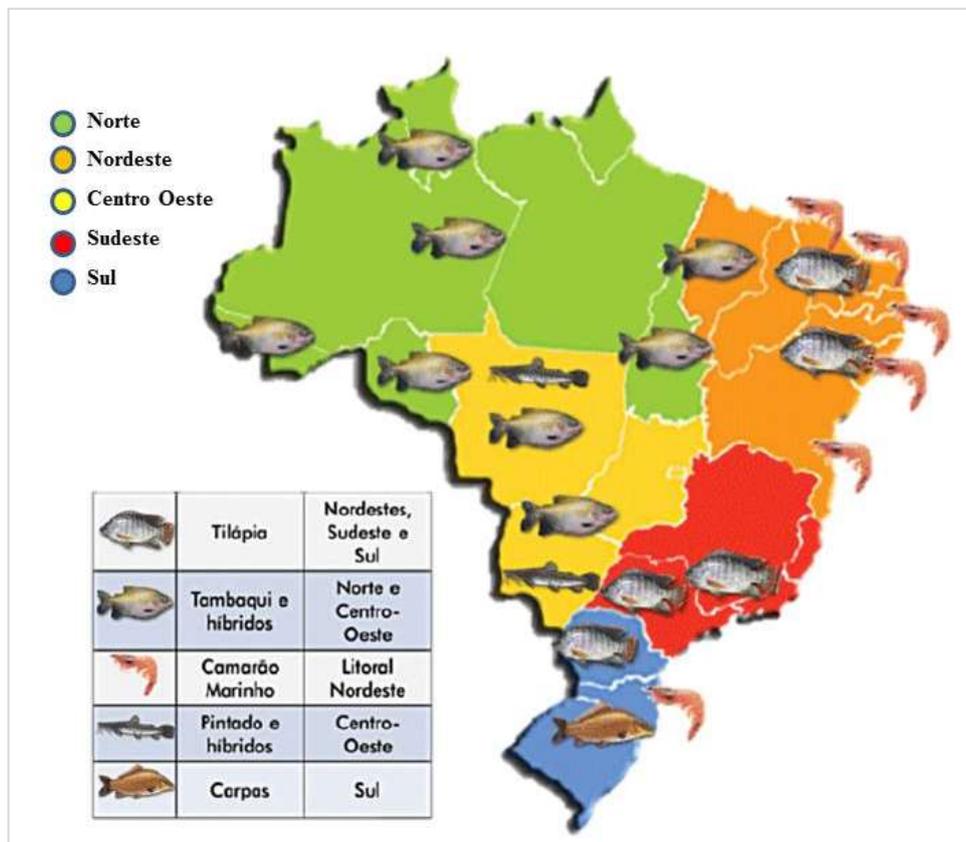
hormonal pela glândula, e não apenas sua ativação sob o comando dos fatores hipotalâmicos. Estes podem estar envolvidos com sincronização do relógio, na sua amplitude, e na secreção hormonal, pois há evidências de uma regulação e não de uma via de produção constitutiva, o que ainda não está elucidado (BECQUET et al., 2014). Em consonância com esta hipótese, foram observadas na hipófise do salmão prateado transgênico para o GH e não-transgênico diferenças significativas no crescimento corporal, como também na expressão dos principais genes do relógio molecular. Evidenciando, assim, a participação do relógio molecular na sincronização e regulação do crescimento corporal, que envolve a modulação da atividade nas vias metabólicas (KIM; WHITE; DEVLIN, 2015).

2.3 AQUICULTURA E PISCICULTURA: PANORAMA MUNDIAL E NACIONAL

A aquicultura é caracterizada como uma atividade agropecuária que tem como intuito cultivar organismos aquáticos, a qual nos últimos tempos tem tido um intenso crescimento. Dentro dessa categoria estão elencadas várias subcategorias segundo a classe de organismo, são elas: Algicultura (cultivo de alga), Ostreicultura (cultivo de ostras), Carcinicultura (cultivo de camarão), piscicultura e outros. Esta última trata-se do cultivo de peixes, podendo ser em água doce (piscicultura continental) ou em água marinha (piscicultura marinha) (SEBRAE, 2015). Em suma, aquicultura abrange o cultivo, geralmente, em um ambiente restrito e controlado (EMBRAPA, 2016). Em nível de produção da aquicultura, o continente asiático tem liderado, estando no topo da lista com 91% do total, logo após a América com 3,5% e Europa com 3,4% da produção aquícola mundial (SEBRAE, 2015). Nesse sentido, a produção total de pesca em águas marinhas, no ano de 2014, foi de 81,5 milhões de toneladas, destacando-se a China, Indonésia, EUA, Federação Russa e Japão como os principais países pesqueiros, com 14.8; 6.01; 4.95; 4 e 3.63 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2016). Mundialmente, no ano de 2014 foram produzidos 167,2 milhões de toneladas de peixes, sendo 93,4 milhões oriundos da pesca e 73,8 milhões do cultivo. Frente ao mercado, tem estado entre os produtos alimentares mais comercializados com um valor aproximado de exportações de 148 bilhões, com tendência de crescimento. Isso se deve a relevância nutricional dessa fonte de proteína (FAO, 2016). Na atualidade, foram registrados dados bastante positivos em relação à aquicultura no Brasil. Totalizou-se um valor de produção de R\$ 3,87 bilhões, com 70,2% proveniente da piscicultura e 20,5% da carcinicultura. Com relação à produção de peixes pela piscicultura, registrou-se uma produção de 474,33 mil toneladas tendo um valor total de R\$ 2.714.555.511,00. A piscicultura continental, no Brasil, tem fomentado cada vez mais esse cenário de expansão, devido ao grande

crescimento produtivo nas últimas décadas. A espécie que tem contribuído de maneira importante para esse panorama é a tilápia, atingindo em 2014 uma produção aquícola de 260 mil toneladas (KUBITZA, 2015). Em sequência, o tambaqui, tambacu e tambatinga, carpa e outros (IBGE, 2014), que apresentam uma distribuição diferente entre as regiões do país, similarmente ao que ocorre com camarões. O Nordeste e a região Sudeste detém uma produção significativa da tilápia, tendo essa última uma menor produção em relação a pintado, peixes redondos e outros. No Centro-Oeste os peixes redondos (tambaqui, pacu, pirapitinga e híbridos) respondem pela maior parte das quase 70.000 toneladas produzidas na região com menor produção de pintado, piraputanga, matrinxã, piaçu e curimatã. Na região Norte prevalece a produção de tambaqui e seus híbridos, sendo produzidos em menor proporção matrinxã, pintado da Amazônia, pirarucu, curimatã e piau. E na região Sul, tem predominado a produção de carpas (KUBITZA, 2012) (Figura 4). Os principais focos de produção de tilápia no Brasil se concentram no Ceará, Bahia, Pernambuco, São Paulo, Minas Gerais e Paraná, as quais são cultivadas principalmente em tanques-redes e em viveiros (KUBITZA, 2015).

Figura 4 – Distribuição geográfica das principais espécies produzidas pela aquicultura no Brasil.



Fonte: Adaptado de Panorama da Aquicultura (2012).

Diante desse cenário, o Brasil é um país com um elevado potencial para o desenvolvimento da aquicultura, pois agrega fortes condições para seu incentivo, principalmente ambientais. São elas: a existência de mais de 11 mil rios, riachos e córregos listados na Agência Nacional de Águas – ANA e 219 reservatórios hidrelétricos localizados em 22 estados do país; detém de um território de 8,5 milhões de km²; possui uma diversidade de clima, temperatura e ecossistemas compatíveis com o cultivo de diversas espécies; apresenta regiões climáticas de características equatorial, tropical e subtropical; a zona costeira brasileira ocupa cerca de 3,5 milhões de quilômetros quadrados e corresponde a 41% da área emersa do País e tem 8.500 km de litoral; avalia-se se que o país detenha 13,7% de toda a água doce livre no planeta; existem mais de dois milhões de hectares e grandes reservatórios e barragens (estimadas em 30 a 35 mil km² de área alagada) e canais irrigados (cerca de 400 mil km apenas na região Nordeste) que favorecem o desenvolvimento do setor no Brasil, podendo se tornar, num futuro imediato, uma das maiores potências aquícolas do mundo (SEBRAE, 2015).

2.3.1 Características gerais da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

As tilápias pertencem à família *Cichlidae*, são espécies de caráter tropical, com preferência por águas rasas, e são onívoros. Compreendem 70 espécies distribuídas em 4 gêneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon*, *Tillapia* e *Danakilia*. No entanto, apenas o gênero *Oreochromis* se tornou viável para aquicultura mundial, pois se adapta bem às condições de cativeiro. As principais espécies cultivadas são: *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo), *Oreochromis mossambicus* (tilápia-de-Moçambique), *Oreochromis aureus* (tilápia áurea ou azul) e *Oreochromis urolepi shornorum* (tilápia-de-Zamzibar) (SEBRAE, 2015).

Em virtude das suas propriedades zootécnicas, a tilápia-do-Nilo tem se destacado como a espécie mais cultivada (KUBITZA, 2005; HALFEN et al., 2012). Ela fora introduzida aos países emergentes, inicialmente, como um meio de subsistência (FAO, 2015). Porém, devido à alta produtividade, o crescimento acelerado e a grande aceitabilidade pelo público consumidor, sua produção foi intensificada e expandida para escalas comerciais (CLEMENTS; LOVELL, 1994; HILDSORF, 1995; FURUYA et al, 2005; VERAS et al., 2014). Além dessas, agrega outras qualidades importantes como: rápida adequabilidade as variações ambientais, resistência ao manejo, sobrevivência frente à concentração mínima de oxigênio e as oscilações de temperatura e a reprodução precoce a partir de 2 meses de vida (TAVARES-DIAS; MORAES, 2010; BIZARRO, 2013). Em condições de cativeiro, sua reprodução acontece no fundo do viveiro onde o macho escava um ninho para que fêmea desove, após um ritual de acasalamento,

e ao desovar haja a fertilização (FAO, 2015). Nos sistemas de produção de tilápia se faz o cultivo de monossexo de macho fenotipicamente expresso, para evitar superpopulações dentro do sistema de cultivo. Por isso, há a realização da inversão sexual nos primeiros estágios de vida do peixe. Podendo ter como vantagem também o maior ganho de peso e crescimento dos machos, uma vez que estes possuem um crescimento acelerado em relação às fêmeas (SEBRAE, 2015). A inversão inicia logo após a fase de pós-larva, que são peixes com 8 a 13 mm, em seguida vem a fase de alevinos com peixes entre 3 e 6 cm, os juvenis a partir de 6 cm (>2g) com até 100 g e adultos quando atingem a maturidade sexual (KUBITZA, 2006). As tilápias podem desovar até 12 vezes num ano, chegando a desovar em torno de 800 a 2.000 óvulos. Inicia seu período reprodutivo por volta dos 5 meses de idade, podendo desovar com 2 meses de vida a depender das condições do cultivo (EMBRAPA, 2007). As tilápias atingem um peso de 600 a 800 gramas entre 4 e 6 meses de cultivo (SEBRAE, 2015). É um peixe de carne magra, saudável e apetitosa ao consumo para um grande segmento da população. Diante dessas características, as tilápias são bastante desejáveis para exploração comercial, fomentando assim, sua maior produção (OLIVEIRA, 2014).

2.3.2 Fotoperíodo e sua relação com aspectos fisiológicos da tilápia-do-Nilo

A tilápia sofre influência dos mais variados estímulos externos responsáveis pelo controle da reprodução, do desenvolvimento e crescimento. Um fator abiótico influenciador e importante é o fotoperíodo. Observou-se que esse estímulo age diretamente alterando sobre fisiologia (LOWEMCCONNELL, 1999; BEZERRA et al., 2008; BIZARRO, 2013). Assim sendo, o mercado tem empregado algumas técnicas de manejo, incorporando o fotoperíodo como um fator de aperfeiçoamento. A manipulação do fotoperíodo pode alterar toda a fisiologia do peixe, e na sua grande maioria tem apresentado resultados positivos (TAYLOR; MIGAUD, 2009; VERAS, 2011), mas que varia de acordo com a espécie, com a fase do seu desenvolvimento, da estação e da temperatura ambiental (BANI et al., 2009; NAVARRO; NAVARRO, 2012; BIZARRO, 2013).

