



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

**ANNA JULYANA VIANA CHIANCA BRILHANTE**

**CLONAGEM DO GENE *clock1a* DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) EM VETOR PARA  
EXPRESSÃO RESTRITA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

**JOÃO PESSOA-PB**

**2018**

ANNA JULYANA VIANA CHIANCA BRILHANTE

CLONAGEM DO GENE *clock1a* DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) EM VETOR PARA  
EXPRESSÃO RESTRITA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

Coorientadora: M.<sup>a</sup> Jucilene Pereira de Sousa

JOÃO PESSOA-PB

2018

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

B857c Brilhante, Anna Julyana Viana Chianca.

Clonagem do gene clockla do peixe-zebra (*Danio rerio*) em vetor para expressão restrita no músculo esquelético / Anna Julyana Viana Chianca Brilhante. - João Pessoa, 2018.

50 f. : il.

Orientação: Ian Porto Gurgel do Amaral.

Coorientação: Jucilene Pereira de Sousa.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Relógio molecular. 2. Transgênese animal. 3. Fotoperíodo. I. Amaral, Ian Porto Gurgel do. II. Sousa, Jucilene Pereira de. III. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)  
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB  
Coordenação do Curso de Bacharelado em  
Biotecnologia



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

Aos trinta e um dias do mês de outubro de 2018, às 14:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral e composta pelos avaliadores: 1. Profa. Dra. Juliana Franco Almeida (CBIOTEC/UFPB); 2. Márcia Dantas dos Santos (PMPGCF/CBIOTEC), a discente Anna Julyanna Viana Chianca Brilhante, matrícula 11402055, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“Clonagem do gene clock circadian regulator a (clock1a) do peixe-zebra (*Danio rerio*) em vetor para expressão restrita no músculo esquelético”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Ian Porto Gurgel do Amaral, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

Ian Porto Gurgel do Amaral  
Presidente da Banca Examinadora

Juliana Franco Almeida  
Avaliador 1

Anna Julyanna Viana Chianca Brilhante  
Discente

Márcia Dantas dos Santos  
Avaliador 2

João Pessoa/PB, 31 de outubro de 2018.

*A todos que lutaram ou lutam a favor  
da ciência e da educação no Brasil.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois, mesmo não compreendendo toda sua grandeza e existência, sei que está sempre ao meu lado. Sem a sabedoria divina, a beleza da vida e da ciência não seria possível!

À minha família, agradeço pelo suporte e pelos momentos de alegria. Tudo que já conquistei devo ao esforço dos meus pais e demais familiares!

Aos meus amigos, agradeço pela companhia, pelas risadas e pelos obstáculos superados juntos. Em especial, agradeço à Albanísia, Cely e Mickael, por serem os melhores ouvintes e parceiros. À Teresa, Camila, Aline, Tarcísio e Filipi, agradeço pela gentileza e por terem tornado o dia a dia e as aventuras acadêmicas pelo Brasil mais leves e marcantes.

Também agradeço à minha turma original pela companhia diária e pela oportunidade de amadurecermos juntos. Especialmente, agradeço à Vivi e Tayla por formarem junto a mim e à Alba o melhor quarteto jogador de boliche que a Biotec já teve! Agradeço também a Bárbara, Fernanda, Jardson, Letícia, Rayssa, Mona e Lu pelos laços de amizade construídos!

Aos alunos e professores que contribuíram com a Maximize – Soluções em Biotecnologia e com o Polo UFPB da LiNAbiotec, agradeço por acreditarem nesses sonhos junto comigo. Foram grandes experiências, sou grata por cada superação e conquista!

Agradeço a todos que compartilharam momentos de aprendizado, diversão e muita ciência no Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos! Elizanete, Lucas, Cayro e Rafa, os dias de lab não seriam os mesmos sem vocês!

À Jucilene e Marcinha, agradeço de coração por tudo que já fizeram por mim como amigas, companheiras de lab e, agora, como co-orientadora e avaliadora, respectivamente. Muito obrigada por aceitarem os convites! Apesar da distância, sei que sempre poderei contar com vocês!

Agradeço ao professor Ian pelo compromisso com a educação e por compartilhar sua paixão pela ciência! Agradeço também por ter aceitado essa orientação, pela paciência e pela disposição. À professora Juliana, agradeço por aceitar o convite e pela disposição e simpatia com as quais sempre atende a seus alunos. Com certeza são grandes exemplos de cientistas, de professores e de pessoas!

Agradeço também a todos os funcionários e demais professores do CBiotec, especialmente às professoras Sildivane, Andrea, Adna e Flávia pela atenção e pelo carinho!

À UFPB, à Capes e ao CNPq, agradeço por todo suporte!

*“Olha  
Que a mágica se espalha  
Que a vida anda cheia  
De tantas coisas extraordinárias  
Quem olha bem repara  
E aprende a contemplar”*

