



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

LUCAS ALECRIM AMORIM VIANA

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA TRANSGÊNIA PARA O GENE  
*bmal1a* NA CELULARIDADE, VOLUME CELULAR E NA REPLICAÇÃO  
MITOCONDRIAL DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DO PEIXE-ZEBRA (*Danio  
rerio*)

JOÃO PESSOA-PB  
2017

LUCAS ALECRIM AMORIM VIANA

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA TRANSGÊNIA PARA O GENE  
*bmal1a* NA CELULARIDADE, VOLUME CELULAR E NA REPLICAÇÃO  
MITOCONDRIAL DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DO PEIXE-ZEBRA (*Danio  
rerio*)

Trabalho de conclusão de curso apresentado à banca examinadora da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia, sob a orientação do professor Ian Porto Gurgel do Amaral.

JOÃO PESSOA-PB

2017

Catálogo na publicação  
Biblioteca Setorial do CCEN/UFPB  
Josélia M.O. Silva – CRB-15/113

- V614i Viana, Lucas Alecrim Amorim.  
Investigação dos efeitos da transgênia para o gene *bmall* na  
celularidade, volume celular e na replicação mitocondrial do músculo  
esquelético do peixe-zebra (*Danio rerio*) / Lucas Alecrim Amorim Viana. –  
João Pessoa, 2017.  
39 p. : il. color.
- Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade  
Federal da Paraíba.  
Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral.
1. Peixes - Ciclo circadiano. 2. Gene *bmall*. 3. Miogênes. I. Título.

UFPB/BS-CCEN

CDU 597.2/.5(043.2)

Lucas Alecrim Amorim Viana

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA TRANSGÊNIA PARA O GENE *bmal1a* NA  
CELULARIDADE, VOLUME CELULAR E NA REPLICAÇÃO MITOCONDRIAL  
DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)

Este trabalho de conclusão de curso foi julgado e aprovado para obtenção de bacharel  
no curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba

João Pessoa – PB, 01/06/2017

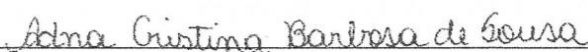


---

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

Orientador

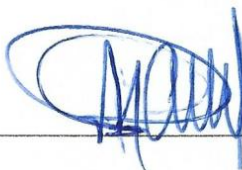
BANCA EXAMINADORA



---

Profª. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa

Universidade Federal da Paraíba – UFPB



---

Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos

Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Aos meus pais e minha irmã por sempre me apoiar mesmo nos momentos difíceis e não mediram esforços para chegar até essa etapa de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, **Eliete, Renato** e irmã **Renata** pelo apoio incondicional durante toda a graduação e por sempre terem me incentivado e me alegrado durante essa minha jornada.

Aos meus primos e tios que sempre me apoiaram durante a graduação, em especial a **Ju** e **Lipe** pelas viagens e momentos de diversão que tivemos juntos.

Ao meu orientador, professor **Ian Porto**, por toda a paciência e ensinamentos durante meu tempo no laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos. **Cayro** e **Elizanete** por terem me recebido bem. A **Jucilene** pelas horas olhando peixes e pelos experimentos que fizemos juntos. A **Rafael** pela parceria na limpeza dos sistemas. A **Anna Ju** por sempre estar presente e ajudar quando possível no laboratório. A **Márcia** por sempre achar algo engraçado quando eu falava alguma coisa e aos demais do laboratório que acabaram de chegar.

Aos meus amigos de longa data que mostraram ser pacientes e prestativos durante essa fase, mesmo com a distância. Aos meus amigos feitos no decorrer da graduação por sempre animar meus dias na sala 10 ou no CA, amigos estes que pretendo continuar por mais tempo.

Aos meus professores da graduação que são ótimos em passar conhecimentos, se esforçando para sempre dar as melhores aulas mesmo com as dificuldades.

Aos membros da banca examinadora **Adna Cristina** e **Rafael Travassos** por aceitarem fazer parte e contribuírem para o término dessa jornada.

“Inteligência é a habilidade de se adaptar às mudanças”

(Stephen Hawking)

## RESUMO

Os organismos evoluíram para possuir um mecanismo para se adaptarem a variações circadianas. Esse mecanismo endógeno, chamado de relógio molecular, que tem capacidade de sincronizar os sinais ambientais com diversos aspectos fisiológicos é também importante para a homeostase do tecido muscular esquelético, dentre outros. O relógio molecular é composto por uma rede de fatores de transcrição, incluindo o gene *bmal1a*, que possui expressão circadiana e está envolvida na expressão de fatores miogênicos, importante para a homeostase e desenvolvimento do músculo. Entretanto ainda é desconhecido a importância fisiológica do ritmo para o tecido muscular em peixes. O objetivo desse trabalho é investigar o efeito da transgenia músculo-específica do *bmal1a* no número de mitocôndrias e das fibras musculares, utilizando o peixe-zebra como modelo experimental. Os peixes transgênicos foram selecionados através da visualização de fluorescência no coração de embriões através de microscopia de fluorescência, já que os peixes transgênicos possuem coração verde fluorescente. O número de mitocôndrias foi analisado através da relação do gene 16S ou ND1 com o PolG e indicou que não houve diferença entre transgênicos e não-transgênicos. Quanto a histologia, não foi possível obter um número de amostras significativo para análise estatística, porém uma análise prévia indicou que não haveria diferença e não demos continuidade aos experimentos. De modo geral, a inserção de um gene *bmal1a* com expressão constitutiva não apresentou alteração na homeostase no músculo esquelético no que se refere ao número de mitocôndrias.

Palavras-chave: Ciclo circadiano; relógio molecular; CCGs; miogênese



## ABSTRACT

Organisms evolved to have a mechanism to adapt to circadian variations. This endogenous mechanism, called the molecular clock, which has the ability to synchronize environmental signals with several physiological aspects is also important for homeostasis of skeletal muscle tissue, among others. The molecular clock is composed of a network of transcription factors, including the *bmal1a* gene, which has circadian expression and is involved in the expression of myogenic factors, important for homeostasis and muscle development. However the physiological importance of rhythm for muscle tissue in fish is still unknown. The objective of this work is to investigate the effect of muscle-specific transgenesis of *bmal1a* on the number of mitochondria and muscle fibers, using zebrafish as an experimental model. The transgenic fish were selected by fluorescence visualization in the embryo heart through fluorescence microscopy, since the transgenic fishes have green fluorescent heart. The number of mitochondria was analyzed by the ratio of the 16S or ND1 gene to the PolG and indicated that there was no difference between transgenic and non-transgenic. As for histology, it was not possible to obtain a significant number of samples for statistical analysis, but a previous analysis indicated that there would be no difference and we did not give continuity to the experiments. In general, the insertion of a *bmal1a* gene with constitutive expression did not present alteration in skeletal muscle homeostasis with respect to the number of mitochondria.