A tilápia-do-Nilo, por sua vez, foi uma das espécies que, mediante o aprimoramento das técnicas de produção, começou a ser explorada em escala comercial (FAO, 2015). Em consonância com a afirmação supracitada, uma pesquisa realizada com o filé das espécies juvenis da tilápia-do-Nilo demonstrou que, quando esses foram expostos ao fotoperíodo de 18h:6h (claro:escuro) aumentou significativamente a síntese proteica. Porém, em contrapartida houve um decréscimo no acúmulo de gordura no peixe. Desta forma, observa-se que o

fotoperíodo pode ser um fator estimulante para síntese, mobilização e deposição de nutrientes (VERAS et al., 2014). Quanto ao aspecto comportamental, um estudo experimental feito com um grupo de machos adultos de tilápias-do-Nilo, expostos à luz constante, evidenciou um comportamento agressivo dentre os peixes, o qual foi aumentando à medida que aumentava a intensidade luminosa. Configura-se dessa forma, a luz como um agente modulador do comportamento (CARVALHO et al., 2013). No que se refere ao aspecto alimentar, uma análise feita com três grupos de tilápia-do-Nilo mantidos em tanques com temperatura controlada de 27°C (um pertencente ao gênero masculino, outro ao feminino e o outro grupo heterogêneo) revelou que todos, sem exceção, apresentaram maior atividade alimentar, predominantemente, de dia, cujos picos de atividade giravam em torno do amanhecer (06h30min e 07h30min) e ao entardecer (16h30min e 18h30min) (TOGUYENI et al., 1997). Quanto ao desenvolvimento das gônadas, outro ensaio realizado em ambos os sexos da espécie, submetida à luz artificial contínua em um ciclo de 24h:0h claro:escuro resultou numa diminuição do desenvolvimento gonadal na fase de alevinos. Nesse caso, a luz foi identificada como uma ferramenta negativa para a maturação sexual e reprodução. Também foi identificado que a luz artificial contínua aumentara o crescimento somático (RAD et al., 2006). Outra pesquisa elucidou essa questão: dentre cinco tratamentos de fotoperíodos diferentes, os ciclos de 18h:6h e 24h:0h claro:escuro induziram o melhor crescimento e o aumento de peso em alevinos (VERAS et al., 2013). Foi observado que tilápias machos juvenis quando expostos à diferentes fotoperíodos resultou em aumento do peso corporal num ciclo de 24h:0h claro:escuro. Porém, em relação ao comprimento corporal não foi observado diferenças significativas entre os ciclos (NAVARRO et al., 2015).

Faz-se necessária, assim, a ampliação de pesquisas com o peixe tilápia-do-Nilo que sejam capazes de esclarecer com exatidão e minuciosidade, toda a maquinaria molecular envolvida na regulação do relógio, como também os aspectos fisiológicos quando submetidos a um regime de luz artificial. Por exemplo, recentemente Costa (2016) identificou a existência de um ritmo endógeno em juvenis da tilápia sob condições constantes de alimentação e fotoperíodo, ressaltando a importância da caracterização do relógio molecular nesta espécie. Portanto, caracterizar o relógio durante as demais fases do ciclo de vida do peixe, analisando aspectos fisiológicos do crescimento contribuirá para o a compreensão dos efeitos desta via de regulação na biologia do animal.

3 JUSTIFICATIVA

O interesse em abordar a temática justifica-se diante da necessidade de verificar a relação da expressão circadiana de gene do relógio molecular com o do eixo somatotrópico em tilápia-do-Nilo (*Oreochormis niloticus*), em peixes submetidos a diferentes fotoperíodos. Inferindo-se assim que conhecer o relógio molecular, elucidar sua relação com o eixo somatotrópico e investigar a influência do fotoperíodo na fisiologia de crescimento da tilápia-do-Nilo se torna indispensável e relevante para estimular a ampliação de pesquisas que objetivem o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo desta espécie em benefício aos produtores, ao comércio e ao consumidor.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão do gene do relógio molecular *clock1a* e do gene do eixo somatotrópico, *gh*, no cérebro de alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) quando expostos aos fotoperíodos de 12h:12h e 24h:0h claro:escuro.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Averiguar a existência de um ritmo circadiano do *gh* no cérebro de alevinos da tilápia-do-Nilo em resposta a um ciclo de 12h:12h e 24h:0h claro:escuro;
- Averiguar se o gene *clock* mantém uma expressão circadiana no ciclo 12h:12h e 24h:0h claro:escuro;
- Verificar a influência do fotoperíodo sobre o comprimento, massa, crescimento corporal e fator de condição de alevinos da tilápia-do-Nilo submetidos à fotoperíodos de 12h:12h e 24h:0h claro:escuro;
- Correlacionar a expressão do *clock* com o *gh*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento de fotoperíodo foi realizado no laboratório de Aquicultura do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA/UFPB) – Campus Bananeiras no período de agosto a outubro de 2016. As amostras foram armazenadas e analisadas no Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos (LABOrA) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (CBiotec/UFPB). Toda manipulação foi conduzida conforme aprovação prévia do Comitê de Ética de Utilização Animal (CEUA) da UFPB (certidão N°0205/14).

5.1 CULTIVO DA TILÁPIA-DO-NILO

Foi utilizado um total de 150 alevinos, contabilizando uma possibilidade de mortalidade em torno de 15% resultando em 126 tilápias para amostragem. Os peixes foram apreendidos de HAPAS (tanque rede) com 2 m (comprimento) x 1 m (largura) x 1,5 m (altura) dentro de viveiros escavados de cultivo com 15 x 50 m² do setor de Aquicultura do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA/UFPB) – Campus Bananeiras, após terem sido submetidos à inversão sexual, a qual teve duração de 28 dias. Os espécimes apresentaram massa corporal inicial de 0,6±0,1 g e comprimento padrão de 2,8±0,2 cm. Depois de coletados foram divididos em dois grupos e transferidos para aquários de vidro com dimensões de 60 cm (comprimento) x 30 cm (largura) x 40 cm (altura). O povoamento se deu em seis aquários contendo 25 peixes cada, com 45 litros de água doce e fundo revestido por placas do filtro biológico de fundo. Sobre essa, foi disposto uma camada de lã para filtração e uma camada de 2 cm de areia com granulometria de 1,70mm. Um filtro biológico foi instalado acima de cada aquário, o qual por meio da bomba submersa promoveu a recirculação contínua da água do sistema. O filtro biológico constituiu-se de uma camada de brita, areia grossa e fina com granulometria de 2 e 1,70 mm, respectivamente, e lã para filtração. A limpeza se fazia pela sifonação do fundo do aquário para retirada dos dejetos, com troca de cerca de 10% de água do volume total. No entanto, quando os parâmetros de qualidade da água estavam elevados a troca era feita com retirada de até 50% do volume (Figura 5).

Figura 5 – Sistema de cultivo utilizado no experimento.



Fonte: a autora, 2017.

A) Viveiro escavado com 15x50 m² onde os peixes foram apreendidos do setor de Aquicultura do Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias (CCHSA/UFPB) – Campus Bananeiras. B) Montagem dos filtros biológicos e do sistema de recirculação de água. C) Povoamento dos aquários

Os peixes foram mantidos em salas distintas sob influência de dois fotoperíodos: 12/12h claro:escuro (fotoperíodo C:E) e 24h claro (fotoperíodo C:C). Os animais foram aclimatados durante 7 dias, com um período experimental de 52 dias. As luzes da sala com fotoperíodo C:E eram ligadas às 6:00h e desligada às 18:00h. As luzes da sala do fotoperíodo 24h C:C foram mantidas ligadas durante todo o tempo do experimento.

As tilápias foram arraçoadas 8 vezes ao dia nos horários a seguir: 7:30, 8:30, 9:30, 10:30, 13:30, 14:30, 15:30 e 16h:30min, com ração comercial em pó extrusada (Nutricol®, Nutrisítio) com teor de 55% de proteína bruta ofertada com uma taxa de 30% da biomassa. Após duas semanas, foram alimentados durante 15 dias *ad libitum* com ração peletizada/triturada (Presence®, Nutripiscis) contendo 40% de proteína bruta, 6 vezes ao dia nos horários: 8:30, 9:30, 10:30, 14:30, 15:30 e 16h:30min. Após esse período seguiu-se com ração peletizada/triturada (DuRancho®, Max peixe) 6 vezes ao dia contendo 32% de proteína bruta nos horários supracitados.

5.2 Medidas biométricas: comprimento, massa corporal

Realizou-se a análise do comprimento e massa corporal no início do povoamento (dia 0), após aclimação (dia 7) e seguiu-se com 3 mensurações a cada 15 dias, com total de 5

análises durante os 53 dias de experimento. Para tanto, utilizou-se 2 tanques de plásticos, capacidade para 10 L, com 5 L de água para o procedimento de anestesia; um contendo o anestésico (óleo essencial de cravo da Índia) e outro o tratamento profilático. Os peixes foram imersos no anestésico em tanques de plásticos com capacidade para 10 L, com 5 L de água. Para preparação deste foi diluído 1 mL do óleo essencial de cravo-da-Índia em 19 mL de álcool etílico à 100% para 1 ml/L de água. Passados alguns segundos após imersão no tanque de anestesia, os espécimes foram observados quanto à perda total do equilíbrio, ausência de movimento das nadadeiras e de natação, diminuição de movimentos operculares e de respostas táteis. Já o outro tanque com tratamento profilático possuía aeração constante e temperatura controlada de 27°C. A profilaxia se fez com sal grosso não iodado numa concentração de 30g/L, onde os peixes permaneciam em torno de 5 minutos. Em seguida, foi feita a pesagem numa balança centesimal® (0,01g capacidade 6200g, ref BL-6200AS), bem como a captura da foto para posterior determinação do comprimento, o qual foi determinado a partir do software ImageJ 1.49t® (National Institutes of Health, USA). Foram coletadas 3 medidas: comprimento padrão (CP) – da extremidade anterior da cabeça ao pedúnculo caudal; comprimento da bifurcação (CB) – da extremidade anterior da cabeça até o início da bifurcação da nadadeira caudal; e o comprimento total (CT) - da extremidade anterior da cabeça até o final da nadadeira caudal (Figura 6).

Para análise do fator de condição (K_n) foi utilizado o método de Le Cren (1951) cuja fórmula é $K_n: W_t = aL_t^b$. Onde W_t = massa total do peixe (g), L_t = comprimento total. Após análise da curva da relação massa/comprimento obtivemos valores dos coeficientes “a” e “b” que foram utilizados no cálculo dos valores teoricamente esperados de peso total (W_t) para um dado valor de L_t ; Aonde a = é a intercepção de regressão e b = é a inclinação da regressão. Ao final calculou-se um valor médio entre os fotoperíodos, o qual foi comparado ao valor centralizador, $K_n = 1,0$.

Figura 6 – Pontos de medição para avaliação do comprimento.

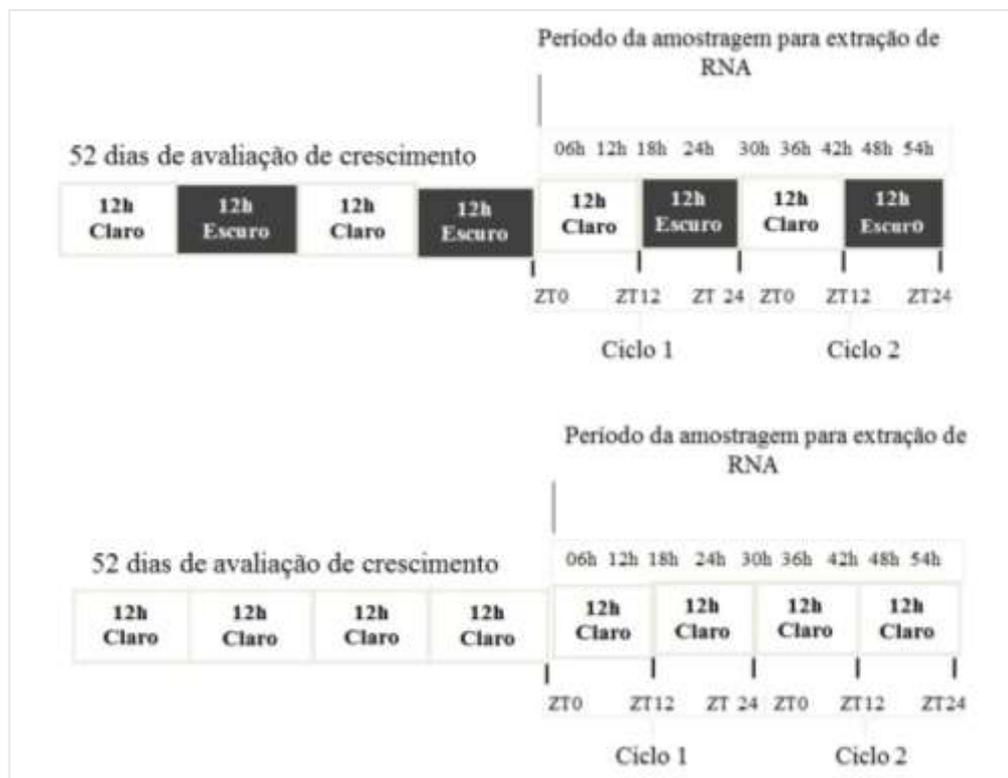


Fonte: a autora, 2017.