*5 a seco (Leo Bianchini/Vinicius Calderoni)*

## RESUMO

Os genes *clock1a* e *bmall1a* participam da alça ativadora do mecanismo do relógio molecular, a via que regula os ritmos circadianos nos seres vivos. O fotoperíodo diário (ciclo claro-escuro) é o principal sincronizador desses ritmos e, ao interagir com o relógio molecular, pode interferir no metabolismo dos organismos. Pesquisas evidenciam a influência do fotoperíodo na fisiologia e no crescimento do músculo esquelético em embriões e peixes adultos. Por exemplo, o cultivo de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) num fotoperíodo de 24h de claro resultou em animais com maior taxa de crescimento quando comparados a peixes mantidos num regime de 12h de claro e 12h de escuro. Apesar da importância desta via de regulação, o setor da piscicultura carece de projetos científicos nas áreas de conhecimento básico como vias moleculares que regulam o crescimento. A obtenção de uma linhagem com expressão constitutiva do *clock1a* no músculo esquelético do peixe-zebra (*Danio rerio*) pode trazer mais informações acerca da importância deste mecanismo para a fisiologia desse órgão. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi construir um plasmídeo de expressão restrita e constitutiva do *clock1a* no músculo esquelético do peixe-zebra. Para isso decidiu-se aproveitar o constructo obtido por Sousa (2016) e colaboradores (tol2-cmcl2-GFP-mylz2-bmall1a-tol2), aqui denominado p.Bmal, projetado para expressar o gene *bmall1a* constitutivamente no músculo esquelético utilizando o promotor da cadeia leve da miosina (*mylz2*). Dessa forma, a expressão circadiana do gene é modificada para uma expressão constante e independente do ciclo claro:escuro. Como a marcação de transgenia da linhagem transgênica para o *bmall1a* ocorre pela expressão da proteína verde fluorescente (GFP) no coração do animal, um diferente tipo de marcação para identificar a futura linhagem transgênica para o *clock1a* deveria ser utilizado. Assim, optou-se por construir o plasmídeo tol2-mylz2-GFP-mylz2-clock1a-tol2, em que o *mylz2* dirige a expressão da GFP para marcação da transgenia por fluorescência verde no músculo esquelético. A sequência do gene *clock1a*, sintetizada em laboratório e clonado em um plasmídeo comercial, foi sub-clonada no plasmídeo p.Bmal, substituindo a sequência do gene *bmall1a*. O próximo passo para a construção do plasmídeo final seria amplificar toda extensão do produto obtido (tol2-cmcl2-GFP-mylz2-clock1a-tol2), denominado p.Clock, exceto a região codificadora do promotor da cadeia leve da miosina cardíaca (*cmcl2*), e posteriormente ligar a sequência clonada do *mylz2*. A primeira estratégia para amplificar essa região não funcionou, por isso, *primers* menores e mais específicos foram desenhados, mas os resultados esperados também não foram obtidos. Uma terceira estratégia foi otimizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) combinando-se diferentes concentrações do cofator MgCl<sub>2</sub> e diferentes temperaturas de anelamento. Novamente não houve amplificação dos produtos previstos. Portanto, neste trabalho foi obtido o plasmídeo p.Clock#15, que possui o gene *clock1a* dirigido pelo promotor da miosina leve do músculo esquelético como gene de interesse e a proteína verde fluorescente com o promotor da miosina cardíaca como proteína de marcação de transgenia (p-tol2-mylz2-GFP-mylz2-Clock1a-tol2). A obtenção do plasmídeo contendo a proteína verde fluorescente com o promotor da cadeia leve da miosina esquelética não foi possível. Portanto, outras metodologias devem ser testadas.

Palavras-chave: Relógio molecular. Transgênese animal. Fotoperíodo.

## ABSTRACT

*Clock1a* and *bmall1a* genes participate in the activating loop of the molecular clock mechanism, the pathway that regulates circadian rhythms in living beings. The daily photoperiod (light-dark cycle) is the main synchronizer of these rhythms and, when interacting with the molecular clock, can interfere in the metabolism of organisms. Researches show the influence of photoperiod on the physiology and growth of the skeletal muscle of fish embryos and adult fish. For example, production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in a 24-h light photoperiod resulted in animals with a higher growth rate when compared to fish kept at 12h light and 12h dark. Despite the importance of this regulatory route, the pisciculture sector lacks scientific projects in basic knowledge as molecular pathways that regulate growth. Obtaining a lineage with constitutive *clock1a* expression in zebrafish (*Danio rerio*) skeletal muscle may provide more information about the importance of this mechanism for the physiology of this organ. Therefore, the objective of this work was to construct a plasmid for restricted expression of *clock1a* in zebrafish skeletal muscle. For this purpose, it was decided to take advantage of the construct obtained by Sousa (2016) and coworkers (tol2-cmcl2-GFP-mylz2-bmall1a-tol2), here denominated p.Bmal, designed to express the *bmall1a* gene constitutively in skeletal muscle using the myosin light chain promoter (*mylz2*). In this way, the circadian expression of the gene is modified to a constant expression and independent of the light:dark cycle. Since transgenic marking of the transgenic lineage to *bmall1a* occurs by expression of the green fluorescent protein (GFP) in the animal's heart, a different type of labeling to identify the future transgenic lineage for the *clock1a* should be used. Thus, it was chosen to construct the plasmid tol2-mylz2-GFP-mylz2-clock1a-tol2, where *mylz2* directs the expression of *GFP* to label the transgene by green fluorescence in skeletal muscle. The *clock1a* gene sequence - synthesized *in vitro* and cloned into a commercial plasmid - was subcloned into the plasmid pBmal, substituting the *bmall1a* gene sequence. The next step in the construction of the final plasmid would be to amplify the extension of the obtained product (tol2-cmcl2-GFP-mylz2-clock1a-tol2), called p.Clock, except the coding region of the cardiac myosin light chain promoter (*cmcl2*), and then ligating the cloned *mylz2* sequence. The first strategy to amplify this region did not work, so smaller and more specific primers were designed, but the expected results were not obtained either. A third strategy was to optimize the polymerase chain reaction (PCR) by combining different concentrations of the MgCl<sub>2</sub> cofactor and different annealing temperatures. Again, there was no amplification of the expected products. Therefore, in this work the p.Clock#15 plasmid was obtained, which has the *clock1a* gene driven by the myosin light promoter of skeletal muscle as the gene of interest and the fluorescent green protein with promoter of myosin as a transgenic labeling protein (p-tol2-mylz2-GFP-mylz2-Clock1a-tol2). Obtaining the plasmid containing the fluorescent green protein with the skeletal myosin light chain promoter was not possible. Therefore, other methodologies should be tested.

Keywords: Molecular clock. Animal transgenesis. Photoperiod.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Representações conceituais da estrutura do relógio biológico .....	16
<b>Figura 2</b> - Mecanismo do relógio molecular no peixe-zebra.....	20
<b>Figura 3</b> - Embriões e peixe-zebra adulto.....	22
<b>Figura 4</b> - Transgênese utilizando o sistema do transposon Tol2 .....	26
<b>Figura 5</b> - Construção do plasmídeo p-tol2-mylz2-GFP-mylz2-clock1a-tol2 .....	29
<b>Figura 6</b> - Configuração das reações de otimização da PCR de acordo com o primer de teste	33
<b>Figura 7</b> - Plasmídeos pDsRED-Express-DR e pDestTol2CG2 .....	35
<b>Figura 8</b> - Análise de restrição e PCR com os primers pVector01 F/R e pVector02 F/R.....	36
<b>Figura 9</b> - PCR com pVector01.curto F/R e pVector02.curto F/R.....	37
<b>Figura 10</b> - Otimização da PCR com os primers pVector01.curto F/R e pVector02.curto F/R	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Componentes moleculares do relógio circadiano em grupos animais .....	18
<b>Tabela 2</b> - Protocolos das reações de restrição do p.Clock#15 com as enzimas NotI e KpnI...	31
<b>Tabela 3</b> - Primers utilizados nas reações de PCR convencional .....	32
<b>Tabela 4</b> - Composição da reação de PCR convencional .....	32