Keywords: Cycle circadian; molecular clock; CCGs; myogenesis;

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Modelo do mecanismo do relógio molecular de mamíferos. A alça positiva (*bmal1* e *clock*) ativa a expressão da alça repressora (*per* e *cry*) que vão reprimir a ativação da alça positiva. A alça de positiva também atua na alça alternativa (*rora* e *rev-erb*) que atua ativando (*rora*) e inibindo (*rev-erb*) a alça positiva. O modelo também mostra genes controlados pelo relógio (CCGs), neste caso o gene *myoD* e *Pgc1 $\beta$*  em músculo esquelético (ANDREWS et al., 2010)..17

Figura 2- Exemplo de peixe-zebra, organismo modelo utilizado nesse trabalho. 18

Figura 3- Foto do coração de uma larva de peixe-zebra em microscópio de fluorescência. Visualização do coração permite a seleção entre animais T (esquerda, coração evidenciado por uma seta branca) e NT (direita, a região onde o coração está aparece sem fluorescência). .....22

Figura 4- Tamanhos dos peixes em comprimento padrão CP. Não houve diferença significativa entre as linhagens transgênicas e não-transgênicas Teste *t-student* ( $p < 0,05$ ). .....25

Figura 5- Níveis de expressão dos genes mitocondriais 16S e ND1 normalizados com PolG. Não houve diferença significativa entre as linhagens. Teste estatístico *t-student* ( $p < 0,05$ ). .....26

Figura 6- Análise de celularidade do músculo esquelético (A) e distribuição das fibras por área (B). Cortes histológicos corados com Hematoxilina de Harris num aumento de 100x. "F" representa uma fibra muscular, enquanto que "n" indica a posição periférica do núcleo da fibra muscular. Em B, é mostrada a distribuição das fibras musculares por frequência de área, no inserto é mostrada a área média  $\pm$  desvio padrão da média. ....27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação Taxonômica do Peixe-Zebra. ....19

Tabela 2 – Sequência dos *primers* utilizados no experimento. ....22

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bHLH-pas	<i>basis Helix-Loop-Helix, Period-ARNT-Single-Minded domain</i>
<i>bmal1</i>	<i>brain and muscle ARNT-like protein 1</i>
CCGs	<i>Clock Controlled Genes</i> (genes controlados pelo relógio)
<i>Clock</i>	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
<i>Cmcl2</i>	Miosina cardíaca de cadeia leve
<i>Cry</i>	<i>cryptochrome circadian clock</i>
EGFP	Enhanced green fluorescent protein (proteína fluorescente verde melhorada)
<i>myoD</i>	<i>myogenic differentiation factor</i>
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
NT	Peixe-zebra não transgênico para o gene <i>bmal1a</i>
<i>Per</i>	<i>period</i>
<i>Rora</i>	<i>Rar-related orphan receptor <math>\alpha</math></i>
T	Peixe-zebra transgênico para o gene <i>bmal1a</i>

Obs.: As siglas ou abreviaturas que não estejam nessa lista, estão descritos no texto ou são siglas universais.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	14
2.1	Fotoperíodo e crescimento somático .....	14
2.2	Ritmo Circadiano .....	14
2.2.1	Percepção da luz.....	15
2.2.2	Mecanismo do relógio molecular .....	15
2.2.3	Ritmo circadiano e musculo esquelético .....	16
2.3	Peixe-zebra .....	18
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivo geral .....	20
3.2	Objetivos específicos.....	20
4	MATÉRIAL E MÉTODOS.....	21
4.1	Cultivo e manejo dos peixes-zebra .....	21
4.2	Peixe transgênico bmal1a+ .....	21
4.3	Eutanásia e coleta de tecido do músculo esquelético .....	22
4.4	Extração de DNA genômico e PCR quantitativa .....	23
4.5	Análise histológica do músculo esquelético .....	24
4.6	Análise estatística .....	24
5	RESULTADOS.....	25
5.1	Biometria dos peixes .....	25
5.2	Número relativo de mitocôndrias.....	25
5.3	Número e volume de fibras musculares .....	26
6	DISCUSSÃO.....	28
7	CONCLUSÕES.....	30
	REFERÊNCIAS .....	31
	Apêndice A – Curva de Melting (dissociação) dos genes mitocondriais	35

Anexo A – Certidão CiBio .....	38
Anexo B – Certidão CEUA.....	39

## 1 INTRODUÇÃO

A piscicultura tem se tornado uma grande fonte de alimento para a população. O rendimento de produção é dependente do sistema de cultivo, sendo assim a otimização do sistema está em constante estudo para aprimoramento. A maioria desses estudos tem focado nas condições de cultivo, porém ainda é necessário compreender as vias metabólicas que estão por trás da regulação do crescimento, que ainda é uma área carente de pesquisas, principalmente em espécies de interesse econômico. É sabido que existem diversos fatores ambientais que regulam o crescimento em peixes, entre eles está a alimentação, densidade populacional, qualidade da água, temperatura e luz (BENDHACK et al., 2013; SADO; BICUDO; CYRINO, 2014).

Ciclo circadiano são padrões de atividades biológicas que ocorrem numa periodicidade de 24h. Diversos aspectos biológicos estão sob influência desse ciclo, como metabolismo energético, ciclo celular e crescimento somático, além de fatores comportamentais, como locomoção e obtenção de alimento. O fotoperíodo é um fator importante para a regulação do crescimento muscular em peixes visto que frequentemente é observada uma alteração do crescimento muscular e somático quando o fotoperíodo durante o desenvolvimento é alterado (BJÖRNSSON et al., 2000). O mecanismo molecular que possivelmente está por trás desse efeito é o mecanismo do relógio molecular, que é composto por uma rede de regulação de transcrição de genes (KO; TAKAHASHI, 2006). Esse mecanismo é responsável pela regulação de atividades metabólicas com ritmo circadiano. É sabido que alterações nos genes do mecanismo do relógio molecular alteram o crescimento e função do músculo esquelético de mamíferos (ANDREWS et al., 2010). O efeito da ablação ou modificação do relógio molecular em peixes, no entanto, é pouco conhecido.

Neste contexto, a hipótese norteadora deste trabalho é que a modificação da expressão de um gene do relógio molecular levaria à modificação do crescimento muscular, considerando a importância do relógio molecular para a homeostase do organismo. Assim o objetivo desse trabalho é investigar os efeitos no músculo esquelético de peixe-zebra para um peixe transgênico para o gene *bmal1a* na homeostase nesse tecido.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Fotoperíodo e crescimento somático

O ambiente é um fator que influencia o crescimento dos peixes. Diversos fatores ambientais estão presentes na regulação de crescimento desses animais como alimentação, temperatura, qualidade da água, densidade e o fotoperíodo (BENDHACK et al., 2013; SADO; BICUDO; CYRINO, 2014). Estudos mostram que diferentes fotoperíodos afetam no crescimento de peixes. Um desses estudos foi feito com salmão do atlântico (*Salmo salar*) que, quando foram submetidos num cultivo com fotoperíodo de 24h claro, apresentaram um crescimento somático maior do que comparado com o cultivo com fotoperíodo de 12h claro e 12h escuro (BJÖRNSSON et al., 2000). Além disso, um trabalho utilizou uma espécie com maior interesse da piscicultura nacional, a tilápia, para avaliar o efeito do crescimento em diferentes fotoperíodos. O resultado foi um maior crescimento no regime que estava com fotoperíodo de 18h claro e 6h escuro em relação ao regime 12:12 claro:escuro (EL-SAYED; KAWANNA, 2007). Também foram analisados os efeitos do fotoperíodo no tambaqui (*Colossoma macropomum*) que apresentou efeitos no crescimento do peixe sem alterar a eficiência proteica, quando estes foram cultivados em sistemas com maior exposição à luz (MENDONÇA et al., 2012). Isso demonstra que a luz (fotoperíodo) possui uma influência no crescimento de diferentes espécies de peixes.

### 2.2 Ritmo Circadiano

A palavra 'circadiano' vem do latim *circa diem*, no qual *circa* significa cerca e *diem* significa dia, em outras palavras significa "aproximadamente um dia" (KWON et al., 2011). Na biologia, ritmos circadianos são variações metabólicas e comportamentais que acontecem com uma periodicidade de 24h. É sabido que todos os organismos evoluíram para possuir algum mecanismo para se adaptarem a situações de dia e noite (KWON et al., 2011). Os primeiros estudos sobre o ciclo circadiano em animais foram feitos em *Drosophila melanogaster* e atualmente se tem estudado nos mais diversos organismos, como camundongos, cianobactérias e peixes (TAKAHASHI, 2004; PESCHEL; HELFRICH-FÖRSTER, 2011).