5.3 Amostragem: ritmo circadiano do gene *gh* e do relógio molecular *clock* em alevinos

A cada 6h, amostras de cada um dos fotoperíodos (n=7 peixes) foram transferidas dos seus respectivos aquários para a unidade de anestesia (foi diluído 1 mL do óleo essencial de cravo-da-Índia em 5 mL de álcool etílico à 100% para 5 ml/L de água) onde foram observados quanto à perda total do equilíbrio, ausência de movimento das nadadeiras e de natação, perda de movimentos operculares e de respostas táteis. Efetuou-se a amostragem aleatória dos aquários à cada 6 h durante um período de 54 horas, constituindo 9 pontos de tempo para o C:E e C:C. Os pontos foram: 06:00, 12:00, 18:00, 24:00, 30:00, 36:00, 42:00, 48:00 e 54:00h (ZT0, ZT6, ZT12, ZT18, ZT24, ZT30, ZT36, ZT42, ZT48 e ZT54, respectivamente). A cada ponto experimental, o tecido cerebral foi dissecado e extraído. O material extraído foi mantido em eppendorf contendo 300µL de RNA later ® (Sigma-Aldrich) e congelado a -22°C para os procedimentos seguintes (Figura 7).

Figura 7 – Desenho experimental: esquematização do experimento de fotoperíodo e de amostragem do tecido cerebral.



Nota: autora, 2017.

Os peixes foram aclimatados durante 7 dias nas duas condições de fotoperíodo. O experimento teve duração de 52 dias. Após esse período seguiu-se com a coleta do tecido cerebral num intervalo de 6h durante 54h, n=7 peixes por condição de fotoperíodo.

5.4 Extração do RNA total do tecido cerebral e síntese de cDNA

O RNA total das amostras de cérebro foi obtido por meio do método fenol:clorofórmio utilizando 500µL do reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação e a pureza foram mensuradas pela técnica de espectrofotometria através do aparelho NanoDrop® Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). A integridade do RNA total foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose. Para síntese de cDNA, foi utilizado o *Quantitect reverse transcription kit* (Qiagen) a partir do 1,0 µg de RNA total baseando-se nas instruções do fabricante.

5.5 PCR quantitativa (qPCR)

Para verificar a expressão do gene *clock1a* da alça positiva do relógio molecular e do *gh* pertencente ao eixo somatotrópico utilizamos a técnica de PCR quantitativa (qPCR). A mistura da reação continha 7,5µL do reagente Brilliant II SYBR Green QPCR LowRox Master Mix (*Stratagene*), 6µL do cDNA 0,25µmol.L⁻¹ de cada primer e água livre de nuclease para um volume final de 15µL em placas de 96 poços (Applied Biosystems). As reações foram executadas em duplicatas no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com a seguinte configuração de termociclo: ativação inicial a 95°C por 10 min seguida por quarenta ciclos de 95°C por 30 s (desnaturação), 60°C por 30 s (anelamento) e 72°C por 30 s (extensão). Ao final da extensão em cada ciclo, foram registradas as leituras de fluorescência no software 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystems). Nos controles negativos os componentes da mistura continham o Mix SYBR Green, um sem o template, o qual foi substituído por água livre de nuclease e outro com ausência dos primers. Ao final da reação foi produzida uma curva de dissociação (de 55 a 95°C) para verificar a existência de um único produto através do pico de dissociação das amostras para cada gene (Apêndice A). A expressão gênica foi avaliada pelo Ct (*Cycle Threshold*). Para calcular a eficiência da reação utilizamos o software LinRegPCR versão 12.5 (RUIJTER et al., 2009). Para a normalização das amostras foi gerado um fator de normalização em relação aos genes de referência (*18s* e *ef1a*) utilizando o software Genorm versão 3.5 (VANDESOMPELE et al., 2002), com valor de M<1.5. Os resultados de expressão foram gerados como unidades arbitrárias (u.a.). As sequências dos primers f (*forward*) e r (*reverse*) do *clock1a* utilizadas na pesquisa foram desenhadas no software Primer Premier V5.0 por meio das sequências dos transcritos registradas na base de dados do

Ensembl e NCBI (Tabela 1). Foram utilizados os iniciadores (*f* e *r*) para o *gh* de Costa (2015) e o *18s* e *ef1a* ho de Yang e colaboradores (2013).

Tabela 1- Primers e suas seqüências.

Gene	f/r Sentido do Primer 5'-3'	Tm °C	P pb	R ²	E %	Gene ID	Referência
		Genes de referência					
<i>ef1a</i>	f: CCGAGCCCCCTACAGC r: CGCTCAATCTCCATCCCTTC	82,3	181	0,99	91	ENSONIE00000231595	Yang et al. (2013)
<i>18s</i>	f: GGACACGGAAAGGATTGACAG r: GTTCGTTATCGGAATTAACCAGAC	79,1	111	0,99	86	JF698683	Yang et al. (2013)
		Genes alvos					
<i>clock1a</i>	f: ATGGGTTGATGGAAGAAGATGAAAA r: ACATTGAACTGGTCTCGCCG	78,0	88	0,99	93	ENSONIE00000113572	Este trabalho
<i>Gh</i>	f: GCAACGTCAGCTCAACAAAA r: ACAGCCTTGGTGAAATCTGG	82,1	204	0,99	88	ENSONIE00000119211	Costa (2015)

Nota: Símbolo do gene registrado na base de dados, seqüência dos primers forward (f) e reverse (r), temperatura de melting (Tm), p corresponde ao tamanho do produto em pb (pares de base), eficiência dos primers (E) e ID do gene.

5.6 Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à sua distribuição a partir do teste de Kolmogorov-Sminorv. Foi realizado o teste de correlação de *Pearson* entre as variáveis CP, CB, CT e massa corporal, seguido do teste-t para análise de diferença de médias entre os dois fotoperíodos. Para análise do crescimento utilizou-se o modelo linear geral. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Conover para os dados de expressão gênica, por não apresentarem distribuição normal. A correlação entre a expressão do *clock1a* e *gh* foi analisada pelo teste de Spearman. Foram consideradas médias estatisticamente diferentes aquelas cujos resultados do teste estatístico foram menores que 0,05 ($p < 0,05$). Com exceção da análise de expressão gênica, que foi realizada no programa BrighStat (Stricker, 2008), todas outras análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas IBM SPSS Statistics 21.

6 RESULTADOS

6.1 EFEITO DO FOTOPERÍODO EM PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

O comprimento das tilápias foi mensurado a partir das medidas de CP, CB e CT, com posterior análise de correlação de *Pearson* entre as variáveis de comprimento e massa corporal de 63 peixes para os dois fotoperíodos, observando uma correlação positiva entre as variáveis (Tabela 2), isto é, os dados apresentaram escores altamente significativos com um $p < 0,001$. Assim, tomou-se como parâmetro para analisar o comprimento o CP.

Tabela 2– Coeficiente de correlação de *Pearson* entre as variáveis de medidas CP, CB e CT de tilápias submetidas a um ciclo de C:E e C:C

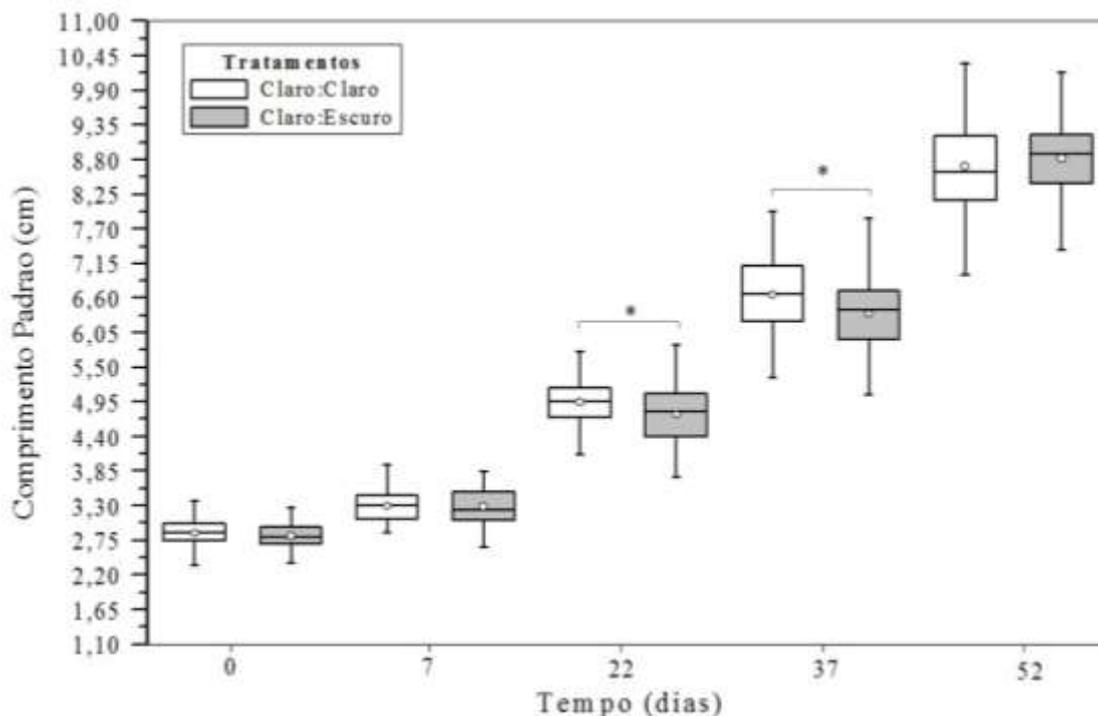
	Claro:Claro			Claro:Escuro		
	CP	CB	Massa corporal	CP	CB	Massa corporal
CB	0,998			0,997		
CT	0,998	1,000	0,895	0,996	0,999	0,942
Massa corporal	0,883	0,892		0,934	0,942	

Fonte: a autora (2017).

Nota: Comprimento Padrão (CP), Comprimento da Bifurcação (CB) e o Comprimento Total (CT). C:E=claro:escuro; C:C=claro:claro (n=126, valor observado $p < 0,001$ para uma significância do teste $p < 0,05$).

Os dados referentes ao CP aos fotoperíodos C:C e C:E estão apresentados (Figura 8) em função dos dias. Esses dados apresentaram uma distribuição normal e, de acordo com o teste-t, pode-se verificar que houve diferença estatística no comprimento padrão das tilápias submetidas aos diferentes fotoperíodos apenas nos dias 22 e 37 de análise da biometria. Cujas médias foram de $4,95 \pm 0,36$, $4,75 \pm 0,41$ e $6,65 \pm 0,66$, $6,39 \pm 0,68$ cm para o C:C e C:E, com valor de p de 0,009 e 0,022, respectivamente. Nos outros períodos de análise não foi verificado diferença no crescimento dos animais nas condições analisadas.

Figura 8 – Comprimento Padrão (CP) das tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C a partir dos dias 0, 7, 22, 37 e 52.



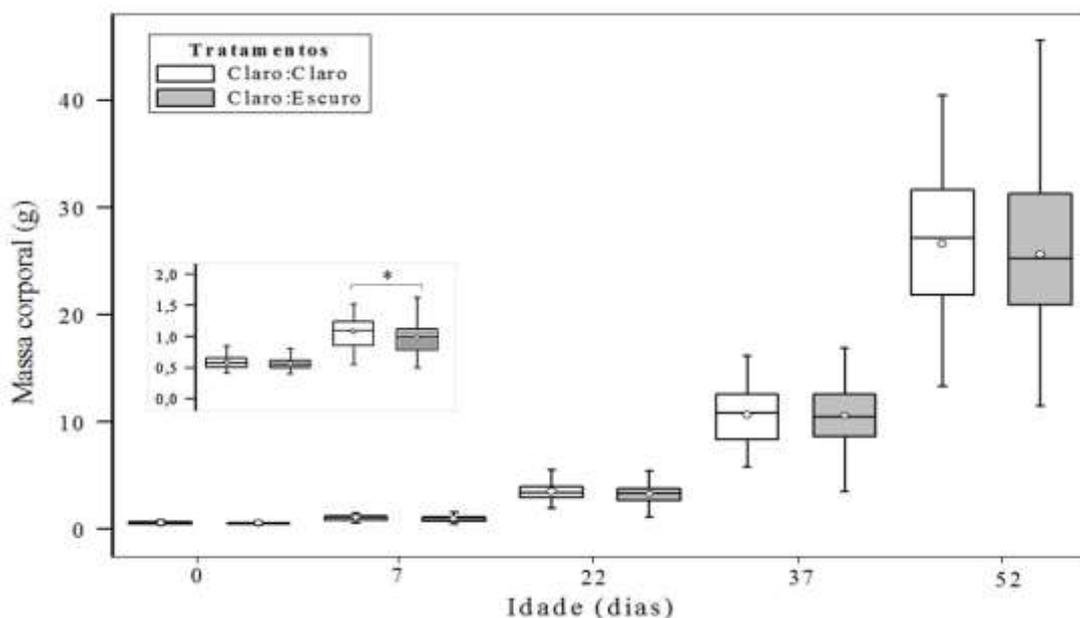
Fonte: a autora (2017).