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Ritmos Circadianos e Relógio Biológico .....</b>	<b>14</b>
2.1.1 Relógio biológico: organização e sincronização .....	14
2.1.2 Mecanismo do relógio molecular .....	17
<b>2.2 Fotoperíodo, Crescimento Somático de Peixes e Relógio Molecular .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Peixe-Zebra Transgênico como Modelo Biológico .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Construção de Plasmídeos e o Sistema Transposon <i>Tol2</i> .....</b>	<b>24</b>
2.4.1 O sistema transposon <i>Tol2</i> .....	25
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>27</b>
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos .....	27
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>28</b>
4.1 Sub-clonagem do Gene <i>clock1a</i> .....	29
4.2 Análises de Restrição.....	30
4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
4.3.1 Otimização da PCR .....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>
<b>GLOSSÁRIO .....</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em 2017, o Nobel de Medicina e Fisiologia foi concedido aos americanos Jeffrey Hall, Michael Rosbash e Michael Young por suas descobertas sobre a maquinaria molecular que regula o relógio biológico. O prêmio conferiu visibilidade à importância dos ritmos circadianos (que duram cerca de um dia) para o metabolismo e comportamento dos seres vivos. De fato, o padrão de atividades biológicas é influenciado pelo relógio molecular, o qual é sincronizado por fatores ambientais essenciais à sobrevivência dos organismos, como luz e temperatura.

Nesse contexto, estudos relatam os efeitos da variação do fotoperíodo na taxa de crescimento somático dos peixes, fenômeno importante para o setor da piscicultura. Embora alguns trabalhos caracterizem a relação entre o fotoperíodo, o mecanismo do relógio molecular e o crescimento do músculo esquelético, pouco se sabe sobre a importância desta via para a fisiologia do crescimento muscular nos peixes. Através de linhagens de peixes transgênicos é possível investigar a influência do distúrbio desse mecanismo na transcrição de genes e a eventual modificação do crescimento e das características do músculo esquelético.

Dentre os genes envolvidos na maquinaria do relógio molecular estão *clock1a* (*clock circadian regulator 1 a*) e *bmal1a* (*aryl hydro-carbon receptor nuclear translocator-like 1 a*), que desempenham um papel importante na alça positiva desse mecanismo. A obtenção de uma linhagem transgênica para o gene *clock1a* permitirá colher informações sobre essa via de sinalização. Para isso, é necessária a produção de um vetor de expressão. Assim, o objetivo deste trabalho foi a construção de um plasmídeo para expressão restrita e constitutiva do *clock1a* no músculo esquelético do peixe-zebra.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Ritmos Circadianos e Relógio Biológico

Fenômenos físicos, biológicos e comportamentais apresentam padrões rítmicos ao longo do dia (circadianos) e do ano (circanuais) (HUT et al., 2013). O astrônomo Jean-Jacques d'Ortous de Mairan foi um dos primeiros a relatar a interação entre esses fenômenos. Em 1729, Jean-Jacques percebeu que plantas heliotrópicas, em condições de constante ausência de luz, mantinham o mesmo padrão de movimento das folhas observado sob o fotoperíodo normal ao longo de um dia (KUHLMAN; CRAIG; DUFFY, 2017). Os indícios desse e de outros estudos (BUIJS; KALSBECK, 2001), colaboraram com a ideia de que os seres vivos geram esses ritmos endogenamente, a partir de um relógio biológico intrínseco, com periodicidade em torno de 24 horas.

A principal função desse mecanismo é sincronizar o comportamento, a fisiologia e o metabolismo do organismo com fenômenos ambientais essenciais à sobrevivência. Desse modo, o indivíduo pode antecipar-se a essas circunstâncias e executar as ações necessárias (BUTTGEREIT et al., 2015; GARDNER et al., 2006). Por exemplo, experimentos com tuco-tucos (*Ctenomys aff. knighti*), roedores subterrâneos de hábito naturalmente diurno, demonstraram mudança de hábitos de acordo com a demanda energética e termorreguladora em condições ambientais distintas – em campo e no laboratório (FLÔRES et al., 2016; TACHINARDI et al., 2015, 2017).

Sabe-se que o sistema circadiano é naturalmente orquestrado e envolve, além da interação com fatores externos abióticos, o encadeamento de vias moleculares e metabólicas. Os princípios e mecanismos desse sistema são abordados nos subtópicos a seguir.

#### 2.1.1 Relógio biológico: organização e sincronização

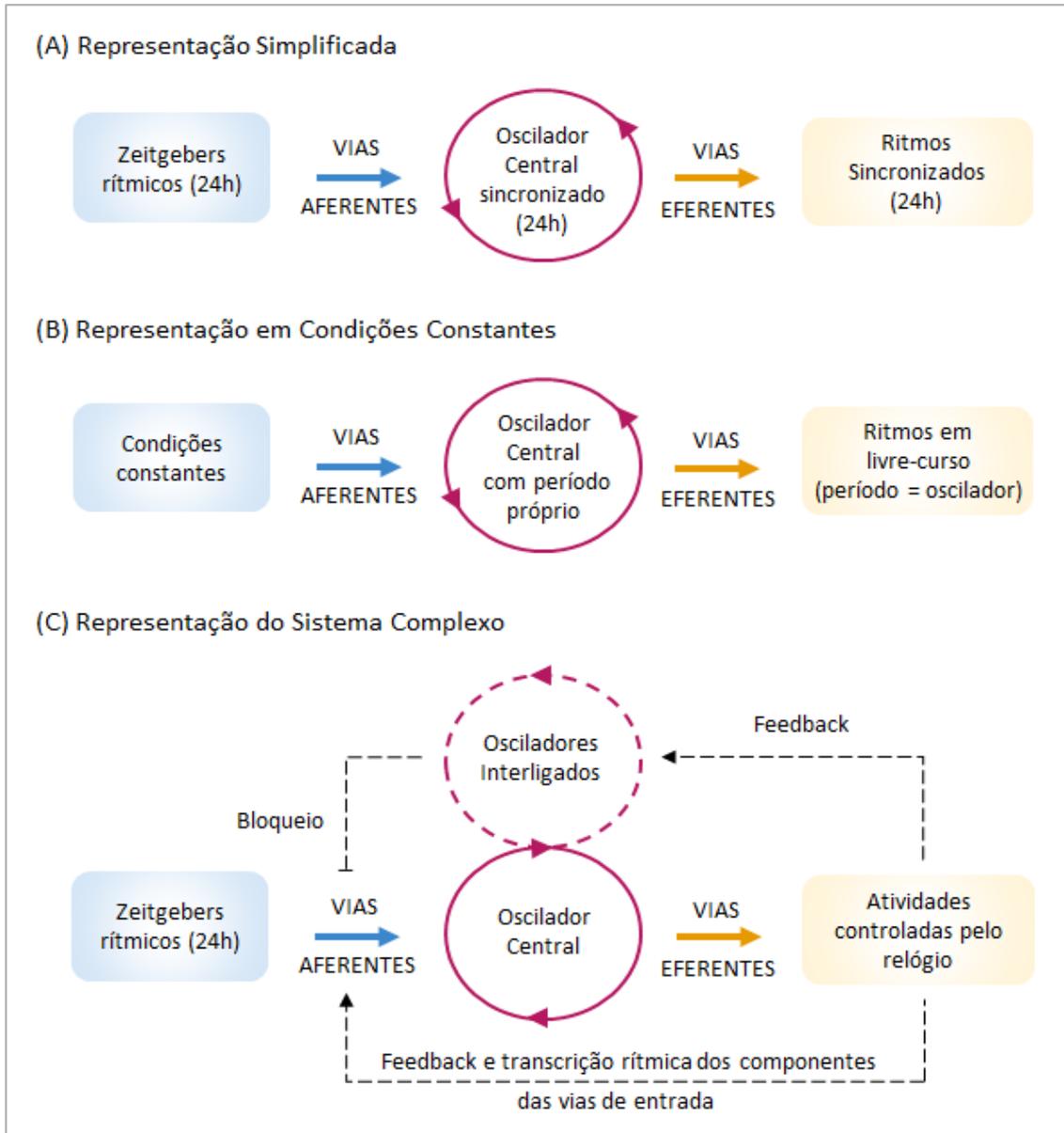
Apesar do relógio biológico estar presente em organismos do reino Monera ao Animalia, suas unidades reguladoras evoluíram de maneira independente, sendo bastante específicas para cada grupo de seres vivos. Entretanto, a maneira como esses elementos estão organizados apresentam convergências (GARDNER et al., 2006). Por esse motivo, é possível estruturar o relógio biológico, conceitualmente, em três partes básicas (figura 1A): vias de entrada