### 2.2.1 Percepção da luz

Em mamíferos a luz é captada por células fotorreceptoras localizadas na retina e essa informação é transmitida para o hipotálamo (ALBRECHT, 2012). Desta região, a informação é levada até o núcleo supraquiasmático (NSQ) pelo trato retino-hipotalâmico, que vai induzir a expressão de genes do relógio molecular. Sinais neuroendócrinos do SCN realizam a sincronização do ritmo circadiano com os relógios moleculares nos tecidos periféricos, como fígado e músculo (REPPERT; WEAVER, 2002; KO; TAKAHASHI, 2006; DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010). Em peixes, a percepção da luz ocorre também diretamente pela glândula pineal que possui características fotorreceptivas intrínsecas ao tecido, capazes de gerar um ritmo circadiano (FALCÓN et al., 2007). Essa sincronização entre os órgãos centrais (olhos e glândula pineal) e órgãos periféricos ainda não é muito bem elucidada, mas já se sabe que a síntese da melatonina está envolvida nesse processo (ZIV et al., 2005; KORF; VON GALL, 2006). O papel dos órgãos centrais na sincronização do metabolismo dos tecidos periféricos em peixes tem sido questionado, visto que estudos apontam que tecidos periféricos são responsivos diretamente a luz (WHITMORE et al., 1998; WEGER et al., 2011).

### 2.2.2 Mecanismo do relógio molecular

O mecanismo do relógio molecular é uma rede de transcrição e tradução de genes que possui uma periodicidade de 24h. Os primeiros estudos em animais foram feitos em *Drosophila* e quando foram comparados o mecanismo presente na mosca da fruta com o presente em invertebrados foram observadas similaridades, mostrando que é um processo conservado durante a evolução (VATINE et al., 2011). Os genes que compõem o mecanismo do relógio molecular codificam fatores de transcrição que interagem para sincronizar e controlar este relógio (CERMAKIAN et al., 2000). Estes fatores de transcrição podem tanto ativar a expressão de gene como reprimir (CECON; FLÔRES, 2010). Em mamíferos, o mecanismo do relógio molecular é constituído por duas alças de regulação, uma positiva e outra negativa. A alça positiva é constituída pelos genes *clock* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) e *bmal1* (*Brain and Muscle ARNT-like protein 1*), pertencentes a família bHLH-pas (*basic Helix-Loop-Helix, Period-ARNT-Single-Minded*) que formam um heterodímero.

CLOCK:BMAL1 atua na iniciação da transcrição de genes que contenham sequências *enhancer* regulatórias E-box, entre eles os genes *per* (*period*) e *cry* (*cryptochrome*) (JETTEN A. M., 2009; MAYEUF-LOUCHART; STAELS; DUEZ, 2015). Os genes *per* e *cry* constituem a alça regulatória negativa do mecanismo do relógio molecular. Esses genes formam um heterodímero PER:CRY que atua como *feedback* negativo dos genes *clock* e *bmal1* (REPPERT; WEAVER, 2002; HIROTA; FUKADA, 2004). Esse ciclo de transcrição entre as alças dura aproximadamente 24h promovendo a periodicidade do sistema (KO; TAKAHASHI, 2006; MCCARTHY et al., 2007). Outra alça regulatória paralela às outras é composta por *rev-erb* e *rora*, que possui expressão dirigida pelo heterodímero CLOCK:BMAL que possui a capacidade de ativar ou inativar a expressão dos genes que o ativam, sendo o *rev-erb* reprimindo e o *rora* ativando. Estes atuam no promotor RORE (*Retinoic Acid-Related Orphan Receptor Response Element*) presente no promotor do gene BMAL1 (GUILLAUMOND et al., 2005; GEYFMAN et al., 2012). Um modelo simplificado está demonstrado na Figura 1.

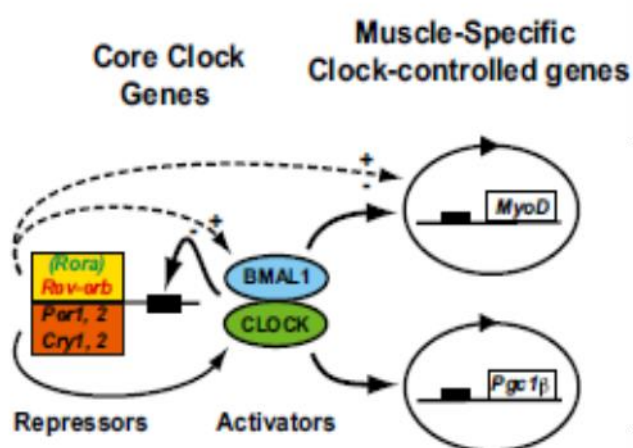
Em peixes, o mecanismo é bastante similar ao mecanismo de mamíferos, porém existe a presença de genes parálogos do relógio molecular (VATINE et al., 2011). Durante a evolução dos peixes teleósteo ocorreu uma duplicação do genoma no ancestral comum, o que levou a uma diversidade maior de genes componentes do relógio molecular (LIU et al., 2015). Por exemplo, o gene *bmal1* possui 3 parálogos – *bmal1a*, *bmal1b* e *bmal2* -, o *clock* também possui 3 parálogos – *clock1a*, *clock1b* e *clock2*. Em genes *per* e *cry* a presença de cópias é ainda maior tendo o *per* 4 parálogos – *per1a*, *per1b*, *per2* e *per3* – e *cry*, 6 parálogos – *cry1a*, *cry1b*, *cry2a*, *cry2b*, *cry3* e *cry4* (VATINE et al., 2011). Os parálogos podem formar diferentes combinações de heterodímeros ocasionando a diferentes funções circadianas (CERMAKIAN et al., 2000). Com isso, o mecanismo do relógio molecular em peixes é provavelmente um mecanismo mais complexo quando comparado com o organismo modelo de mamíferos (VATINE et al., 2011).

### 2.2.3 Ritmo circadiano e musculo esquelético

O heterodímero CLOCK:BMAL atua além da ativação de expressão de PER e CRY, atuam em outros genes do metabolismo que contenham a sequência E-box,

sendo esses chamados de genes controlados pelo relógio (do inglês *clock-controlled genes*, CCGs). Esses CCGs estão presentes em diversos órgãos e participam de diversos processos metabólicos, a exemplo do ciclo celular (PEYRIC; MOORE; WHITMORE, 2013;). Andrews et al., 2010 mostrou que quando promovia uma inibição de genes do relógio molecular (CLOCK e/ou BMAL) causava uma alteração na homeostase do músculo esquelético. Além disso, os autores demonstraram que os genes *myoD* e *pgc1β* são CCGs que atuam como fator de regulação miogênica no crescimento e desenvolvimento muscular e na homeostase mitocondrial respectivamente (ANDREWS et al., 2010). Outros estudos mostram que a depressão na expressão de genes do relógio induzem injúrias no músculo esquelético que estão associados a distúrbios metabólicos (MAYEUF-LOUCHART; STAELS; DUEZ, 2015). Estudos em camundongos utilizando linhagem sem expressão de *bmal1* causou uma redução da massa muscular total, com diminuição do diâmetro da fibra muscular, além da perda de peso e artropatia progressiva (BUNGER et al., 2005; CHATTERJEE et al., 2013).

**Figura 1** –Modelo do mecanismo do relógio do molecular de mamíferos.



**Fonte:** Andrews et al., (2010).

A alça positiva (*bmal1* e *clock*) ativa a expressão da alça repressora (*per* e *cry*) que estes vão reprimir a ativação da alça de repressão. A alça de ativação também atua na alça alternativa (*rora* e *rev-erb*) que atua ativando e inibindo respectivamente. Ainda mostra CCGs, neste caso o gene *myoD* e *Pgc1β* em músculo esquelético (ANDREWS et al., 2010).

No músculo esquelético do peixe-zebra já foi caracterizado o perfil de expressão de diversos genes do mecanismo do relógio molecular, demonstrando o perfil de transcritos de importância para o crescimento muscular, como os CCGs *myf6*, *igfbp3*, *igfbp5b* e *hsf2*. A expressão circadiana desses genes pode representar uma importante correlação entre o mecanismo do relógio molecular com o crescimento de músculo esquelético em peixe-zebra (AMARAL; JOHNSTON, 2012). Apesar de se ter conhecimento desses CCGs no músculo esquelético ainda são necessários mais estudos para elucidar a importância dessa via para a fisiologia do crescimento muscular (LAZADO et al., 2014).