Efeito do fotoperíodo sobre o comprimento padrão de alevinos da tilápia-do-Nilo. Os dados são expressos como média \pm DP em dois fotoperíodos em cinco períodos de dias (tempo). Foi observado uma influência sobre essa variável nos diferentes grupos, apresentando diferenças significativas, apenas, nos dias 22 e 37 (teste-t, $p < 0,009$ e $p < 0,022$, respectivamente).

Nota: C:E=claro:escuro; C:C=claro:claro (n=126, asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, teste-t, $p < 0,05$).

Em relação à massa corporal, os dados apresentaram uma distribuição normal conforme o teste de Kolmogorov-Sminov. Os mesmos estão representados em função dos dias (Figura 9). Após o teste-t observou-se diferenças entre grupos no dia 7 (período de aclimação) com $1,08 \pm 0,23$ para o C:C e $0,98 \pm 0,23$ para o C:E apresentando diferenças significativas ($p < 0,007$). Nota-se que apenas na fase inicial, após o período de aclimação, o C:C apresentou maiores massas corpóreas. No entanto, nos demais dias não foram observadas diferenças significativas entre os fotoperíodos.

Figura 9 – Massa corporal das tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C a partir dos dias 0, 7, 22, 37 e 52.



Fonte: a autora (2017).

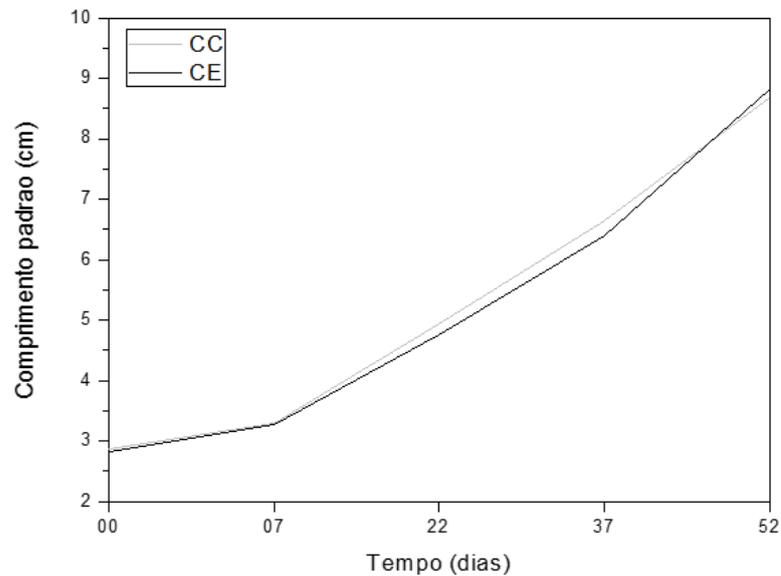
Efeito do fotoperíodo sobre a massa corporal de alevinos da tilápia-do-Nilo. Os dados são expressos como média \pm DP em dois fotoperíodos e cinco períodos de tempo (dias). Foi observado influência sobre essa variável nos diferentes grupos apresentando diferenças significativas, apenas, no dia 7 (teste-t, $p < 0,007$).

Nota: C:E=claro:escuro; C:C=claro:claro (n=126, asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, teste-t, $p < 0,05$).

Em suma, a massa e comprimento dos peixes não apresentaram diferenças para os dois grupos. Porém, observou-se uma maior heterogeneidade ao final do experimento para o fotoperíodo C:E quando comparado ao C:C, cujos valores perfaziam mínimos e máximos de massa corporal de 11,45 a 45,59 g. Já os peixes do C:C registrou-se valores menos heterogêneos com 13,31 a 40,47g. Todavia, em relação ao comprimento os resultados foram diferenciados, com uma maior dispersão dos dados para a condição C:C com valor de 6,97 a 10,33 comparado com o C:E cujos valores foram 7,36 a 10,18 cm.

A fim de determinar diferenças de crescimento em função do tempo realizou-se o modelo linear geral, o qual não apresentou diferenças significativas exceto entre o dia 7 e 37 (Figura 10) que apresentaram crescimento diferenciado cujo $p < 0,04$, considerando $p < 0,05$.

Figura 10 – Crescimento das tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C a partir 0, 7, 22, 37 e 52.



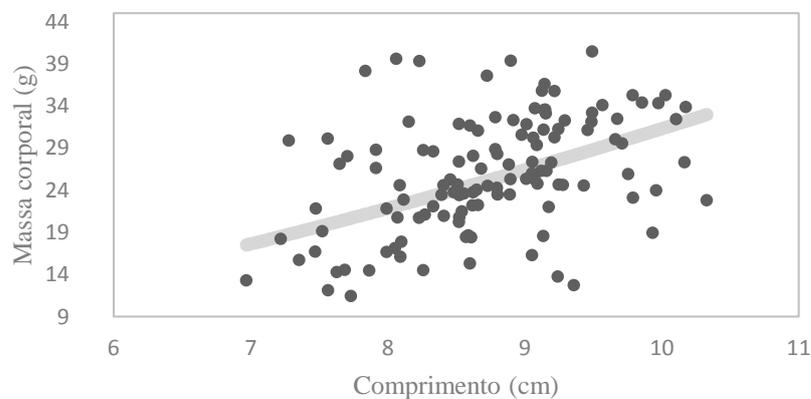
Fonte: a autora (2017).

Observou-se um crescimento diferenciado entre os dias 7 e 37 ($p < 0,04$).

Nota: C:E=claro:escuro; C:C=claro:claro (n=126 peixes para cada condição, considerando $p < 0,05$).

Ao analisarmos as variáveis massa/comprimento e fazermos sua relação, notamos diagrama de dispersão que estas apresentaram uma correlação positiva, uma vez que ambas variáveis aumentaram de maneira similar (Figura 11). Muito embora, notamos que os dados se dispersaram em torno da curva.

Figura 11 – Relação massa corporal/comprimento total das tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C.



Fonte: a autora (2017).

Nota: n=126. C:E=claro:escuro; C:C=claro:claro.

Gráfico de dispersão sobre a relação massa corporal/comprimento total da tilápia-do-Nilo para o fotoperíodo de C:C e C:E, cuja equação $y = 0,7662x^{1,611}$.

Assim, para certificarmos os possíveis resultados a cerca dessa dispersão fizemos a análise do fator de condição (Tabela 3) com valores médios e desvios para os dois fotoperíodos incluindo a significância. Nota-se escores não significativos entre os fotoperíodos. Dessa forma, a relação massa/comprimento representada pelo fator de condição apresentou-se sem significância estatística.

Tabela 3– Fator de condição das tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C.

	Claro:Claro	Claro:Escuro	p
Fator de condição	1,1±0,3	1,0±0,2	0,05

Fonte: a autora (2017).

Valores apresentados em $m \pm dp$ (média \pm desvio padrão).

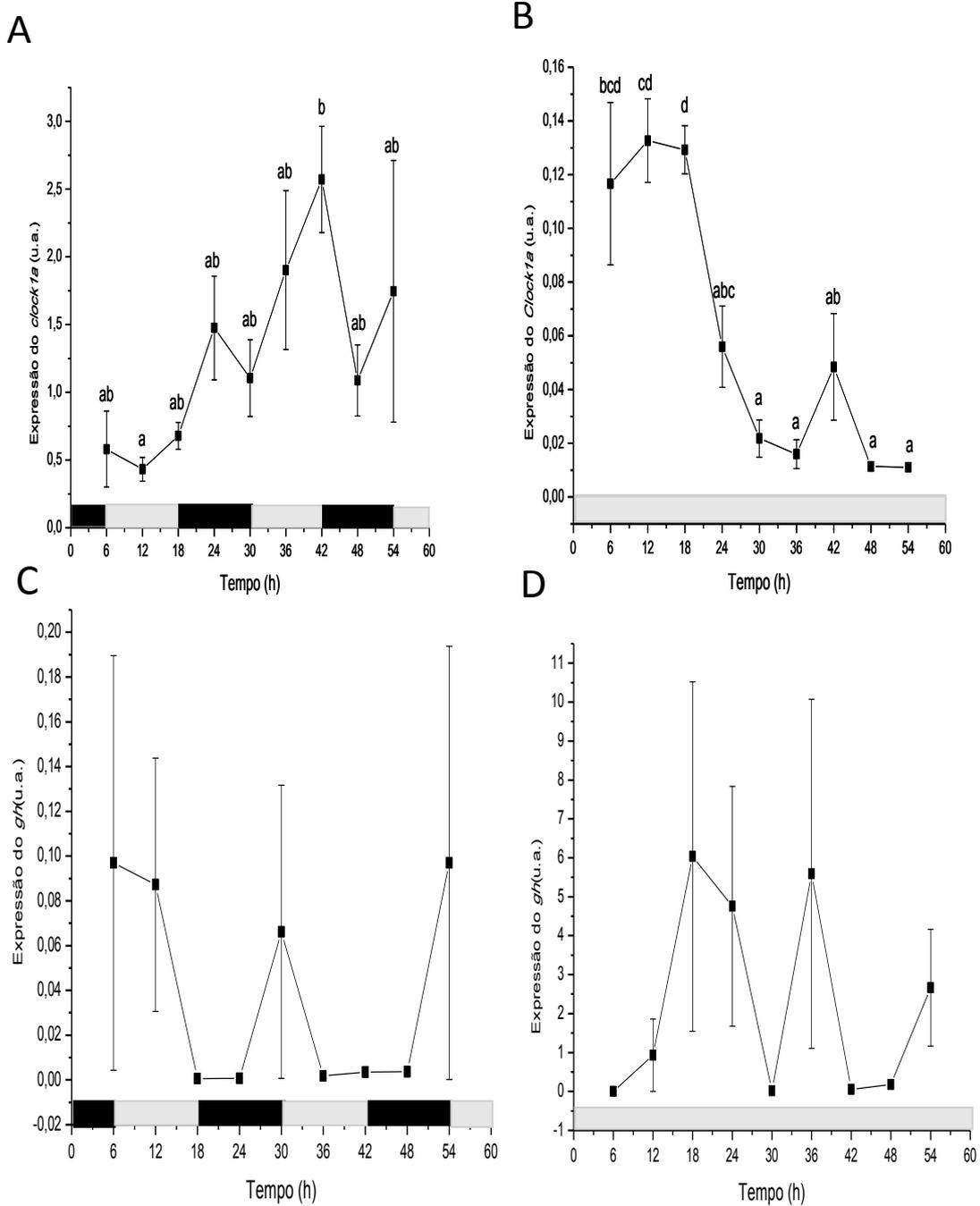
Nota: C:E=claro:escuro; C:C=claro:claro (n=126, significância do teste $p < 0,05$).

6.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO *clock1a* E *gh* DO TECIDO CEREBRAL NOS FOTOPERÍODOS C:E E C:C

No segundo momento foi avaliada a expressão gênica pela técnica de PCR em tempo real por meio da amplificação dos transcritos *clock1a* e *gh*. Os dados foram expressos em valores de Ct (*Cycle Threshold*) que permitiram a quantificação relativa do cDNA. Os valores da eficiência apresentaram resultados equivalentes entre os genes em questão e os de referência. Os resultados não seguiram uma distribuição normal, nesse sentido realizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Conover para identificar diferenças na expressão gênica. Subsequentemente, foi utilizado o teste de Spearman para verificar a presença de correlação entre a expressão do *clock1a* e do *gh* nos dois fotoperíodos.

As Figuras 12A e B exibem um padrão diferenciado de expressão para o gene *clock1a* no tecido cerebral da Tilápia nilótica, não apresentando um perfil circadiano. Contudo, apresentaram grandes diferenças nos seus níveis diários, isto é, entre os pontos de amostragem para C:E e C:C com $p < 0,012$ e $p < 0,000$ respectivamente. A Figura 12A apresentou acrofase com o mínimo de expressão na metade da fotofase no tempo de 12h do primeiro ciclo (período de 24h). Porém, apresentou acrofase com máximo de expressão no início da escotofase, apenas, no segundo ciclo (48h) no tempo de 42h. Em relação ao período de claro contínuo apresentado na Figura 12B, o *clock1a* exibiu acrofase maior no primeiro ciclo, durante o dia. No segundo ciclo, exibiu acrofase menor que se manteve durante todo o período. O *clock1a* apresentou níveis elevados de expressão para o fotoperíodo C:E.