(aférentes), marca-passo (relógio ou oscilador central) e vias de saída (eferentes) (CECON; FLÔRES, 2010; GARDNER et al., 2006; KUHLMAN; CRAIG; DUFFY, 2017).

Fatores externos ao organismo, como luz e temperatura, conhecidos como *zeitgebers* (ou *time-givers*), são percebidos e transmitidos pelas vias aferentes. O marca-passo recebe os sinais captados e sincroniza-se com as condições ambientais ao longo das 24 horas do dia - processo denominado arrastamento (do Inglês, *entrainment*). Através das vias eferentes, o marca-passo retransmite os sinais obtidos, determinando a ritmicidade das atividades fisiológicas e comportamentais sob seu controle (DUNLAP, 1999; DUNLAP; LOROS, 2004). Em condições ambientais constantes (figura 1B), o relógio passa a funcionar em um período de tempo próprio - geralmente superior a 24h - e os processos regulados por ele assumem o estado de livre-curso (CECON; FLÔRES, 2010). Essa representação linear, em que sinais aferentes sincronizam um oscilador central promotor de ritmicidade, é uma simplificação do relógio circadiano. O sistema é mais complexo, pois consiste em múltiplos osciladores interligados e possui vias de retroalimentação (*feedback*) (figura 1C). Esse *feedback* é gerado pelas atividades controladas pelo relógio, que podem regular, positiva ou negativamente, o funcionamento do oscilador ou também originar componentes que participam da via de entrada do sistema (GARDNER et al., 2006; KUHLMAN; CRAIG; DUFFY, 2017).

De modo geral, os diversos osciladores interagem hierarquicamente, uma vez que o marca-passo central coordena a sincronização de osciladores periféricos. Esse marca-passo central localiza-se em órgãos como o Núcleo Supraquiasmático (NSQ), no hipotálamo dos mamíferos, a retina, em alguns moluscos marinhos, e os lóbulos ópticos, em *Drosophila*, baratas e grilos. No entanto, questiona-se o controle soberano do marca-passo central em alguns organismos, visto que determinados osciladores exibiram independência e autonomia na ausência desse controle (VANSTEENSEL; MICHEL; MEIJER, 2008). Em pássaros, por exemplo, há o acoplamento de osciladores situados no NSQ, na glândula pineal e na retina, no entanto, a glândula pineal pode funcionar de maneira independente via um relógio endógeno próprio. Essa independência da glândula pineal, também, foi identificada em peixes (BEN-MOSHE LIVNE et al., 2016).

**Figura 1** - Representações conceituais da estrutura do relógio biológico



Fonte: adaptado de Cecon et al. (2010); Gardner et al. (2006) e Kuhlman et al. (2017).

(A) Representação linear: sinais aferentes sincronizam um oscilador central promotor de ritmicidade. (B) Em condições ambientais constantes, o relógio funciona em um período de tempo próprio - geralmente superior a 24h - e os processos regulados por ele assumem o estado de livre-curso. (C) Sistema complexo: múltiplos osciladores interligados sob efeito de vias de *feedback* gerado pelas atividades controladas pelo relógio.

Fatores não-fóticos, como ciclo de sono, atividade física, tempo social, alimentação e temperatura são também *zeitgebers*, entretanto, o fotoperíodo diário (ciclo claro-escuro) é o sincronizador mais importante (PESCHEL; HELFRICH-FÖRSTER, 2011). Nos mamíferos, a luz é captada por fotopigmentos presentes em células ganglionares na retina (ipRGCs, *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*). Através do trato retino-hipotalâmico, o sinal é transmitido para o NSQ, que ativa a glândula pineal. Nessa glândula, é produzida a melatonina, molécula fundamental para os processos de fototransdução e sincronização (REITER; TAN;

GALANO, 2014). Por outro lado, Moore e Whitmore (2014) sugerem a existência de distintos osciladores e regiões responsivas à luz no cérebro de peixe-zebra adulto, incluindo-se a glândula pineal. Há, ainda, evidências de que tecidos periféricos do peixe-zebra são sensíveis à luz e respondem diretamente ao fotoperíodo (CAHILL, 2002; GIEBULTOWICZ et al., 2000; TAMAI et al., 2003; WEGER et al., 2011; WHITMORE et al., 1998). Assim, no peixe-zebra, provavelmente não há um oscilador central como nos mamíferos, uma vez que a glândula pineal e osciladores periféricos possuem regulação autônoma.