### 2.3 Peixe-zebra

O peixe-zebra é um peixe teleósteo da família *Cyprinidae*, conhecido como paulistinha devido as listras horizontais de cor azul-escuro e é conhecido pela comunidade científica como *zebrafish* (NASIADKA; CLARK, 2012). Quanto a sua anatomia, é um peixe pequeno, possuindo tamanho entre 3-5 cm de comprimento na idade adulta, sendo que as fêmeas possuem uma circunferência abdominal maior que os machos (SCHNEIDER et al., 2009) (Figura 2). Este peixe é nativo do subcontinente indiano, normalmente habitando águas rasas de riachos de água doce e rios (SPENCE et al., 2006). Uma característica do peixe-zebra é a alta taxa de reprodução, sendo capazes de reproduzir o ano todo e apresentar um curto tempo de geração, devido a eclosão dos embriões ocorrer após 3 dias da fertilização e atingirem a idade adulta com 3 meses de vida (WESTERFIELD, 2007). A classificação taxonômica do peixe-zebra está representada na Tabela 1.

**Figura 2** – Exemplo de peixe-zebra, organismo modelo utilizado nesse trabalho



**Fonte:** *The Zebrafish International Network (zfin)*

**Tabela 1** – Classificação Taxonômica do Peixe-Zebra

Peixe-zebra	
Reino	<i>Animalia</i>
Filo	<i>Chordata</i>
Classe	<i>Teleostei</i>
Ordem	<i>Cypriniformes</i>
Família	<i>Cyprinidae</i>
Gênero	<i>Danio</i>
Espécie	<i>Danio rerio</i>

**Fonte:** Integrated Taxonomic Information System (ITIS)

O peixe-zebra foi inicialmente utilizado em estudos de embriologia por possuir transparência na fase embrionária e larval, facilitando os estudos. Atualmente é um modelo experimental de vertebrados que é utilizado em diversos campos da ciência, sendo utilizado como organismo modelo na piscicultura (DAHM; GEISLER, 2006). Características do peixe-zebra são importantes para ser utilizado como organismo modelo como a alta fecundidade, maturidade sexual em curto tempo (10-12 semanas) e apresentar um corpo pequeno (WESTERFIELD, 2007; BEN-MOSHE; FOULKES; GOTHILF, 2014). Vários estudos foram feitos em diferentes aspectos sobre o peixe como bioenergética (CHIZINSKI et al., 2008), comportamento (MILLER; GERLAI, 2007), crescimento (SICCARDI et al., 2009) e metabolismo (PLAUT; GORDON, 1994). Devido a importância desse animal para a ciência, várias ferramentas de pesquisa foram desenvolvidas, como o projeto genoma quase concluído, extensa informação sobre linhagens mutantes o que facilita estudos de expressão gênica nestes organismos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Analisar as diferenças entre a linhagem transgênica e não-transgênica para o gene *bmal1a* quanto à capacidade de crescimento e metabolismo muscular.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Investigar o número de células musculares esqueléticas no miótomo de peixes não-transgênicos e transgênicos com aproximadamente um ano de idade;
- Investigar o volume das células musculares esqueléticas no miótomo de peixes não-transgênicos e transgênicos com aproximadamente um ano de idade;
- Investigar o número relativo de mitocôndrias no miótomo de peixes não-transgênicos e transgênicos com aproximadamente um ano de idade.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cultivo e manejo dos peixes-zebra

A linhagem transgênica *bmal1a* foi obtida através de uma parceria com a Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Os peixes que foram positivos para a transgenia foram levados para o Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos (LABOrA) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (CBiotec/UFPB). Esses peixes foram reproduzidos com uma linhagem não transgênica já presente no laboratório que foram adquiridos de lojas de aquarismo de João Pessoa-PB.

Os peixes utilizados nos experimentos foram resultados de cruzamentos entre peixes transgênicos (T) e peixes não-transgênicos (NT). A seleção entre T e NT foi realizado através de microscopia de fluorescência utilizando o microscópio MOTIC modelo MHG-100B acoplado ao filtro FITC (EXD480/30x e BA D535/40m), no qual era visto o coração dos alevinos após 3 dias de fertilização, melhor abordado no item 4.2. Os peixes obtidos do cruzamento foram cultivados em aquários de 20L com água doce, recirculação de água, temperatura em torno de 28°C, fotoperíodo de 12/12h claro/escuro e foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial Tropical DISCUS GRAN (Tropical®).

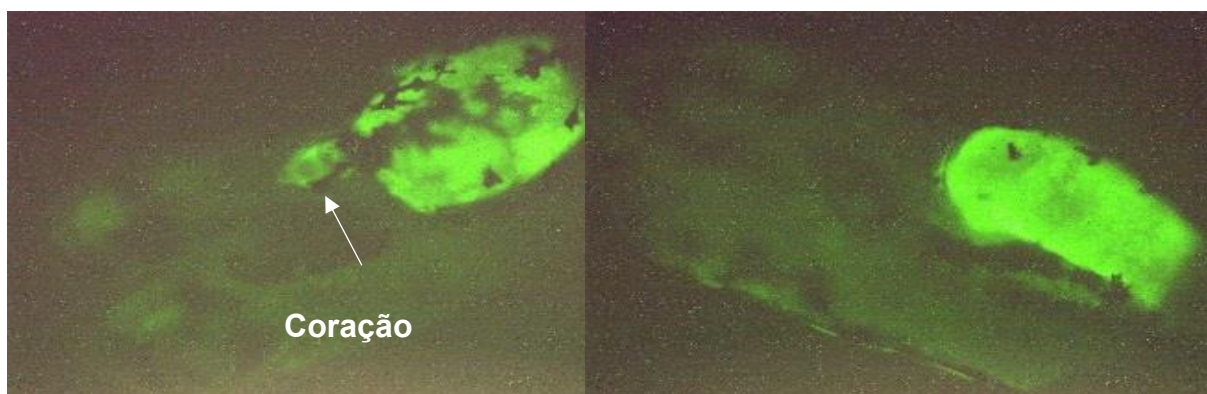
### 4.2 Peixe transgênico *bmal1a+*

Os peixes-zebra transgênicos foram obtidos através da inserção de um plasmídeo recombinante (SOUSA, 2016). Esse plasmídeo foi construído contendo o gene *bmal1a* sob o controle da expressão pelo promotor da cadeia leve da miosina 2 (*Mylz2*) do peixe-zebra. Também continha um gene repórter (*EGFP*) sobre o controle de expressão promotor da miosina cardíaca do peixe-zebra (*Cmcl2*). Por fim, o plasmídeo tinha uma região flanqueadora dos dois genes supracitados pelas sequências *Tol* que é responsável pela inserção dos genes *bmal1a* e *EGFP* no genoma do peixe-zebra. A adição do plasmídeo no peixe-zebra foi feita por microinjeção em embriões recém fertilizados em estágio de apenas uma única célula.

Esse plasmídeo concede ao peixe-zebra transgênico um gene *bmal1a* que tenha uma expressão constitutiva no tecido muscular. Além disso, o gene *EGFP* concede ao coração uma fluorescência verde quando observados em microscopia de

fluorescência, permitindo a distinção dos peixes positivos para a transgenia dos peixes negativos (Figura 3). Os peixes transgênicos foram submetidos a análise do Comitê Interno de Biossegurança (CiBio) e está registrado sob protocolo CiBio 01/05 (Anexo A).

**Figura 3** – Foto do coração de uma larva de peixe-zebra em microscópio de fluorescência.



**Fonte:** SOUSA, (2016).

Visualização do coração permite a seleção entre animais T (esquerda, coração evidenciado por uma seta branca) e NT (direita, a região onde o coração está aparece sem fluorescência).