Figura 12 – Expressão gênica do *clock1a* e *gh* do cérebro das tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C.



Fonte: a autora (2017).

Perfil de expressão do *clock1a* e *gh* da tilápia-do-Nilo. Os períodos de luz e escuridão do fotoperíodo estão representados por barras cinza e preta, respectivamente. Expressão gênica de *clock1a* (C:E) (A), *clock1a* (C:C) (B), *gh* (C:E) (C) e *gh* (C:C) (D). Os dados são expressos como $m \pm EP$ (média \pm Erro Padrão).

Nota C:E=claro:escuro; C:C=claro:claro, n = 7 peixe por ponto-de-tempo (eixo x). Diferentes letras representam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Em relação ao *gh*, não foi notado a presença de um ritmo circadiano como também ausência de diferenças entre os tempos e os fotoperíodos C:E e C:C (12C e D) com um $p < 0,764$ e $p < 0,462$, respectivamente. Apesar da grande variação de expressão entre os indivíduos de um mesmo grupo, evidenciada pelo grande desvio em torno da média, foi observada uma maior amplitude na expressão para condição C:C. Por fim, foi testada a possibilidade de uma correlação entre os genes supracitados para seus respectivos fotoperíodos (tabela 4). Contudo, os escores resultantes foram altamente distantes de qualquer associação, apontando para pouca correlação entre os genes.

Tabela 4 – Coeficiente de correlação de *Spearman* entre os genes *clock1a* e *gh* de tilápias submetidas aos ciclos de C:E e C:C

Claro:Escuro			Claro:Claro		
	<i>gh</i>	P		<i>gh</i>	P
<i>clock1a</i>	0,29	0,08	<i>clock1a</i>	0,09	0,52

Fonte: a autora (2017).

Nota: C:E=claro:escuro; C:C=claro:claro (n=126, significância do teste $p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

7.1 EFEITO DO FOTOPERÍODO EM PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

7.1.1 Análise biométrica

A tilápia-do-Nilo é uma espécie intensivamente cultivada a nível mundial, principalmente devido às suas características zootécnicas (PINTO; MATI; MELO, 2014). A tilápia apresenta um grande potencial de adaptação e tolerância frente aos fatores ambientais e de manejo (STICKNEY, 2000; LACERDA et al., 2010). Mesmo assim, algumas variáveis são comumente analisadas na unidade de cultivo para o sucesso da produção. Por isso, a análise da biometria tem sido uma prática frequente nos sistemas de cultivo na piscicultura durante todo o ciclo produtivo, visto que sua finalidade é acompanhar o desenvolvimento, ganho de peso e crescimento. As biometrias devem ser realizadas a cada 15 dias para que os ajustes de oferta de alimentos sejam feitos, a depender da fase de vida do peixe (EMBRAPA, 2013).

Na biometria o produtor tem uma visão geral do estado de saúde do animal e, assim, permite que as melhores medidas sejam tomadas para que o seu sistema de produção seja conduzido a uma maior produtividade (EMBRAPA, 2014), principalmente, no tocante a massa corporal e o comprimento. Pois, a escolha dos alevinos pelos produtores baseia-se no tamanho uniforme do lote (EMBRAPA, 2007). Embora no presente experimento essas variáveis não apresentaram diferenças entre as médias, observou-se maior heterogeneidade no ganho de massa para o C:E. Esta pode ter sido registrada devido o hábito de dominância e agressividade dessa espécie. Como reportam alguns autores, a tilápia-do-Nilo é uma espécie que possui um comportamento bastante territorialista de dominância e agressividade entre os indivíduos, com peixes dominantes (maiores) e submissos (menores) em um mesmo ambiente (FERNANDES, 1997; MERIGHE et al., 2004). O comportamento de competição acontece, principalmente, na fase inicial provocando a desproporcionalidade no lote (EMBRAPA, 2015). Assim, surge um ambiente totalmente desfavorável e de estresse entre o grupo, influenciando no crescimento e desenvolvimento do animal, visto que, os maiores terão domínio sobre a alimentação dos menores. Existem diversos agentes estressores de natureza diferente que acometem os peixes, os quais respondem de diversas maneiras. O principal alvo endócrino dos agentes estressores é o hipotálamo-pituitária-interrenal do peixe, resultando no aumento dos níveis de catecolaminas e glicocorticoides, os quais, tem influência sobre crescimento e massa muscular, principalmente na fase de desenvolvimento. Isso acontece diante da alta necessidade de energia exigida do

metabolismo do organismo acometido em busca de eliminar um determinado agente estressor (MOBERG, 1985; MOLICO, 2013), tentando compensar o desequilíbrio para manter homeostase do organismo (PROCARIONE; BARRY; MALISON, 1999; MENDONÇA, 2007).

Como o objetivo de analisarmos se as condições do experimento impostas aos peixes afetaram sua fisiologia, realizamos a análise do Fator de condição (K_n). Este indica o estado de bem-estar do peixe levando em consideração a relação massa/comprimento (LE CREN, 1951; DATTA, 2013). É um índice corporal bastante utilizado e representa a interação do meio ambiente com condições nutricionais entre os animais aquáticos (VAZZOLER, 1996; GOMIERO; VILLARES JUNIOR; BRAGA, 2010) Em suma, possui a finalidade de comparar grupos expostos a diferentes condições ambientais no sistema de cultivo (agentes estressores), alimentação e as possíveis respostas fisiológicas do animal (condição do animal) diante dessas (CAMARA; CARAMASCHI; PETRY, 2011). Nas condições oferecidas constatamos que os peixes não apresentaram resultados no fator de condição estatisticamente significativos.

7.1.2 Fotoperíodo

A manipulação do fotoperíodo durante o cultivo é um dos procedimentos que tem sido utilizado em pesquisas cujo objetivo é verificar um melhoramento do crescimento de peixes e de outros organismos, principalmente aqueles de interesse comercial (TAYLOR; MIGAUD, 2009).

Uma pesquisa realizada com a espécie tilápia, da linhagem *chitralada*, submetida nas diferentes fases do seu desenvolvimento, a ciclos diferentes de luz, provocou respostas diferentes para cada fase. Foram analisados durante a fase de reversão sexual (pós-larva) e verificou que o comprimento e massa apresentaram diferenças significativas positivas no ciclo 24 horas de luz. Já na fase de alevinos não houve diferenças significantes dessas medidas entre os maiores ciclos de luz. Inferindo-se assim, que as fases iniciais do desenvolvimento da tilápia são mais vulneráveis a sofrer influência do fotoperíodo, sobretudo com os ciclos de luz mais extensos (BEZERRA et al., 2008). Isto não foi observado nesse trabalho que na fase de alevinos, em relação ao comprimento, foram observadas diferenças apenas em dois tempos durante o crescimento, cujos valores de médias foram superiores para o tratamento de C:C. Já em relação a massa corporal, o tratamento C:C resultou em diferença estatística apenas no primeiro período do experimento.

A manipulação de longos fotoperíodos podem influenciar indiretamente o crescimento e aumento da massa muscular pelo maior consumo alimentar e maior atividade natatória dos peixes (BOEUF; BAIL, 1999; VERAS, 2011). Para o desenvolvimento e crescimento normal das fases de larvas do peixe é necessário um limite mínimo de luz (FALCÓN et al., 2010; NAVARRO; NAVARRO, 2012). Contudo, uma exposição prolongada pode provocar nos peixes alterações comportamentais como agressão e canibalismo (PIENNAR, 1990; REYNALTE-TATAJE et al., 2002). O que constatamos na presente pesquisa, a qual, os peixes apresentaram-se agressivos e, algumas vezes, até canibalistas. Contudo, isso foi visto no grupo exposto ao C:E. Em relação ao crescimento os espécimes não apresentaram diferenças significativamente marcantes entre os dias do desenvolvimento dos alevinos. Pode-se sugerir a existência de vários fatores que podem predispor esses resultados, diante das condições do experimento como: a maior exposição a luz, a fase de vida dos peixes, a qual a pós-larvas e adultos parecem sofrer maior influência de fotoperíodos prolongados (EL-SAYED; KAWANNA, 2004).

Ciclos maiores de luzes estimulam o aumento do GH e IGF-1 (TAYLOR; MIGAUD, 2009; VERAS, 2011). O GH está envolvido na regulação de algumas funções do organismo, entre elas o crescimento muscular (PIERCE et al., 2012), por meio da estimulação da produção de células miogênicas, aumento do número e tamanho das células musculares (COSTA, 2015). Na fase juvenil do peixe, o crescimento é maior em relação ao ganho de massa corporal em comparação ao comprimento (MACIEL-JUNIOR, 2006). Sobre esse contexto, foi observado em juvenil de tilápia-do-Nilo submetidos a 16h de luz uma leve tendência para o aumento da taxa de crescimento tanto na massa corporal como no comprimento padrão (CRUZ; BROWN, 2009).

Em relação a composição do peixe, alevinos tilápia-do-Nilo expostos a cinco variações de fotoperíodo demonstrou que o ciclo de 18h claro contribuiu para um aumento da deposição protéica no filé e diminuição do acúmulo de lipídeos. Configurando assim, um meio de aperfeiçoamento do peixe na busca de uma melhor qualidade do produto (VERAS et al., 2014). Para exportações de filés de tilápias o mercado externo exige um peso médio comercial de 950g em um período de cultivo aproximado de 210 dias.

Em síntese, o uso do fotoperíodo como artifício para o melhoramento do produto no mercado tem apresentado resultados positivos no setor da piscicultura. Pois, o uso do fotoperíodo tem contribuído para o aumento da produção da espécie, uma vez que tem-se observado bom crescimento, melhor homogeneidade e eficiência na conversão alimentar

(VERAS, 2011). No entanto, a sua manipulação tem que ser feita com precaução atentando às necessidades de cada espécie, diante da diversidade de teleósteos, suas fases do desenvolvimento e aspectos fisiológicos (NAVARRO; NAVARRO, 2012). Pois, diante do que já foi reportado na literatura há resultados positivos na manipulação do fotoperíodo nessa espécie, porém em fases específicas da vida e em determinadas condições de fotoperíodo. Assim, deve-se ter uma visão holística do ambiente, das espécies e dos melhores fotoperíodos para a mesma na busca de um bom resultado durante o cultivo.

7.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RELÓGIO MOLECULAR E DO EIXO SOMATOTRÓPICO DA TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDAS AOS FOTOPERÍODOS C:E e C:C

O relógio biológico, caracterizado como ciclo periódico contínuo, pode sofrer oscilações e provocar distúrbios na fisiologia do animal, quando exposto a diversos fatores internos ou externos, os quais não sofrem ajustes imediatos (COSTA, 2015). Entretanto, isso não foi observado no tectum óptico e hipotálamo de juvenis da tilápia-do-Nilo sob condições diferentes de alimentação, cuja alimentação foi ofertada pra um grupo às 12h e outro às 24h, ambos na mesma condição de fotoperíodo C:E. No entanto, outro grupo foi alimentado às 12h, mas no período da amostragem o fotoperíodo foi modulado para um ciclo de luz contínua. Diante dessas diferentes condições, o ritmo circadiano de genes da alça positiva e negativa, foram mantidos, mostrando, apenas, um atraso para o grupo de luz contínua (COSTA, 2016). Nesse caso não houve uma dessincronização do relógio. Os peixes possuem uma plasticidade no seu ciclo biológico em relação a variações do fotoperíodo específica a espécie e a sua fase, isto é, seu sistema é bastante flexível às variações do meio (VERA et al., 2013). Essa adaptação foi observada na espécie *Oplegnathus fasciatus* com um peso aproximado de 100 a 300 g, que ao ser submetida a quatro variações de fotoperíodo durante 8 semanas não sofreu nenhuma alteração significativa no que se refere ao estresse. Tendo em vista que seus indicadores, dentre eles, os níveis de cortisol se mantiveram entre os níveis normais (BISWAS et al., 2008).