### 2.1.2 Mecanismo do relógio molecular

Nos eucariotos, o cerne da maquinaria do relógio molecular é composto por uma rede de genes e suas respectivas proteínas organizados em três alças de retroalimentação: uma positiva, uma negativa e uma acessória. Esses elementos geram ritmos circadianos nas células através de processos de transcrição e tradução. Além disso, moléculas fotorreceptoras e fatores de regulação pós-tradução - como fosforilação e acetilação - também compõe a maquinaria molecular do relógio (KUHLMAN; CRAIG; DUFFY, 2017; KUMAR; SHARMA, 2018; VANSTEENSEL; MICHEL; MEIJER, 2008).

Em peixes, aves e mamíferos, os genes *clock* e *bmal* codificam proteínas que formam o heterodímero CLOCK:BMAL no citoplasma da célula. Ao migrar para o núcleo, CLOCK:BMAL liga-se à elementos E-box, em regiões promotoras, ativando a transcrição dos genes *per* (*period*) e *cry* (*cryptochrome*) e de outros genes controlados pelo relógio (CCGs, do inglês “*clock-controlled genes*”). Esses processos caracterizam a alça positiva do mecanismo. As proteínas PER e CRY, por sua vez, atuam na alça negativa: em altas concentrações, formam um heterodímero que inibe a atividade de CLOCK:BMAL no núcleo da célula (KUMAR; SHARMA, 2018; VATINE et al., 2011). No citoplasma, proteínas cinases sob controle do relógio, como a caseína cinase 1 (CK1), fosforilam moléculas remanescentes de PER e CRY, promovendo degradação via ubiquitina-ligase/proteassoma (KUMAR; SHARMA, 2018; MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012). A auto-repressão e a degradação das proteínas PER e CRY diminuem a inibição dos efetores positivos, permitindo que o ciclo reinicie.

Nos vertebrados, a alça acessória envolve dois receptores nucleares que também são expressos de maneira circadiana: as proteínas REV-ERBa (*reverse transcript of erythroblastosis α*) e RORα (*retinoid-related orphan receptor α*) (CRUMBLEY; BURRIS, 2011). Paralelamente à ação das alças positiva e negativa, CLOCK:BMAL ativa a transcrição dos genes *rev-erba* e

*rora*, enquanto PER e CRY a inibem. As proteínas REV-ERBa e RORa competem pela ligação ao elemento responsivo RORE (*Retinoic Acid-Related Orphan Receptor Response Element, RRE*) na região promotora do gene *bmal*. Enquanto REV-ERBa tem ação repressora, RORa atua ativando a transcrição do *bmal*. Aparentemente, esse mecanismo é necessário para a manutenção da expressão circadiana de BMAL e a estabilidade dos ritmos circadianos (REPPERT; WEAVER, 2002; VANSTEENSEL; MICHEL; MEIJER, 2008; VATINE et al., 2011). O efeito dessa alça na regulação do *clock* e seu homólogo em mamíferos (*npas2, neuronal PAS domain protein 2*) foi demonstrada em alguns estudos, mas ainda é pouco elucidada (CRUMBLEY et al., 2010; CRUMBLEY; BURRIS, 2011). Na tabela 1, são exibidos os principais componentes moleculares do relógio circadiano nos grupos animais citados.

**Tabela 1** - Componentes moleculares do relógio circadiano em grupos animais

Animais	Alças principais		Alça acessória	Fotorrecepção	Cinases
	Positiva	Negativa			
<b>Insetos</b> ( <i>Drosophila</i> )	CYC, CLOCK	PER, TIM	<b>VRI</b> (inibe CLOCK) <b>PDP1e</b> (ativa CLOCK) <b>CWO</b> (inibe ativação de transcrição por CLOCK-CYC através de competição pela ligação ao E-box)	CRY (degrada TIM)	CK2
<b>Peixes</b> ( <i>Danio rerio</i> )	CLOCK1a, CLOCK1b, CLOCK2, BMAL1a, BMAL1b, BMAL2	CRY1aa, CRY1ab, CRY1ba, CRY1bb, PER1a, PER1b, PER2, PER3	<b>REVERBa</b> (inibe BMAL1) <b>RORa</b> (ativa BMAL1) <b>DBP, TEF, HLF, E4BP4/NFIL3</b> (regulam a expressão de <i>cry1aa</i> e <i>per2</i> )	Melanopsinas, TMT, VA e FAD-oxidases, CRY3	CK1d/e
<b>Aves</b>	CLOCK, BMAL1, BMAL2	CRY1, CRY2, PER2, PER3		Fotorreceptores na glândula pineal, retina e hipotálamo via melanopsina em ipRGCs na retina	CK1d/e
<b>Mamíferos</b>	CLOCK (/NPAS2), BMAL1	CRY1, CRY2, CRY3, PER2, PER2, PER3	<b>REVERBa</b> (inibe BMAL1) <b>RORa</b> (ativa BMAL1)		CK1d/e

Fonte: adaptado de Kumar (2018).

CYC (*cycle*); VRI (*vrille*); PDP1 (*par domain protein 1 epsilon*); CWO (*transcription factor cwo*); DBP (*D-box binding protein*), TEF (*thyrotroph embryonic factor*), HLF (*hepatic leukaemia factor*); E4BP4 (*E4 binding protein 4* - também conhecido como *nuclear factor interleukin-3, NFIL3*); TMT (*Teleost Multiple Tissue opsin*); VA (*Vertebrate Ancient opsin*); FAD-oxidases (*flavin-containing oxidadases*); CK2 (*casein kinase 2*); CK1e/d (*casein kinase 1 epsilon/delta*); ipRGCs (*intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*).

Devido a processos de duplicação do genoma ao longo da evolução dos vertebrados, várias cópias de genes do relógio são encontradas. Alguns desses genes duplicados, denominados parálogos, assumem novas funções ou compartilham aspectos diferentes de uma mesma função (AMARAL, 2011). O genoma do ancestral comum dos peixes teleósteos passou por três processos de duplicação há cerca de 320-400 milhões de anos. O peixe-zebra preservou desse