#### **4.3 Eutanásia e coleta de tecido do músculo esquelético**

Para analisar o número relativos de mitocôndrias, número de fibras musculares e volume celular os peixes com idade de aproximadamente um ano, foram emergidos numa solução de etil 3-aminobenzoate metanosulfonato (MS-222, Sigma Aldrich) para anestésiar os animais. Após a anestesia dos peixes, estes foram transferidos para uma solução de MS-222 com uma concentração três vezes maior que a concentração da solução de anestesia causando overdose no animal. Esse é um dos métodos recomendados pela diretriz do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi submetido a análise pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da UFPB, e está registrado sob protocolo número 1605/04 (Anexo B). O número de peixes eutanasiados foi um total de 12 peixes T e 12 peixes NT para analisar o número relativos de mitocôndrias e foi dissecado uma parte do musculo esquelético. Para as análises histológicas foram utilizados um total de 10 peixes (5 de



cada linhagem) que foram medidos em papel milimetrado e feito uma seção em 70% do tamanho padrão do animal.

#### 4.4 Extração de DNA genômico e PCR quantitativa

A extração de DNA genômico foi realizado utilizando a amostra coletada de musculo esquelético e o kit GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep da Sigma-Aldrich, seguindo o protocolo de extração recomendado pelo fabricante. A PCR quantitativa (tempo real) foi realizada usando o kit SYBR Green (Life Technologies) e foi utilizando o termociclador 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Foi utilizado o seguinte termociclo: (1) ativação inicial a 95°C por 10 min, (2) desnaturação inicial a 95°C por 30s, (3) anelamento dos *primers* ao DNA a 50°C por 30s, (4) extensão da cadeia a 72°C por 30s, parte no qual a fluorescência é medida, sendo os passos 2 a 4 foram repetidos em um ciclo de 40x. Os genes utilizados para na RT-PCR foram os genes PolG (genômico), 16S e ND1 (mitocondriais). Os *primers* utilizados estão mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Sequência dos *primers* utilizados no experimento

Ensembl Gene	Sequência dos <i>primers</i>	T <sub>m</sub> (°C)	Referência
PolG	f. GAGAGCGTCTATAAGGAGTAC r. GAGCTCATCAGAAACAGGACT	53,9 60,1	(ARTUSO et al., 2012)
16S	f. CAAACACAAGCCTCGCCTGTTTAC r. CACTGACTTGATGGGGAGAACAGT	69,3 69,5	(HUNTER et al., 2010)
ND1	f. AGCCTACGCCGTACCAGTATT r. GTTTCACGCCATCAGCTA	63,5 64,7	(ARTUSO et al., 2012)

#### **4.5 Análise histológica do músculo esquelético**

As amostras foram colocadas em suportes de cortiça e mergulhadas em isopentano (2-metil butano) equilibrado na temperatura do nitrogênio líquido através de um banho-maria em nitrogênio líquido. Após o congelamento foram realizadas seções em comprimento de 0,8 $\mu$ m no criostato Leica modelo CM 1860. Após a secagem dos cortes à temperatura ambiente, os tecidos foram corados com Hematoxilina de Harris (QEEL) durante 2min e secas à temperatura ambiente (JOHNSTON et al., 2004). As lâminas foram observadas ao microscópio MOTIC modelo MHG-100B acoplada a uma câmera que foi utilizada para fotografar as amostras. Através das fotos foi medida a área do miótomo e foi contado em torno de 1000 células e medida a área celular.

#### **4.6 Análise estatística**

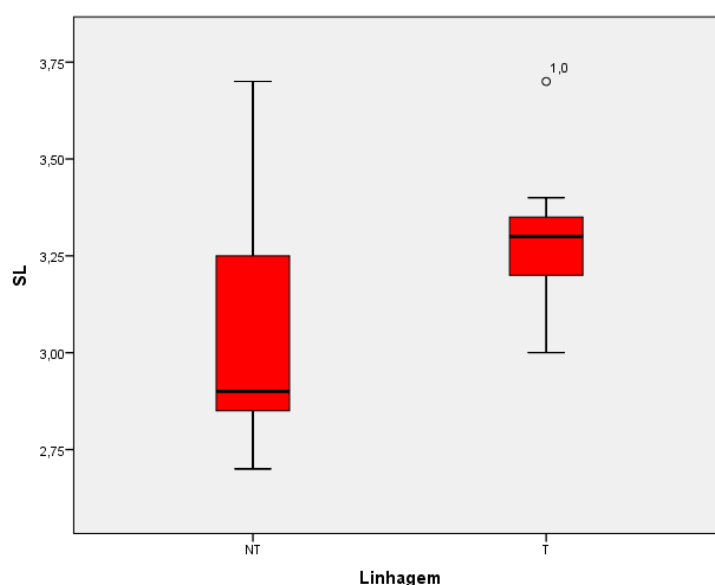
Os dados estatísticos foram analisados primeiramente o tipo de distribuição, se era normal ou diferente da normal, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov com nível de significância de 0,05 ( $p < 0,05$ ). Para analisar se havia diferença entre as linhagens foi realizado o teste *t-student*. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa IBM SPSS Statics 21.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Biometria dos peixes

O tamanho dos peixes entre T e NT foi analisado para determinar se os dados sobre o número de mitocôndrias número e volume celular sofreram alguma influência sobre o tamanho dos peixes. O tamanho utilizado nessa análise foi o comprimento padrão (CP) e não houve diferença significativa entre as linhagens ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).

**Figura 4** – Tamanhos dos peixes em comprimento CP.



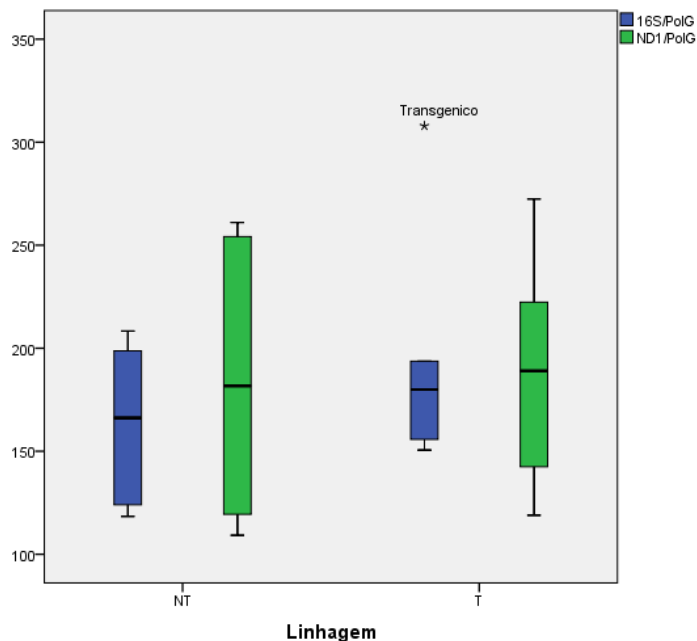
**Fonte:** o autor (2017)

Não houve diferença significativa entre as linhagens transgênicas e não-transgênicas. Teste estatístico *t-student* ( $p < 0,05$ ).

### 5.2 Número relativo de mitocôndrias

A PCR quantitativa foi realizada para analisar a expressão de genes mitocondriais para obter o número relativos de mitocôndrias. A expressão dos genes de interesse 16S e ND1 foram normalizados com o gene genômico PolG e não foi verificada diferença significativa entre a linhagem T e a NT. O resultado da diferença de expressão apresentou um  $p < 0,05$ , mostrando que não houve diferença significativamente dos genes 16S e ND1 entre as linhagens (Figura 5). As curvas de dissociação dos produtos de PCR apresentaram apenas um único pico indicando que não houve formação de produtos inespecíficos (Apêndice A).