Nesta perspectiva, considerar o fotoperíodo como principal modulador do padrão de expressão diferenciado apresentado na presente pesquisa, em relação ao relógio molecular, é algo limitado. Visto que, mesmo no fotoperíodo normal a expressão diferenciou-se da encontrada no trabalho de Costa (2016), o qual, apresentou padrão circadiano de expressão na Tilápia nilótica para um fotoperíodo de 12:12 (C:E) com picos (acrofase) maiores e menores ao final da fase clara (fotofase) e escura (escotofase) para os genes da alça positiva (*clock1* e

bmalla). Diferente do observado nessa pesquisa, a qual, mostrou acrofase similar durante um ciclo de 24 h. Porém, apresentou acrofase maior, no outro ciclo, apenas no início da escotofase. O trabalho de Costa (2016) foi pioneiro e exclusivo, até o presente momento, na análise do relógio molecular, o qual, elucidou a presença de um ritmo biológico na tilápia-do-Nilo. Entretanto, foi observado a expressão em apenas um ciclo(24h), não confirmando se esta se repetia num ciclo seguinte (48h). Foi observado um padrão de expressão similar no trabalho de Costa sobre os genes que compõem o relógio similar no cérebro da espécie *Sparus aurata* com peso aproximado de 12g. Esta foi submetida a um fotoperíodo normal com oferta da alimentação em ML (metade do dia) e MD (metade da noite) e exibiu ritmo circadiano do *clock* estatisticamente significante com acrofase ao fim da fotofase e/ou início da escotofase. Observou também, que na ausência de fatores externos no período de amostragem, a exemplo da alimentação e luz, a expressão do *clock* apresentou-se sem diferenças estatísticas entre os tempos e sem ritmo circadiano (VERA et al., 2013). Nesse caso, a alimentação pode ter sido um potente modulador da biologia/fisiologia animal. Com isso, podemos inferir que, talvez, a frequência de alimentação ofertada num intervalo de 1 hora da nossa pesquisa tenha contribuído para o desajuste do ciclo na expressão do *clock1a*.

O ritmo biológico opera de maneira independente, mas entre os fatores externos a alimentação tem exercido uma importante modulação, se não a mais significativa, sobre esse (STEPHAN, 2002). No entanto, isso foi discordante no cérebro de peixes-zebra submetidos ao ciclo normal de fotoperíodo com oferta de alimentação em diferentes períodos (uma vez ao dia aleatoriamente, jejum de duas semanas, na metade da fase de luz e de escuro) e outro fotoperíodo de luz contínua e oferta diferentes (uma vez ao dia aleatoriamente e jejum de duas semanas). Mesmo diante dessas diferentes condições os genes (*per* e *cry*), apenas, mostrou padrão circadiano com acrofase semelhantes nos grupos submetidos ao fotoperíodo normal. Nessa situação, a alimentação não funcionou como um sincronizador externo para a ritmicidade diária do relógio, deixando evidente a relevância do fotoperíodo para esse sistema como já vem sendo reportada em diversos trabalhos (SANCHEZ; SANCHEZ-VAZQUEZ, 2009).

A formação de um ritmo circadiano em um organismo depende da interação desses fatores externos com a maquinaria do relógio integrado ao metabolismo e à fisiologia animal. Entre os sistemas envolvidos nessa relação podemos citar o sistema endócrino, o eixo somatotrópico (KIM; WHITE; DEVLIN, 2015). Este é, prioritariamente, composto pelo GH (somatotropina), pelo fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e uma gama de fatores de liberação responsáveis por regular o crescimento e a formação corpórea

(HULL; HARVEY, 2014). O crescimento do peixe é regulado pela liberação do GH plasmático atuando na produção de IGF1 a nível hepático, por meios da ativação dos GHRs (WON; BORSKI, 2013). Tem-se atribuído múltiplas funções à ativação dos GHRs, conceituando como regulador endócrino central em peixes (BEHNCKEN; WATERS, 1999; ZHU et al., 2001; RODRIGUEZ-MALLON et al., 2009). Diante da atuação do GH sobre o crescimento e desenvolvimento dos peixes, várias pesquisas tem trabalhado com sua administração exógena na busca de identificar o período do dia que o hormônio se faz mais atuante. Nessa perspectiva, foi observado num experimento realizado com a espécie *Clarias batrachus* com peso inicial entre 28/30g, que administração à noite provocou um aumento importante no ganho de massa corporal (SINGH; LAL, 2008). Em tilápias, os órgãos principais de estimulação do GH (fígado e músculo) foram mais sensíveis à aplicação exógena do GH à noite (COSTA, 2015). Há dois subtipos de receptores para o GH, o GHR1 e GHR2. Mas, ainda não se sabe totalmente em quais mecanismos estão envolvidos, podendo assim, estar envolvidos em efeitos diferenciados (KITTLSON; JONES, 2011), haja vista a sua vasta distribuição nos tecidos ocasionada pelo evento da duplicação gênica em teleósteos (REINDL; SHERIDAN, 2012). Na tilápia de Moçambique, o *ghr1* teve uma expressão considerável no tecido adiposo, fígado e músculo e moderada na pele e tecido neural. Já o *ghr2* foi consideravelmente expresso no músculo esquelético e no coração. Para os testículos, fígado, pituitária e cérebro o perfil de expressão tiveram amplitude moderada (PIERCE et al., 2007). Em peixe-zebra transgênico para o GHR1 observou-se que sua super expressão aumentou o número de fibras musculares (FIGUEIREDO et al., 2012). Na espécie *Oncorhynchus kisutch*, a transgenia para o *gh* provocou um aumento acentuado do ganho de massa em relação aos selvagens (KIM; WHITE; DEVLIN, 2015).

Nesse contexto, são limitados os estudos que buscam compreender a importância das bases moleculares, a exemplo dos genes do relógio, e sua correlação com os sistemas orgânicos sobre a saúde animal. Diante disso, foi observado na hipófise do salmão prateado transgênico para o GH e não transgênico diferenças significativas no crescimento corporal. Porém, alguns genes da alça positiva e negativa apresentaram perfil de expressão e fases diferentes. Os genes *clock3*, *bmal1* e *per2* mostraram perfil circadiano no selvagem e transgênico, porém com amplitude maior para este. Já o *clock1a* e *cry3* apresentaram um ritmo diário significativo apenas para a linhagem transgênica. Esses dados denotam que, mediante a expressão constitutiva do *gh* os genes do relógio apresentaram resultados diferenciados e modificações fisiológicas visíveis (KIM; WHITE; DEVLIN, 2015).

Como observado no presente estudo, o *gh* e *clock1a* tiveram responsividade inesperada de expressão para os dois fotoperíodos. Em relação ao *gh*, verificamos que nessa fase os peixes não apresentaram ritmicidade e nenhuma diferença de expressão entre os pontos. Em consonância com esses dados um experimento realizado com juvenis de tilápia tendo a alimentação como fator abiótico, cujo peso médio perfazia valor de 85,55g, não apresentou ritmo circadiano do mRNA para o GH na hipófise (COSTA, 2015). Desse modo, o comportamento do *gh* nessa pesquisa pode ser devido ausência da sua disponibilidade (BJÖRNSSON et al., 1989; KIM; WHITE; DEVLIN, 2015) nessa fase e nessa espécie, isto é, não possui expressão diária. Assim como o homogeneizado de todo o cérebro tenha dificultado o resultado, como também para o *clock1a*. Além do mais, não apresentou uma correlação entre os genes, deixando claro a independência de expressão entre eles. Assim, excluindo a possibilidade de regulação da expressão do *gh* pelo relógio e sobre crescimento do peixe.

A abordagem tratada na presente pesquisa confere uma base norteadora para outros trabalhos que buscam entender a atuação prioritária do relógio, sincronizado com os *zeitgebers*, sobre a fisiologia. Devido à escassez de trabalhos com essa espécie abordando essa temática, dificulta as possíveis inferências, haja visto a ausência de trabalhos com registros de expressão que se repete num ciclo seguinte. À vista disso, é relevante para o setor da piscicultura buscar indicadores de desempenho que compreendam a relevância da rede de comunicação molecular que coordena os fenômenos funcionais, na busca de melhores alternativas para o desenvolvimento do animal. Pois, os componentes do eixo somatotrópico estão envolvidos em múltiplas funções como o crescimento, metabolismo, osmorregulação e imunidade (REINDL; SHERIDAN, 2012).

8 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que a exposição a um período de luz constante não interfere de maneira significativa no comprimento, crescimento, massa corporal e no fator de condição de alevinos de tilápia-do-Nilo;

Em relação a expressão gênica, o *clock1a* não apresentou um ritmo biológico diário em alevinos em ambos os fotoperíodos. Muito embora, revelou diferenças de acrofase para os dois ciclos (dois dias);

O *gh*, por sua vez, não exibiu nenhum padrão rítmico, tampouco diferenças de acrofases entre os pontos, nos dois dias de amostragem;

Os transcritos *gh* e *clock1a* não apresentaram correlação de expressão entre os genes e seus referidos fotoperíodos.

REFERÊNCIAS

- ACÚRCIO, A. R.; RODRIGUES, L. M. Os Ritmos da Vida - Uma Visão Actualizada da Cronobiologia Aplicada. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**, n.6, p.216-234, 2009.
- AMARAL, I. P. G. **Transcriptional regulation in skeletal muscle of zebrafish in response to nutritional status, photoperiod and experimental selection for body size**. 2011. 182 f. Tese (Doutorado) University of St Andrews. 2012.
- 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, n.1, p.R.193-R.206, 2012.
- AMORETTY, P. R. et al. Uso de *Drosophila melanogaster* como modelo para o estudo do relógio circadiano em insetos vetores. **Acta Scientiae and technicae**, v.1, n. 1, p.87-98, 2013.
- 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**, v.107, n.44, p.19090-19095, 2010.
- ARENDT, J. The pineal gland, circadian rhythms and photoperiodism. In: REDFERN, P. H.; LEMMER, B., **Physiology and Pharmacology of Biological Rhythms**, v.125, p.375-414, 1997.
- AYSON, F. G.; TAKEMURA, A. Daily expression patterns for mRNAs of GH, PRL, SL, IGF-I and IGF-II in juvenile rabbitfish, *Siganus guttatus*, during 24-h light and dark cycles. **General and Comparative Endocrinology**, v.149, n.3, p.261-268, 2006.
- BANI, A et al. Effects of different photoperiods on growth, stress and haematological parameters in juvenile great sturgeon *Huso huso*. **Aquaculture Research**, v.40, p.1899-1907, 2009.
- BECQUET, D. et al. Evidence for an internal and functional circadian clock in rat pituitary cells. **Molecular Cellular Endocrinology**, v.382, n.2, p.888-98, 2014.
- BEHNCKEN, S. N.; WATERS, M. J. Molecular recognition events involved in the activation of the growth hormone receptor by growth hormone. **Journal Molecular Recognition**, v.12, n.3, p.55-362, 1999.
- BELLPEDERSEN, D. et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: Lessons from diverse organisms. **Nature Reviews Genetics**, v.6, n.7, p.544-556, 2005.
- 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.
- BEZERRA, K. S. et al. Crescimento e sobrevivência da tilápia chitralada submetida a diferentes fotoperíodos. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.43, n.6, p.737-743. 2008.
- BISWAS, A. K. et al. Growth performance and physiological responses in striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*, held under different photoperiods. **Aquaculture**, v.279, n.1-4, p.42-46, 2008.
- BIZARRO, Y. W. S. **Efeito do fotoperíodo na glicemia, cortisol, parâmetros hematológicos e nos índices reprodutivos de machos de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**

Linhagem Gift. 2013. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

BJÖRNSSON, B. T. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 17, n.1-6, p.9-24, 1997.

BJÖRNSSON, B.T. et al. Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels, growth, condition factor and hypoosmoregulatory ability of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. **Aquaculture**, n.82, p.77-91, 1989.

BOEUF, G.; BAIL, P. Y. L. Does light have an influence on fish growth? **Aquaculture**, v.177, n.1-4, p.129-152, 1999.

BOZEK, K. et al. Regulation of clockcontrolled genes in mammals. **PLoS ONE**, v. 4, n.3, p.1-12, 2009.

BROMAGE, N. R. et al. How do photoperiod, the pineal, melatonin and circannual rhythms interact to coordinate seasonal reproduction in salmonid fish? **Reproductive Physiology**, v.95, p.164–166, 1995.

BUTLER, A. A.; LE ROITH, D. Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. **Annual Review Physiology**, v.63, p.141-164, 2001.

CAMARA, E. M.; CARAMASCHI, É. P.; PETRY, A. C. Fator de condição: bases conceituais, aplicações e perspectivas de uso em pesquisas ecológicas com peixes. **Oecologia Australis**, v.15, n.2, p.249-274, 2011.

CANOSA, L. F.; CHANG, J. P.; PETER, R. E. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. **General Comparative Endocrinology**, v.151, n.1, p.1-26, 2007.

CARVALHO, T. B. et al. The effect of increased light intensity on the aggressive behavior of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (*Teleostei: Cichlidae*). **Zoologia**, v. 30, n.2, p.125–129, 2013.

CECON, E.; FLÔRES, D. E. F. L. Regulação da expressão gênica nas engrenagens do relógio circadiano de mamíferos. **Revista da Biologia**, v.4, p.28-33, 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.

CLEMENTS, S.; LOVELL, R. T. Comparison of processing yields and nutrient composition of culture Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v.119, n.23, p.299-310, 1994.

COSTA, L. S. et al. Circadian rhythms of clock gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) central and peripheral tissues: influence of different lighting and feeding conditions. **Journal of Comparative Physiology B**, v.186, n.6, p.775-85, 2016.