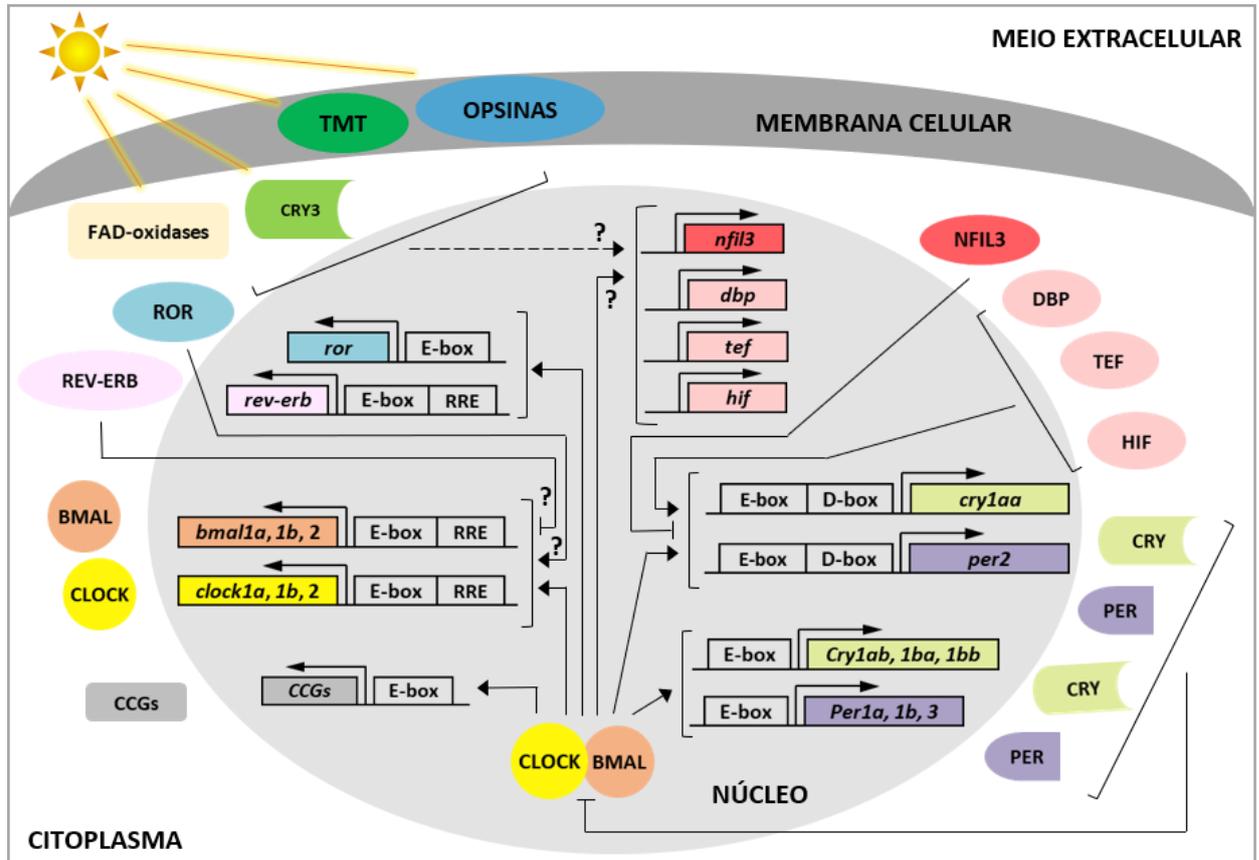
ancestral três cópias do *clock* (*clock1a/clock1b/clock2*) e do *bmal* (*bmal1a, bmal1b e bmal2*), seis cópias do *cry* (*cry1aa, cry1ab, cry1ba, cry1bb, cry2 e cry3*), quatro cópias do *per* (*per1a, per1b, per2 e per3*) e apenas uma do *tim* (*tima*) (LIU et al., 2015; TOLOZA-VILLALOBOS; ARROYO; OPAZO, 2014; VATINE et al., 2011, KUMAR, 2017).

Na *Drosophila*, a proteína CRY é fotossensível. Quando ativada pela luz, interage com a proteína TIMELESS (TIM), que liga-se à PER para atuar como um repressor do heterodímero positivo CLOCK:CYC (CHAVES, 2011; LIU et al., 2015; VATINE et al., 2011; KUMAR, 2018). O papel da proteína TIM em outros organismos é menos compreendido (CRAIG, 2018). No peixe-zebra, pode não estar envolvida com o mecanismo do relógio molecular (KANEKO; HERNANDEZ-BORSETTI; CAHILL, 2006). Por outro lado, foi evidenciado no peixe-zebra que a isoforma CRY3 (também encontrada com a denominação CRY4), (CAVALLARI et al., 2011; VATINE et al., 2011), assemelha-se à proteína CRY da *Drosophila* e, assim como outras moléculas fotorreceptoras - melanopsinas, TMT (*Teleost Multiple Tissue opsin*), VA (*Vertebrate Ancient opsin*) e FAD-oxidases (*flavin-containing oxidases*) – está envolvida com a sensibilidade fótica dos tecidos periféricos do peixe-zebra (RAMOS et al., 2014).

Pesquisas sugerem que a expressão de determinadas proteínas é ativada por CLOCK:BMAL e também desencadeada pelo sinal fótico captado por essas moléculas fotorreceptoras (PAGANO et al., 2017; ZHONG et al., 2017). Essas proteínas são os fatores de transcrição DBP (*D-box binding protein*), TEF (*thyrotroph embryonic factor*), HLF (*hepatic leukaemia factor*) e E4BP4 (*E4 binding protein 4* - também conhecido como *nuclear factor interleukin-3, NFIL3*), que ligam-se a elementos D-box na região promotora dos genes *cry1aa* e *per2*, promovendo ou inibindo a transcrição. Esse mecanismo funciona como uma alça acessória e constitui uma via pela qual a luz regula diretamente a alça negativa do relógio.

Além desses fatores, outros genes que são responsivos à luz ou controlados pelo relógio estão sendo descritos (GAVRIOUCHKINA et al., 2010; PAGANO et al., 2017; TAMAI; YOUNG; WHITMORE, 2007; WEGER et al., 2011). No entanto, os mecanismos dessa sinalização fótica ainda não foram totalmente elucidados. Na figura 2, há uma representação do mecanismo do relógio molecular do peixe-zebra.

**Figura 2** - Mecanismo do relógio molecular no peixe-zebra



Fonte: adaptado de Zhong et al. (2017) e Vatine et al. (2011).

No núcleo da célula, o heterodímero CLOCK:BMAL liga-se à elementos E-box e ativam a transcrição dos genes *per* e *cry*. As proteínas PER e CRY, por sua vez, inibem a atividade de CLOCK:BMAL. Os genes *rev-erb*, *ror*, *nfil3*, *dbp*, *tef*, *hif* e outros CCGs também são ativados por CLOCK:BMAL. As proteínas ROR e REV-ERB ligam-se à região RRE, ativando ou inibindo a atividade do *bmal*, respectivamente. O efeito dessa alça na regulação do *clock* ainda é pouco elucidado. Interessantemente, moléculas fotorreceptoras (FAD-oxidases, CRY3, TMT e outras opsinas) desencadeiam a expressão de fatores de transcrição (NFIL3, DBP, TEF e HIF) que regulam a expressão de *cry1aa* e *per2* através da ligação à elementos D-box. Devido a processos de duplicação do genoma do peixe-zebra, são encontradas várias cópias de genes do relógio (separadas por vírgula). As setas indicam regulação positiva. Os traços representam regulação negativa. As interrogações assinalam mecanismos pouco elucidados.