**Figura 5** – Níveis de expressão dos genes mitocondriais 16S e ND1 normalizados com PolG.



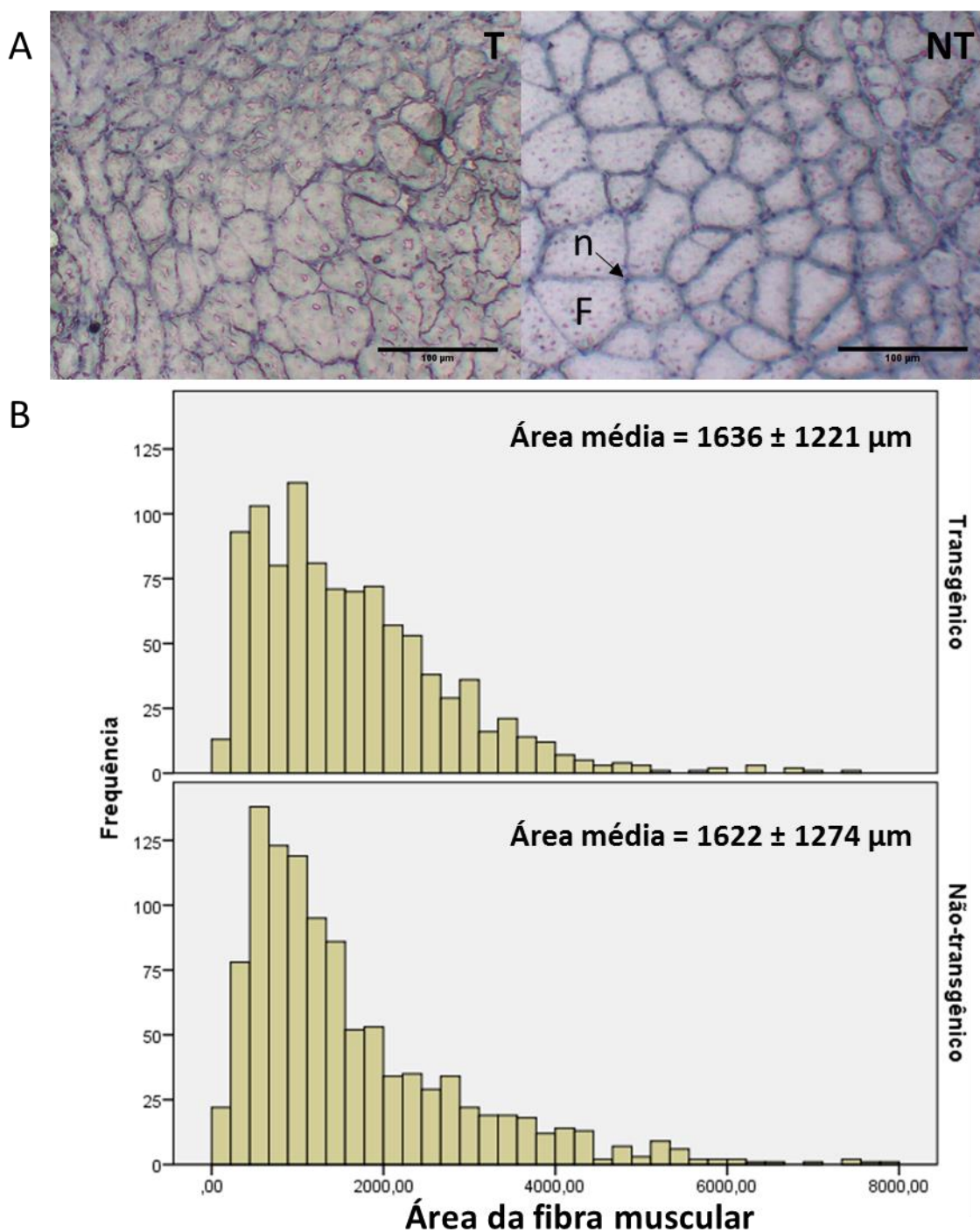
**Fonte:** o autor (2017)

Não apresentou diferença significativa entre as linhagens. Teste estatístico *t-student* ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Número e volume de fibras musculares

As análises histológicas dos peixes para determinar o número de fibras e o volume celular foi comprometido devido à perda de material durante o experimento provavelmente a problemas estruturais da universidade. Só foi possível analisar 3 amostras, sendo uma de peixe transgênico e duas de peixes não-transgênico. Os dados dessas amostras apresentaram uma similaridade entre as linhagens, contudo com o número muito pequeno de amostras não foi possível realizar um teste estatístico (Figura 6). A partir dessa análise previa do experimento foi decidido que não teria prosseguimento do experimento para evitar gastos e mortes de animais desnecessariamente.

**Figura 6** – Análise de celularidade do músculo esquelético (A) e distribuição das fibras por área (B).



**Fonte:** o autor, 2017

Cortes histológicos corados com Hematoxilina de Harris num aumento de 100x. “F” representa uma fibra muscular, enquanto que “n” indica a posição periférica do núcleo da fibra muscular. Em B, é mostrada a distribuição das fibras musculares por frequência de área, no inserto é mostrada a área média  $\pm$  desvio padrão da média.

## 6 DISCUSSÃO

O crescimento e desenvolvimento de músculo esquelético são regulados por fatores miogênicos (CHEN; TSAI, 2008). Alguns desses fatores são regulados por relógio molecular, como o *myoD* em camundongos levando a perda de força muscular (ANDREWS et al., 2010). Na linhagem de camundongos *bmal1a* mutante apresentou alterações na distribuição das fibras musculares, além de perda de peso (CHATTERJEE et al., 2013). Mayeuf-Louchart e colaboradores (2016) indicam que as alterações no mecanismo do relógio molecular induzem efeitos deletérios no músculo esquelético por causar distúrbios metabólicos. Em peixes, foi demonstrado que alguns fatores miogênicos são controlados pelo relógio molecular, entre eles o *myf6* (AMARAL; JOHNSTON, 2012).

Com a adição do gene *bmal1a* com expressão constitutiva em peixe-zebra eram esperadas, segundo a hipótese do presente trabalho, alterações na sua fisiologia. Contudo, a linhagem transgênica *bmal1a* utilizada nesse experimento não apresentou diferença nos níveis de expressão de gene do relógio molecular (*bmal1a*) e dos fatores miogênicos (*myoD*, *myoG*, *myf5*, *myf6*) (SOUSA, 2016). A semelhança de expressão do *bmal1a* e dos fatores miogênicos entre as linhagens T e NT, demonstra que a abordagem de transgenia utilizada por nosso grupo não foi capaz de alterar o relógio molecular interno, resultando em aspectos semelhantes na fisiologia do peixe, como o metabolismo e o número de fibras musculares. O número relativo de mitocôndrias indica justamente que aspectos metabólicos do músculo esquelético como o número de mitocôndrias não apresentou diferença entre T e NT (Figura 5). Apesar de o número de células presentes no músculo esquelético não possuir um número experimental para análises estatísticas, numa análise previa foi visto que o número de fibras e a distribuição não apresentou diferença entre as linhagens. Isso corrobora com os achados de Andrews et. al. (2010) e Chatterjee et. al. (2013), já que os peixes não possuíram diferenças no gene *bmal1a* (SOUSA, 2016).

Algumas hipóteses foram formuladas para explicar o porquê que a inserção do gene *bmal1a* não foi suficiente para alterar o mecanismo do relógio molecular e conseqüentemente seus efeitos no músculo esquelético. A primeira hipótese é a estratégia utilizada para a transgenia dos peixes. Esse método consiste em inserir uma região de um plasmídeo modificado (nesse caso o gene *bmal1a* sobre o controle

da *mylz2*) dentro do genoma do animal, contudo não é realizado alterações na composição do gene *bmal1a* presente no próprio animal, (CLARK et al., 2011), levando a uma expressão concomitante dos dois genes. Uma estratégia que é muito recente e ainda está sendo estudada para a obtenção de uma linhagem transgênica é a utilização da técnica do CRISPR para fazer edição no DNA do animal (BARRANGOU; DOUDNA, 2016) levando a uma alteração específica no genoma, sem haver a inserção de outro gene. A segunda hipótese é a presença de cópias do gene *bmal* no peixe-zebra (VATINE et al., 2011), o que levaria a uma subexpressão dos genes parálogos *bmal1b* e *bmal2*, não contribuindo para a formação de heterodímeros BMAL1A:CLOCK responsável pela ativação dos CCGs, já que foi observada diferença na expressão de *clock1a* (SOUSA, 2016). A última hipótese é uma compensação das alças regulatórias do próprio mecanismo do relógio molecular para manter a homeostase do organismo. Essas hipóteses levam a uma homeostasia do relógio molecular e consequentemente a homeostasia dos CCGs apresentando características metabólicas e fisiológicas semelhantes entre as linhagens. Ainda é necessário mais estudos sobre a relação entre o ritmo circadiano e o desenvolvimento em músculo esquelético em peixes. A inserção do gene *bmal1a* sobre controle do *mylz2* não interferiu no metabolismo nem na quantidade de fibras musculares no peixe-zebra, porém outras estratégias de transgenia e modificação do genoma ou outros modelos de animais transgênicos podem ser criadas para melhor compreensão no tecido muscular, já que este é o produto de maior valor agregado na piscicultura e de amplo interesse industrial. Outras estratégias podem ser desenvolvidas para promover uma alteração do relógio molecular como a criação de outros transgênicos *clock1a* e *bmal1a*.