COSTA, L. S. **Ritmo diário de genes relacionados com o eixo somatotrópico e resposta gênica causada pela aplicação única de GH em tilápia.** 2015. 98 f. Tese (doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras Minas Gerais, Minas Gerais, 2015.

- CRUZ, E. M. V.; BROWN, C. L. Influence of the photoperiod on growth rate and insulin-like growth factor-I gene expression in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Journal of Fish Biology**, v.75, p.130-141, 2009.
- DARDENTE, H.; CERMAKIAN, N. Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. **Chronobiology International**, v.24, p.195-213, 2007.
- DATTA, S. N. et al. Estimation of length-weight relationship and condition factor of spotted snakehead *Channa punctata* (Bloch) under different feeding regimes. **Springer Plus**, v.2, p.1-5, 2013.
- DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; ALBRECHT, U. The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. **Annual Review Physiology**, v.72, p.517-549. 2010.
- DOUGLAS, C. R. **Fisiologia aplicada à Nutrição**. 2ª edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006.
- DUFFIELD, G. E. DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. **Journal of Neuroendocrinology**, v.15, p.991-1002, 2003.
- EKSTRZM, P.; MEISSL, H. The pineal organ of teleost fishes. **Reviews Fish Biology and Fisheries**, v.7, n.2, p199-284, 1997.
- EL-SAYED, A. F. M.; KAWANNA, M. Effects of photoperiod on the performance of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: I. Growth, feed utilization efficiency and survival of fry and fingerlings. **Aquaculture**, v. 231, n.1-4, p.393-402, 2004.
- EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Pesca e Aquicultura. Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria. 2007.
Disponível:<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/69806/1/Circular45.pdf>>. Acesso: 2 setembro, 2016.
- EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Pesca e Aquicultura. Gerenciamento genético da tilápia nos cultivos. 2015.
Disponível:<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/139186/1/CNPASA-2015-doc23.pdf>>. Acesso: 4 agosto, 2016.
- EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Biometria de Peixes: Piscicultura Familiar Embrapa. 2013. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/93125/1/Biometria.pdf>>. Acesso: 01 de dezembro, 2016.
- EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Biometria de Peixes: Tanque rede. 2014. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/113799/1/fd1.pdf>>. Acesso: 01 de dezembro, 2016
- EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Pesca e Aquicultura. 2016. Disponível:<<https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura/nota-tecnica>>. Acesso: 2 setembro, 2016.
- FALCÓN, J. et al. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. **General Comparative Endocrinology**, v.165, n.3 p.469-482, 2010.

FALCÓN, J. et al. Melatonin effects on the hypothalamo pituitary axis in fish. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n.2, p.81–88, 2007.

FALCON, J. et al. Melatonin, the time keeper: biosynthesis and effects in fish. **Cybium** v.35, n1, 2011.

FALCÓN, J. et al. Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1163, n.1, p.101-111, 2009.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Culture aquatic species information programme *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). 2015. Disponível: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en>. Acesso em: 30 de abril, 2015.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. The state of world fisheries and aquaculture. 2016. Disponível: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>>. Acesso em: 15 de maio, 2016.

FERNANDES, M. O. **Estresse social, metabolismo e crescimento em peixes. Botucatu: Universidade Estadual Paulista**. 1997. 82 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, 1997.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Muscle-specific growth hormone receptor (GHR) overexpression induces hyperplasia but not hypertrophy in transgenic zebrafish. **Transgenic Research**, v.21, n.3, p.457-469.2012.

FOSTER, R.; KREITZMAN, L. Rhythms of life: The biological clocks that control the daily lives of every living thing. **Profile books Ltd**, London. 2005.

FREITAS, R. T. **A influência dos ciclos de temperatura na sincronização do relógio circadiano e amplitude de atividade do mosquito *Aedes aegypti***. 2015. 95 f. Dissertação (mestrado em Ciências), Instituto Oswaldo cruz do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

FURUYA, W. M. et al. Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.5, p.1431-441, 2005

GAILDRAT, P.; FALCON, J. Expression of melatonin receptors and 2[125I] iodo melatonin binding sites in the pituitary of a teleost fish. **Advances Experimental Medicine Biology**, v.460, p.61-72. 1999.

GEKAKIS, N. et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. **Science**, v.280, p.1564-9, 1998.

GERN, W. A. et al. The rainbow trout pineal organ: an endocrine photometer. In: ALI, M. A. **Rhythms in Fish. Plenum**, p.199-218, 1992.

GIBSON, E. M.; WILLIAMS, W. P.; KRIEGSFELD, L. J. Aging in the circadian system: considerations for health, disease prevention and longevity. **Experimental Gerontology**, v.44, n.12, p.51-56, 2009.

GOMIERO, L.M; VILLARES-JUNIOR, G.A. BRAGA, F.M.S. Length-weight relationship and condition factor for *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) in Serra do Mar State Park - Santa Virgínia Unit, Atlantic Forest, São Paulo, Brazil. **Biota Neotrop**, v.10, n.1, 2010.

- HALFEN, G. E. et al. Caracterização molecular de plantéis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) em Santa Catarina, Brasil. **Journal Biotechnology Biodiversity**, v.3, n.2, p.1-10, 2012.
- HARB, A. B. C. **Aspectos cronobiológicos da síndrome do comer noturno**. 142p. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2013.
- HASTING, M. H.; HERZOG, E. D. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. **Journal Biological Rhythms**, v.19, n.5, p.400-14, 2004.
- HASTING, M. H.; MAYWOOD, E. S.; REDDY, A. B. Two decades of circadian time. **Journal of neuroendocrinology**, v.20, n.6, p.812-9, 2008.
- HILDSORF, A.W. S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas, uma revisão. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.22, n.1, p.73-84, 1995.
- HONMA, S. et al. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. **Nature**, v.419, p.841-844, 2002.
- HULL, K. L.; HARVEY, S. Growth Hormone and Reproduction: A Review of Endocrine and Autocrine/Paracrine Interactions. **International Journal of Endocrinology**, n.2014, p.1-24, 2014.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Produção da pecuária municipal. 2014.
Disponível:<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf>
Acesso em: 10 de junho, 2015.
- JETTEN, A. M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. **Nuclear Receptor Signaling**, v.7, p.132, 2009.
- KIM, J. H.; WHITE, S. L.; DEVLIN, R. H. Interaction of growth hormone overexpression and nutritional status on pituitary gland clock gene expression in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Chronobiology International**, v. 32, n.1, p.113-127, 2015.
- KITTILSON, J. D.; JONES, E.; SHERIDAN, M. A. ERK, Akt, and STAT5 are Differentially Activated by the Two Growth Hormone Receptor Subtypes of a Teleost Fish (*Oncorhynchus Mykiss*). **Frontiers in Endocrinology**, v.2, n.30, p.1-7, 2011.
- 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.
- KORENČIČ, A. et al. Timing of circadian genes in mammalian tissues. **Scientific reports**, v. 4, p.1-9, 2014.
- KORF, H. W.; SCHOMERUS, C.; STEHLE, J. H. The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. **Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology**, v.146, p.1-100, 1998.

KORF, H. W.; VONGALL, C. Mice, melatonin and the circadian system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 252, n.12, p.57-68, 2006.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: conquistas e desafios. **Panorama da Aquicultura**, v.25, n.150, 2015.

KUBITZA, F. Criação da garoupa: um peixe indicado para a Região do Nordeste. **Panorama da Aquicultura**, v.22, n.132, 2012.

KUBITZA, F. Questões frequentes dos produtores sobre a qualidade dos alevinos de tilápia. **Panorama da Aquicultura**, v.16, n.97, 2006.

KUBITZA, F. Tilápia em água salobra: uma boa alternativa de cultivo. **Panorama da Aquicultura**, v.15, p.14-18, 2005.

KURADOMI, R. Y. **Morfometria do crescimento, estrutura muscular e expressão de fatores miogênicos em um modelo de peixe transgênico (*Danio Rerio*) para o hormônio do crescimento (GH)**. 2009. 73 f. Dissertação (mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

LACERDA, S. M. S. N. et al. A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish: The Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Model. **PLoS One**, v.5, n.5, p. 1-9, 2010.

LE CREN, E. D. The length-weight relationships and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v.20, n.2, p.201-219, 1951.

LEE, C. et al. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. **Cell**, v.107, n.7, p.855-67, 2001.

LOWELMCCONNEL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999.

MARECO, E. A. **Efeitos da temperatura na expressão de genes Relacionados ao crescimento muscular em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem gift**. 2012. 63 f. Dissertação (mestrado em Biologia) - Universidade Estadual Paulista São Paulo, São Paulo, 2012.

MARKUS, R. P.; BARBOSA-JUNIOR, E. J. M.; FERREIRA, Z. S. Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. **Einstein**, v.1, n.145, p.143-148, 2003.

MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. Universidade de São Paulo, 1999.

MAYERL, I. et al. Antisomatostatin-induced growth acceleration in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.13, n.4, p.295-300, 1994.

MAZURAS, D. et al. Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. **Journal Clinical Endocrinology**, v.409, n.2, p.313-324, 1999.

MENDONÇA, P. P. **Influência do fotoperíodo no desenvolvimento de juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum***. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Produção

Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2007.

MERIGHE, G. K. F. et al. Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p.828–837, 2004.

MIGAUD, H. et al. A comparative ex vivo and in vivo study of day and night perception in teleosts species using the melatonin rhythm. **Journal Pineal Res**, v.41, n.1, p.42-52, 2006.

MOBERG, G. P. Animal Stress. **Bethesda American Physiological Society**, 1985.

MOLICO, E. **Comportamentos que aliviam estresse nos animais: uma revisão e alguns dados novos na tilápia-do-nilo**. 2013. 41 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Estadual Paulista de Botucatu São Paulo, São Paulo, 2013.

MONTERO, M. et al. Molecular evolution of the growth hormone-releasing hormone/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene family. Functional implication in the regulation of growth hormone secretion. **Journal of Molecular Endocrinology Society for Endocrinology**, n. 25, v. 2, p.157–168, 2000.

MOORE-ED, M. C.; SULZMAN, F. M.; FULLER, C. A. The clocks that time us: physiology of the circadian timing system. **Harvard University Press**, Cambridge-London, 1982.

MORIYAMA, S.; AYSON, F. G.; KAWAUCHI, H. Growth regulations by insulin-like growth factor-I in fish. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.64, n.8, p.1555-1562, 2000.

MOTA, D. P. N. **Importância dos ritmos circadianos na Nutrição e Metabolismo**. 2010. 57 f. 2010. Monografia (Especialização em Nutrição) Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2010.

MURRE, C. et al. Interactions between heterologous helixloophelix Proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. **Cell**, v.58, n.3, p.537-544, 1989.

NAVARRO, F. K. S. P.; NAVARRO, R. D. Importância do fotoperíodo no crescimento e na reprodução de peixes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.36, n.2, p.94-99, 2012.

NAVARRO, R. D. et al. Effects of photoperiod on somatic growth and gonadal development in male Nile tilapia. **Acta Scientiarum. Technology Maringá**, v. 37, n.4, p.381-385, 2015.

NOCHE, R. R. et al. Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. **BMC Neuroscience**, v.12, n.7, p.1-13, 2011.

OLIVEIRA, S. N. **Interação genótipo x ambiente para peso vivo e modelagem estatística para seleção genética em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2013. 87 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Estadual de Maringá Paraná, Paraná, 2014.

PANDO, M. P.; SASSONECORSI, P. Signaling to the mammalian circadian clocks: in pursuit of the primary mammalian circadian photoreceptor. **Science Signaling**, v.2001, n.107, 2001.