## 2.2 Fotoperíodo, Crescimento Somático de Peixes e Relógio Molecular

O músculo é um importante órgão metabólico (MAYEUF-LOUCHART; STAELS; DUEZ, 2015) e, nos peixes teleósteos, como o peixe-zebra e o Salmão do Atlântico (*Salmo salar*), corresponde a 60% da massa corporal (JOHNSTON; BOWER; MACQUEEN, 2011). Pesquisas evidenciam a influência do fotoperíodo na fisiologia e no crescimento desse tecido em embriões e peixes adultos, fenômeno importante para o setor da piscicultura (BISWAS; ENDO; TAKEUCHI, 2002; BISWAS; TAKEUCHI, 2002; JOHNSTON, 2003). O cultivo de salmão do Atlântico num fotoperíodo de 24h de claro, por exemplo, resultou em animais com maior taxa de crescimento quando comparados a peixes mantidos num regime de 12h de claro e 12h de escuro.

Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), um peixe importante para a aquicultura em águas tropicais e o principal peixe da aquicultura da região Nordeste, também mostrou taxas de crescimento maiores quando cultivados em 18h de claro e 6h de escuro quando comparados ao regime de 12:12h de claro e escuro (EL-SAYED; KAWANNA, 2008). O cultivo do tambaqui (*Colossoma macropomum*), outro peixe de importância comercial, em diferentes fotoperíodos também revelou condições de maior exposição à luz melhoraram a taxa de crescimento sem modificar a eficiência proteica (MENDONÇA et al., 2012).

Andrews e colaboradores (2010) demonstraram a importância do mecanismo do relógio molecular e dos CCGs na homeostase de músculo esquelético de camundongos. Neste artigo, *myoD* (um fator de regulação miogênica envolvido no processo de desenvolvimento e crescimento muscular) e *pgc1 $\beta$*  (envolvido na homeostase mitocondrial) foram descritos como CCGs, e o distúrbio do mecanismo do relógio molecular causou redução da densidade de mitocôndrias no músculo e redução na força de contração, com implicações no crescimento muscular. Outros estudos também relatam que a interferência na alça positiva do relógio molecular promove alterações na fisiologia e no metabolismo do músculo esquelético (CHATTERJEE et al., 2013; CHATTERJEE; MA, 2016). Amaral e Johnston (2011), por sua vez, investigaram o perfil de transcrição de 17 genes do relógio molecular no músculo esquelético do peixe-zebra e relataram que pelo menos quatro genes de importância para o crescimento muscular podem ser classificados como CCGs: *myf6* (*myogenic factor 6*), *igfbp3* (*insulin-like growth factor binding protein 3*), *igfbp5b* (*insulin-like growth factor binding protein 5*) e *hsf2* (*heat shock transcription factor 2*). Essa expressão circadiana de genes relacionados ao crescimento muscular pode representar uma importante ligação entre o mecanismo do relógio molecular e o crescimento do músculo esquelético. Entretanto, ainda há pouco conhecimento sobre a importância dessa via para a fisiologia do crescimento muscular em peixes.

Sabe-se que, no peixe-zebra, os genes *clock1a* e *bmall1a* possuem um padrão de expressão oscilatório, com baixo nível de expressão na fase clara e pico de expressão na fase escura do fotoperíodo (AMARAL; JOHNSTON, 2012). Através de linhagens de peixes transgênicos para esses genes, é possível investigar a influência do distúrbio desse mecanismo na transcrição e a eventual modificação do crescimento e das características do músculo esquelético.

### 2.3 Peixe-Zebra Transgênico Como Modelo Biológico

O *Danio rerio* (figura 3C) é conhecido popularmente como peixe-zebra ou paulistinha. Na comunidade científica, *zebrafish* é o termo mais utilizado. Essa denominação justifica-se pelas listras horizontais que contrastam tons de preto e branco no animal. Tem origem na Ásia Central, sendo encontrado principalmente na Índia, e caracteriza-se como um peixe tropical de água doce. É um animal vertebrado, pertencente ao grupo dos peixes teleósteos, isto é, com esqueleto ósseo (ENGESZER et al., 2007). A primeira pesquisa a utilizar o peixe-zebra como modelo animal foi publicada em 1955, no entanto, em alguns países seu uso se expandiu apenas a partir do final da década de 1980. No Brasil, essa expansão ocorreu na segunda metade da década de 1990 (GHENO et al., 2016).

A adesão do peixe-zebra como organismo modelo deve-se à grande quantidade de informação sobre a espécie e às diversas vantagens proporcionadas, como redução de custos, facilidade de produção e manuseio e vasta aplicabilidade. Uma de suas características mais importantes é a reprodução: o peixe-zebra atinge a maturidade sexual entre 10 e 12 semanas de vida, se reproduz em qualquer período do ano (SPENCE et al., 2008), apresenta alta taxa de fecundidade e produz uma prole grande, podendo gerar centenas de ovos em uma noite (BEN-MOSHE; FOULKES; GOTHILF, 2014). Além disso, é um peixe de pequeno porte (3 a 5 cm), o que simplifica sua manipulação e manutenção (LELE; KRONE, 1996). Os embriões da espécie (figura 3A e B) são transparentes e de rápido desenvolvimento, configurando um excelente modelo para técnicas de embriologia e transgenia (VATINE et al., 2011).

**Figura 3** - Embriões e peixe-zebra adulto



Fonte: adaptado de Holtzman et al. (2016).

(A) Embrião na fase de quatro células, uma hora pós-fertilização (hpf); (B) Embrião com 48 horas de vida apresentando eixo corporal formado e estrutura rudimentar da maioria dos órgãos; (C) Peixe-zebra macho adulto.

O genoma do peixe-zebra já foi sequenciado por completo e possui 70% de similaridade com o genoma humano (HOWE et al., 2013). É formado por 25 cromossomos, 1.412 gigabases e 26.206 genes codificadores de proteínas (RAGHUPATHY; PATNAIK; SHU, 2013). Esse conhecimento sobre o material genético da espécie e o desenvolvimento das técnicas de transgênesis favoreceram o desenvolvimento de inúmeras linhagens transgênicas. Transgênesis é a introdução de um fragmento específico de DNA exógeno no genoma de um organismo de modo que a característica modificada seja transmitida hereditariamente (TONELLI et al., 2017).