## **7 CONCLUSÕES**

A estratégia utilizada para obter o peixe-zebra transgênico não foi capaz de alterar a homeostasia do relógio molecular como reportado por SOUSA, 2016, logo não houve interferência na expressão dos fatores miogênicos. Isso leva a uma homeostase do musculo esquelético como mostrado pelo número relativo de mitocôndrias mostrados por esse trabalho.

Isso foi visto quanto ao número relativo de mitocôndrias que não teve diferença estatística significativa entre transgênicos e não-transgênicos. Quanto ao volume e número de fibras musculares não foi possível ter diferença estatística devido perda de material, mas em uma análise previa foi visto que provavelmente não haveria diferença para ambos os parâmetros.



## REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, U. Timing to Perfection: The Biology of Central and Peripheral Circadian Clocks. **Neuron**, v. 74, n. 2, p. 246–260, 2012.
- AMARAL, I. P. G.; JOHNSTON, I. A. Circadian expression of clock and putative clock-controlled genes in skeletal muscle of the zebrafish. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 1, p. R193–R206, 2012.
- ANDREWS, J. L. et al. CLOCK and BMAL1 regulate MyoD and are necessary for maintenance of skeletal muscle phenotype and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 44, p. 19090–19095, 2010.
- ARTUSO, L. et al. Mitochondrial DNA metabolism in early development of zebrafish (*Danio rerio*). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1817, n. 7, p. 1002–1011, 2012.
- BARRANGOU, R.; DOUDNA, J. A. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 933–941, 2016.
- BEN-MOSHE, Z.; FOULKES, N. S.; GOTHILF, Y. Functional development of the circadian clock in the zebrafish pineal gland. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- BENDHACK, F. et al. Desempenho do robalo-peva em diferentes temperaturas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 1128–1131, 2013.
- BJÖRNSSON, B. T. et al. Photoperiod Regulation of Plasma Growth Hormone Levels during Induced Smoltification of Underyearling Atlantic Salmon. **General and Comparative Endocrinology**, v. 119, n. 1, p. 17–25, 2000.
- BUNGER, M. K. et al. Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the *Mop3/Bmal-1* locus. **Genesis**, v. 41, n. 3, p. 122–132, 2005.
- CECON, E.; FLÔRES, D. E. Regulação da Expressão Gênica Nas Engrenagens Do Relógio Circadiano De Mamíferos. **Biologia**, v. 4, p. 28–33, 2010.
- CERMAKIAN, N. et al. Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 8, p. 4339–4344, 2000.
- CHATTERJEE, S. et al. Brain and muscle Arnt-like 1 is a key regulator of myogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 10, p. 2213–2224, 2013.
- CHEN, Y. H.; TSAI, H. J. Myogenic regulatory factors Myf5 and Mrf4 of fish: Current status and perspective. **Journal of Fish Biology**, v. 73, n. 8, p. 1872–1890, 2008.
- CHIZINSKI, C. J. et al. A bioenergetic model for zebrafish *Danio rerio* (Hamilton). **Journal of Fish Biology**, v. 73, n. 1, p. 35–43, 2008.
- CLARK, K. J. et al. Transgenic zebrafish using transposable elements. **Methods in Cell Biology**, v. 104, p. 137–149, 2011.
- DAHM, R.; GEISLER, R. Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 329–345, 2006.
- DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; ALBRECHT, U. **The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks**. [s.l.: s.n.]. v. 72
- EL-SAYED, A. F. M.; KAWANNA, M. Effects of photoperiod on growth and spawning

efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) broodstock in a recycling system. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 12, p. 1242–1247, 2007.

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.

GEYFMAN, M. et al. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1) controls circadian cell proliferation and susceptibility to UVB-induced DNA damage in the epidermis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 29, p. 11758–11763, 2012.

GUILLAUMOND, F. et al. Differential Control of Bmal1 Circadian Transcription by REV-ERB and ROR Nuclear Receptors. **Journal of Biological Rhythms**, v. 20, n. 5, p. 391–403, 2005.

HIROTA, T.; FUKADA, Y. Resetting Mechanism of Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. **Zoological Science**, v. 21, n. 4, p. 359–368, 2004.

HUNTER, S. E. et al. The QPCR assay for analysis of mitochondrial DNA damage, repair, and relative copy number. **Methods**, v. 51, n. 4, p. 444–451, 2010.

Integrated Taxonomic Information System (ITIS). Disponível em: <[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=163699#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=163699#null)> Acesso em: 15 de maio de 2017

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

JOHNSTON, I. A et al. Rapid evolution of muscle fibre number in post-glacial populations of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. **The Journal of experimental biology**, v. 207, n. Pt 25, p. 4343–4360, 2004.

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

KORF, H. W.; VON GALL, C. Mice, melatonin and the circadian system. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 252, n. 1–2, p. 57–68, 2006.

KWON, I. et al. Mammalian Molecular Clocks. **Exp Neurobiol**, v. 20, n. 1, p. 18–28, 2011.

LAZADO, C. C. et al. Daily rhythmicity of clock gene transcripts in Atlantic cod fast skeletal muscle. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–12, 2014.

LIU, C. et al. Molecular evolution and functional divergence of zebrafish (*Danio rerio*) cryptochrome genes. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8113, 2015.

MAYEUF-LOUCHART, A.; STAELS, B.; DUEZ, H. Skeletal muscle functions around the clock. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 17, n. S1, p. 39–46, 2015.

MCCARTHY, J. J. et al. Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle. **Physiological genomics**, v. 31, n. 1, p. 86–95, 2007.

MENDONÇA, P. P. et al. Morphometrical development of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) under different photoperiods. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 6, p. 1337–1341, 2012.

MILLER, N.; GERLAI, R. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 184, n. 2, p. 157–166, 2007.

NASIADKA, A.; CLARK, M. D. Zebrafi Breeding in the Laboratory Environment. **ILAR Journal**, v. 53, n. 2, p. 161–168, 2012.

PESCHEL, N.; HELFRICH-FÖRSTER, C. Setting the clock - By nature: Circadian

rhythm in the fruitfly *Drosophila melanogaster*. **FEBS Letters**, v. 585, n. 10, p. 1435–1442, 2011.

PEYRIC, E.; MOORE, H. A.; WHITMORE, D. Circadian Clock Regulation of the Cell Cycle in the Zebrafish Intestine. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–12, 2013.

PLAUT, I.; GORDON, M. S. Swimming Metabolism of Wild-Type and Cloned Zebrafish *Brachydanio Rerio*. **The Journal of experimental biology**, v. 194, n. 1, p. 209–23, 1994.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 935–941, 2002.

SADO, R. Y.; BICUDO, Á. J. A.; CYRINO, J. E. P. Growth and intestinal morphology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) fed dietary prebiotics (mannanligosaccharides-MOS). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1517–1524, 2014.

SCHNEIDER, A. C. R. et al. Implementação De Um Novo Modelo De Experimentação Animal - Zebrafish. **Revista HCPA**, v. 29, n. 2, p. 100–103, 2009.