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

- PIENAAR, A. G. **A study of coeval sibling cannibalism in larval and juvenile fishes and its control under culture conditions.** 1990. Dissertação (Mestrado) - Rhodes University, Grahamstown, 1990.
- PIERCE, A. L. et al. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: Tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. **General and Comparative Endocrinology**, v.154, n.1-3, p.31-40, 2007.
- PIERCE, A. L. et al. Regulation of growth hormone (GH) receptor (GHR1 and GHR2) mRNA level by GH and metabolic hormones in primary cultured tilapia hepatocytes. **General Comparative Endocrinology**, v.179, n.1, p.22-29, 2012.
- PINTO, H. A.; MATI, V. L. T.; MELO, A. L. Metacercarial Infection of Wild Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Brazil. **Scientific World Journal**, v.2014, p.1-7, 2014.
- PITTENDRIGH, C. S. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. **Annual review of physiology**, v.55, p.17-54, 1993.
- PREITNER, N. et al. The orphan nuclear receptor REVERB alpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell Press**, v.110, p.251-60, 2002.
- PROCARIONE, L. S.; BARRY, T. P.; MALISON, J. A. Effects of high rearing Density and loading rates of the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. **North American Journal of Aquaculture**, v. 61, n.2, p.91-97, 1999.
- RAD, F. et al. Effects of different long day photoperiods on somatic growth and gonadal development in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Aquaculture**, v.255, n.1-4, p.292-300, 2006.
- REINDL, K. M.; SHERIDAN, M. A. Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.163, n.3-4, p.231-245, 2012.
- REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocrine Reviews**, v.12, n.2, p.151-180, 1991.
- REYNALTE-TATAJE, D. et al. Influência do fotoperíodo no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (*Osteichthyes, Characidae*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.24, p. 439-443, 2002.
- RICHARDS, J.; GUMZ, M. L. Advances in understanding the peripheral circadian clocks. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.26, n.9, p.360-213, 2012.
- RIVAS, G. B. S. Genética molecular dos ritmos circadianos em insetos vetores. **Revista da Biologia**, v.9, n.3, p.19-25, 2012.
- RODRÍGUEZ-MALLON, A. et al. Competitive RT-PCR Strategy for Quantitative Evaluation of the Expression of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Growth Hormone Receptor Type I. **Biological Procedures Online**, v.11, p.79-98, 2009.
- 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.

SANCHEZ, J. A.; SANCHEZ-VAZQUEZ, F. J. Feeding entrainment of daily rhythms of locomotor activity and clock gene expression in zebrafish brain. **Chronobiology International**, v.26, n.6, p.1120-1135, 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.527-37, 2004.

SCHIBLER, U. The daily timing of gene expression and physiology in mammals. **Dialogues in clinical neuroscience**, v.9, n.3, p.257-72, 2007.

SEBRAE. **Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. AQUICULTURA NO BRASIL: Séries estudos mercadológicos. 2015.**

Disponível: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/\\$File/5403.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4b14e85d5844cc99cb32040a4980779f/$File/5403.pdf)>. Acesso: 01 de outubro, 2016.

SINGH, A. K.; LAL, B. Seasonal & circadian time-dependent dual action of GH on somatic growth & ovarian development in the Asian catfish, *C. batrachus*: role of temperature. **General and Comparative Endocrinology**, v.159, n.1, p.98-106, 2008.

SINGH, R.; SINGH, A. K.; TRIPATHI, M. Melatonin Induced Changes in Specific Growth Rate, Gonadal Maturity, Lipid and Protein Production in Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758). **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v.25, n.1, p.37-43, 2012.

SOUZA NETO, J. A.; CASTRO, B. F. Melatonina, ritmos biológicos e sono: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Neurologia**, v.44, n.1, 2008.

STEPHAN, F. K. The "Other" Circadian System: Food as a Zeitgeber. **Journal Biological Rhythms**, v.17, n.4, p.284-92, 2002.

STICKNEY, R. R. **Tilapia Culture**. In: STICKNEY, R. R. Encyclopedia of Aquaculture. New York: Wiley and Sons, p.934-941, 2000.

STRICKER, D. BrightStat.com: free statistics online. **Computer Methods Programs Biomedicine**, v.92, p.135-143, 2008.

TAKAHASHI, J. S. Circadian Rhythms: ICER is nicer at night (sir!). **Current biology**, v.4, n.2, p.165 -168, 1994.

TAKAHASHI, J. S. et al. The Genetics of Mammalian Circadian Order and Disorder: Implications for Physiology and Disease. **Nature Reviews Genetics**, v.9, n.10, p.764-775, 2008.

TAMAI, T.K.; YOUNG, L.C.; WHITMORE, D. Light signaling to the zebrafish circadian clock by *Cryptochrome 1a*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n.37, p.14712-14717, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Característica hematológica da Tilapia *rendalli* Boulenger, 1986 (*Osteichthyes, cichlidae*) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v.19, n.1, p.107-114, 2010.

TAYLOR, J.; MIGAUD, H. Timing and duration of constant light affects rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth during autumn–spring grow-out in freshwater. **Aquaculture Research**, v.40, n.13, p.1551-1558, 2009.

- TEUBNER, B. J.; BARTNESS, T.J. Body mass loss during adaptation to short winter like days increases food foraging, but not food hoarding. **Physiology & Behavior**, v.97, n.1, p.135-40, 2009.
- TOGUYENI, A. et al. Feeding behaviour and food utilisation in tilapia, *Oreochromis niloticus*: Effect of sex ratio and relationship with the endocrine status. **Physiology and Behavior**, v. 62, n. 2, p. 273-279, 1997.
- TOLOZAVILLA-LOBOS, 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.
- TOSINI, G. et al. The circadian clock system in the mammalian retina. **Bioessays**, v.30, n.7, p.624-33, 2008.
- UNDERWOOD, H. The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. **Experientia**, v.45, n.1, p.914-922, 1989.
- 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.
- VATINE, G, et al. Light Directs Zebrafish period2 Expression via Conserved D and E Boxes. **PLoS Biology**, v.7, n. 10, 2009.
- VERA, L. M. et al. Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*). **Journal of Biological and Medical Rhythm Research**, v.30, n.5, p.649-661, 2013.
- VERAS, G. C. et al. Efeito do fotoperíodo sobre a composição do filé de juvenis de tilápia do Nilo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 2, p.168-173, 2014.
- VERAS, G. C. et al. Effect of photoperiod on locomotor activity, growth, feed efficiency and gonadal development of Nile tilapia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, n.12, p.844-849, 2013.
- VERAS, G. C. **Fotoperíodos no comportamento locomotor e desenvolvimento de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2011. 98 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras Minas Gerais, Minas Gerais, 2011.
- VERNADAKIS, A. J.; BEMIS, W. E.; BITTMAN, E. L. Localization and partial characterization of melatonin receptors in amphioxus, hagfish, lamprey, and skate. **General and Comparative Endocrinology**, v.110, n.1, p.67-78, 1998.
- WHITMORE, D. et al. Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. **Nature neuroscience**, v.1, n. 8, p.701-707, 1998.
- WON, E. T.; BORSKI, R. J. Endocrine Regulation of Compensatory Growth in Fish. **Frontiers Endocrinology (Lausanne)**, v.4, n.74, 2013.
- WOOD, A. W.; DUAN, C.; BERN, H. A. Insulin-like growth factor signaling in fish. **International Review of Cytology**, v.243, p.215-285, 2005.

WU, C. et al. Local receptors as novel regulators for peripheral clock expression. **The FASEB Journal**, v.28, n.11, p.4610-4616, 2014.

YANG, C. G. et al. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Gene** **527**, v.527, n.1, p.183-192, 2013.

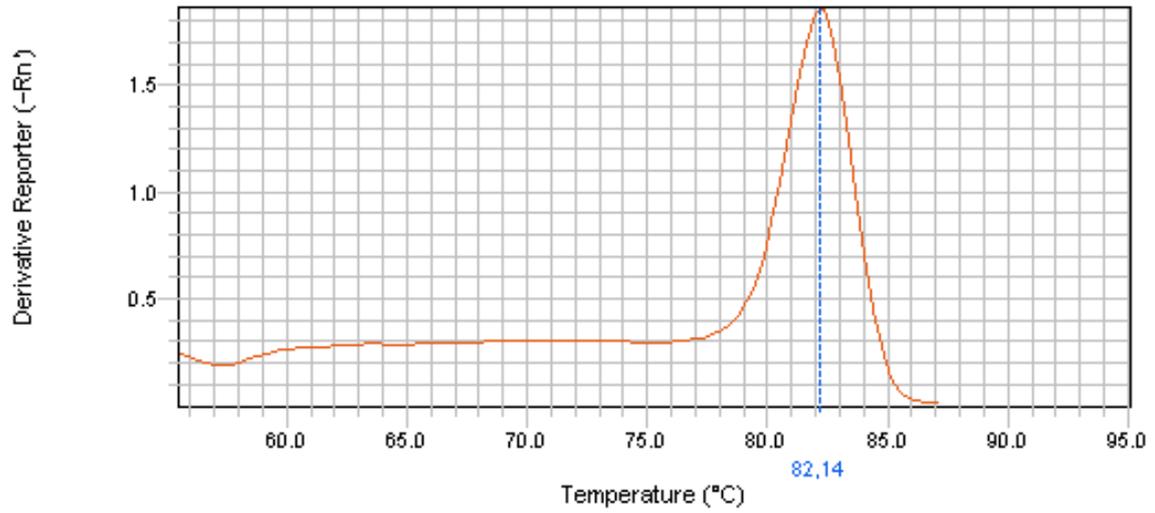
YOO, S. H. et al. A noncanonical Ebox enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.102, n.7, p.2608-2613, 2005.

ZHU, T. et al. Signal transduction via the growth hormone receptor. **Cell Signal**, v.13, p.599-616, 2001.

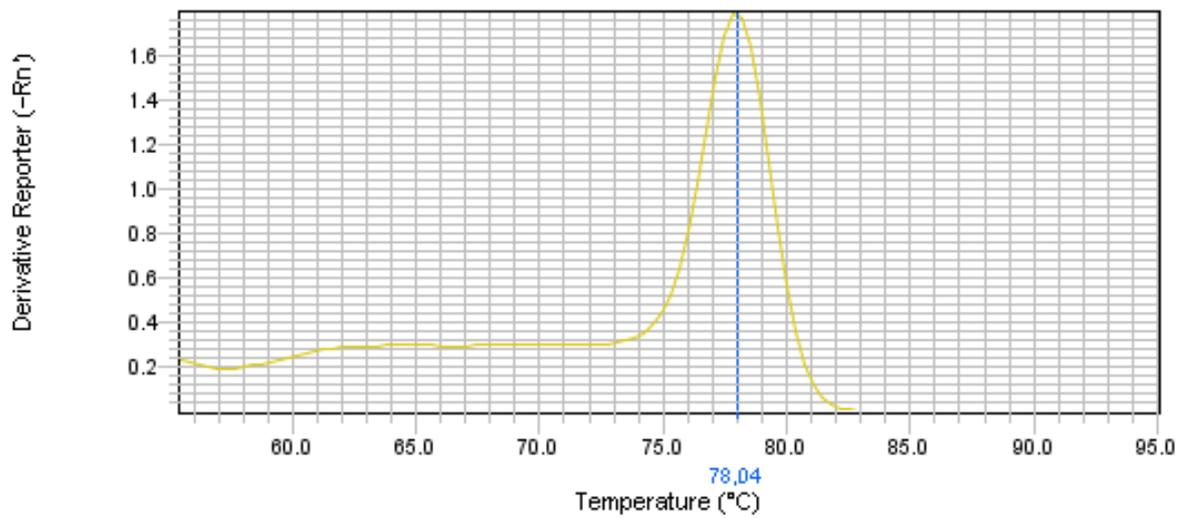
APÊNDICE

APÊNDICE A – Curvas de dissociação (*melting*) para o produto do gene do relógio molecular, do eixo somatotrópico e os genes de referência

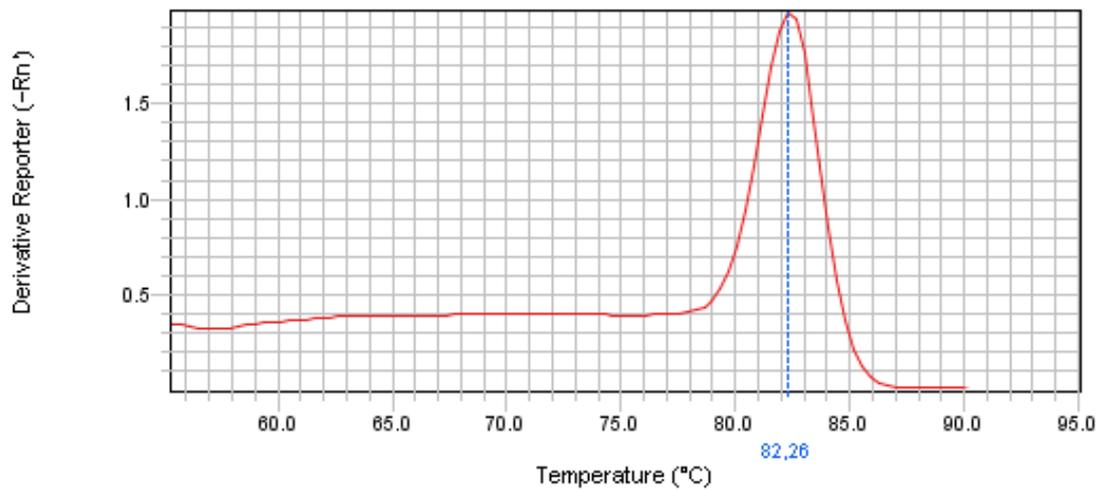
Curva de *melting* para o *gh*



Curva de *melting* para o *clock1a*



Curva de *melting* para o *ef1a*



Curva de *melting* para o *18sRNA*