SICCARDI, A. J. et al. Growth and Survival of Zebrafish ( *Danio rerio* ) Fed Different Commercial and Laboratory Diets. **Zebrafish**, v. 6, n. 3, p. 275–280, 2009.

SOUSA J. P. *Peixe-zebra (Danio rerio) Transgênico Para O Gene bmal1a: Efeitos No Relógio Molecular Do Músculo Esquelético* 67 f. Dissertação (Mestrado), Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2016.

SPENCE, R. et al. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. 5, p. 1435–1448, 2006.

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

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

WEGER, B. D. et al. The light responsive transcriptome of the Zebrafish: Function and regulation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

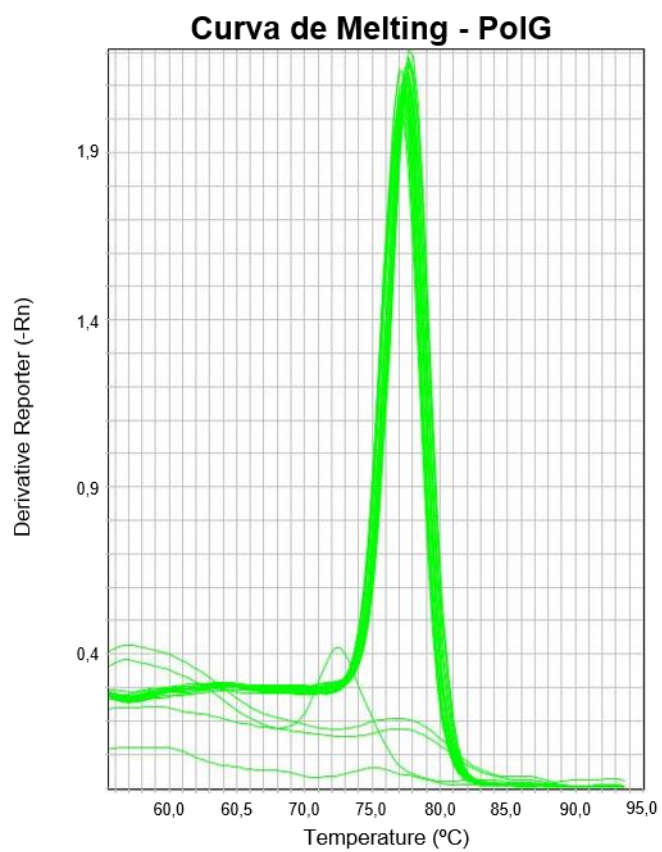
WHITMORE, D. et al. Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. **Nature neuroscience**, v. 1, n. 8, p. 701–707, 1998.

ZIV, L. et al. Functional development of the zebrafish pineal gland: Light-induced expression of period2 is required for onset of the circadian clock. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 17, n. 5, p. 314–320, 2005.

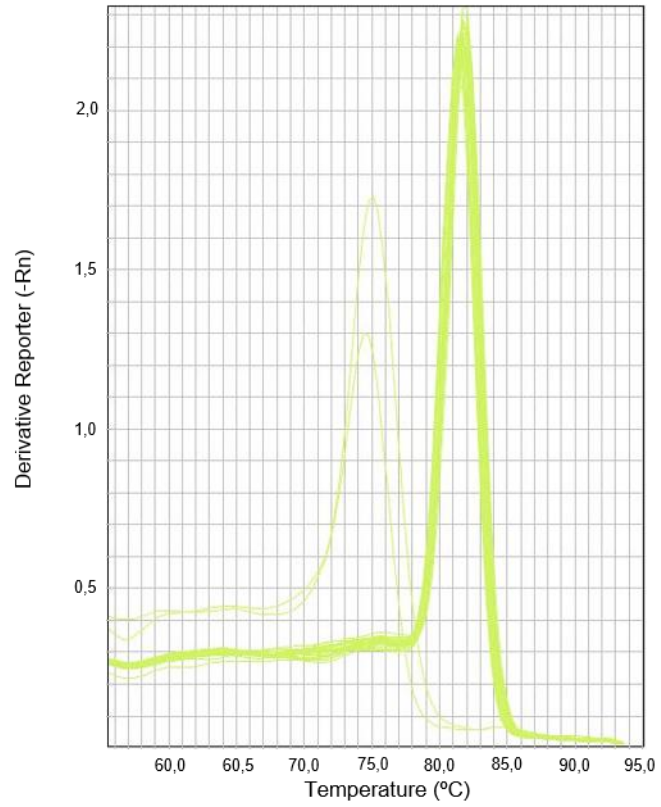
*The Zebrafish Information Network (ZFIN)*. Disponível em <<https://zfin.org/>> Acesso em: 15 de maio de 2017.

## APÉNDICE

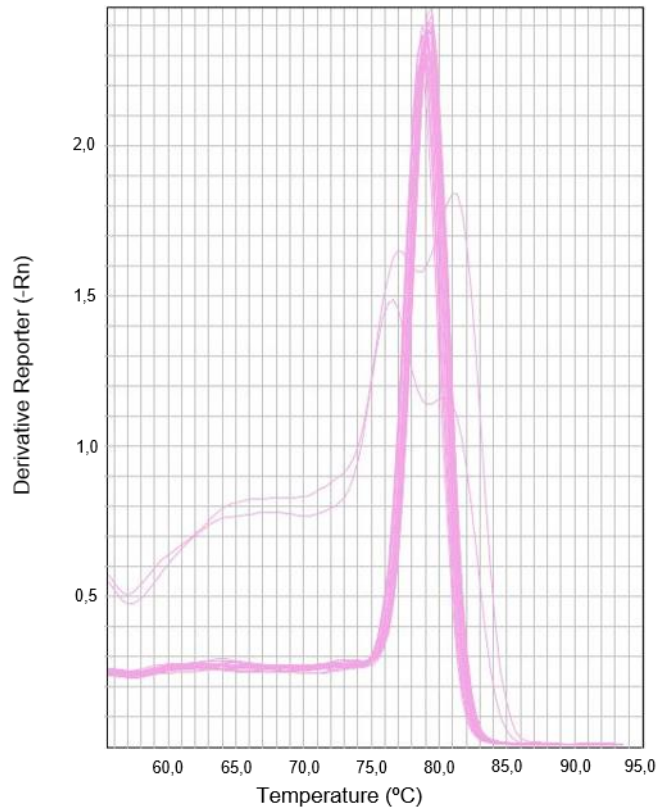
## Apêndice A – Curva de Melting (dissociação) dos genes mitocondriais



**Curva de Melting – 16S**



**Curva de Melting – ND1**



## **ANEXOS**

## Anexo A – Certidão CiBio



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA  
CQB 0016/97



### CERTIDÃO

Certifico que em 25 de junho de 2014 o Colegiado do CIBio do Centro de Biotecnologia da UFPB, aprovou o projeto, protocolado sob número 01/05, intitulado, "Estudo molecular do relógio biológico da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e do peixe-zebra (*Danio rerio*): efeitos no crescimento durante o cultivo", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral.

João Pessoa, 28 de junho de 2014.

Prof. Dr. Demétrius Antonio Machado de Araújo  
Presidente CIBio/CBiotec/UFPB



## Anexo B – Certidão CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIDÃO



João Pessoa, 1 de julho de 2014  
CEUA N° 1605/14

Ilmo(a). **Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral**  
Departamento **Biologia Celular e Molecular - CBiotec - UFPB**

Orientando(a): **A definir - Ian Porto, (Iniciação Científica)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **26/06/2014** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Efeito da transgenia para o gene bmal1a no mecanismo do relógio molecular no músculo esquelético do peixe-zebra (Danio rerio).**

Com previsão de empregar **120 Peixes - Cultivo próprio.**

Para serem utilizados no período de **01/08/2014 a 01/07/2015**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBiotec  
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba  
<https://sites.google.com/site/ceuaacbiotec/> – [ceua@cbiotec.ufpb.br](mailto:ceua@cbiotec.ufpb.br)