Uma das primeiras linhagens de peixe-zebra transgênico foi produzida em 1988, por Stuart e colaboradores, com o objetivo de permitir a seleção dos animais transgênicos a partir da resistência ao antibiótico higromicina (STUART; MCMURRAY; WESTERFIELD, 1988). Uma outra linhagem, a GloFish® foi desenvolvida para indicar poluição, mas, devido à sua característica fluorescente, também passou a ser comercializada para fins ornamentais (GONG et al., 2003). Outras variedades são utilizadas em diversos estudos da área de saúde, como embriogênese e neurociências (GREEN; PLANCHART, 2018; KAWAKAMI, K. et al., 2016), obesidade e diabetes (ZANG; MADDISON; CHEN, 2018), doenças da tireoide (MARELLI; PERSANI, 2017), câncer (IDILLI et al., 2017) e medicina personalizada (BAXENDALE; VAN EEDEN; WILKINSON, 2017).

Pesquisas com o peixe-zebra transgênico para estudo do relógio circadiano também foram impulsionadas nos últimos anos (ZHONG et al., 2017). Aproveitando-se da transparência e do rápido desenvolvimento dos embriões, muitos estudos utilizam proteínas fluorescentes, como GFP e luciferase, para determinar a regulação dos genes do relógio *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*. Por exemplo, pesquisadores induziram a expressão de GFP na glândula pineal de uma linhagem de peixe-zebra e demonstraram que a expressão de *per2* induzida pela luz é essencial para o estabelecimento do padrão rítmico da enzima chave para produção de melatonina nessa glândula, a *aanat2* (*arylalkylamine N-acetyltransferase 2*) (GOTHILF et al., 2002; ZIV et al., 2005).

Estudos com o peixe-zebra têm também impactado a piscicultura. Muitos aspectos importantes para o setor, como bioenergética (CHIZINSKI et al., 2008), comportamento (MILLER; GERLAI, 2007), metabolismo (PLAUT; GORDON, 1994) e crescimento (SICCARDI et al., 2009), têm se mostrado compatíveis com peixes de interesse comercial. Além disso, o peixe-zebra foi identificado como um importante modelo experimental genético para piscicultura (DAHM; GEISLER, 2006). Para potencializar esse setor produtivo, também é importante compreender melhor a influência do ritmo circadiano na fisiologia do músculo esquelético em peixes, visto que ainda há pouco conhecimento sobre o tema (LAZADO et al., 2014).

## 2.4 Construção de Plasmídeos e o Sistema Transposon *Tol2*

Plasmídeos são fragmentos circulares de DNA extracromossomal que realizam replicação autônoma e podem ser encontrados em eucariotos e procariotos (ACTIS; TOLMASKY; CROSA, 1999; ADDGENE, 2017; LEDERBERG, 1952). Nas bactérias, são transferidos através de conjugação e podem transmitir resistência a antibióticos (HELSINKI, 2004). Na década de 1970, fragmentos de DNA que conferiam resistência aos antibióticos canamicina e tetraciclina foram inseridos no genoma de células de *Escherichia coli* a partir de um plasmídeo produzido *in vitro* (COHEN et al., 1973; COHEN; CHANG; HSU, 1972). A construção desse plasmídeo foi possível devido ao desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, promovido pelo isolamento da enzima de restrição EcoRI e da enzima T4 ligase (HELSINKI, 2004). A EcoRI quebra ligações do DNA dupla fita originando extremidades únicas, de modo que todos os fragmentos hidrolisados por essa enzima podem ser novamente conectados (COHEN et al., 1973). A T4 ligase, por sua vez, catalisa a ligação entre fitas clivadas (HELSINKI, 2004). Esses e outros avanços – como a descoberta de novas enzimas - contribuíram para o estabelecimento dos plasmídeos como vetores de clonagem e expressão gênica.

Atualmente, há uma variedade de plasmídeos para as mais diversas finalidades, no entanto, existem elementos estruturais básicos em comum entre eles, descritos a seguir de acordo com Addgene (2017). A origem de replicação (ORI) é essencial para a replicação do plasmídeo em bactérias, pois é a região em que a maquinaria de replicação se conecta e inicia o processo. O Sítio de Múltipla Clonagem (MCS, do Inglês *Multiple Cloning Site*), contém sequências de restrição para diversas enzimas, permitindo a inserção do DNA de interesse. Inseto é o fragmento de DNA inserido no MCS e, usualmente, corresponde ao elemento de interesse à pesquisa. A região promotora é a sequência que irá dirigir e controlar a expressão do inserto, recrutando a maquinaria de transcrição do organismo a ser modificado. Através do promotor, é possível determinar o nível de expressão do inserto, bem como restringir seu local de expressão à tipos celulares ou tecidos específicos. Para permitir a seleção de colônias de bactérias que contêm o plasmídeo um gene de resistência a antibiótico com expressão restrita a células bacterianas é inserido no plasmídeo. Um outro marcador de seleção é utilizado para indicar as células que incorporaram o inserto no genoma e de fato realizam sua expressão. Esse marcador pode ser uma proteína fluorescente ou um gene de resistência a antibiótico dirigido por um promotor não bacteriano. Nos plasmídeos, há, ainda, sítios de ligação a *primers* que indicam o ponto inicial para amplificação ou sequenciamento do plasmídeo.

Durante o processo de construção de um plasmídeo, as enzimas de restrição e a reação em cadeia da polimerase (PCR, do Inglês *Polymerase Chain Reaction*) são utilizadas para obter fragmentos específicos, que serão posteriormente ligados, e para verificar a configuração estrutural do plasmídeo (ADDGENE, 2017). Na PCR, ocorre a amplificação de determinado fragmento por uma DNA polimerase a partir de um par de *primers* (um *forward* e um *reverse*) que são complementares à sequência de interesse (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004; ALMEIDA et al., 2010). A base dessa técnica é a repetição cíclica dos processos de desnaturação da dupla fita de DNA, anelamento dos *primers* e alongamento pela DNA polimerase, produzindo inúmeras cópias do fragmento (GARCIA; MA, 2005). Além da adição dos desoxinucleotídeos (dNTPs) que serão utilizados pela DNA polimerase para extensão da dupla fita, a adição de uma solução tampão e de co-fatores iônicos, como  $MgCl_2$ ,  $MgSO_4$  e  $Mn^{2+}$ , também é necessária para o funcionamento da reação. As condições de temperatura de cada etapa e todos esses elementos citados podem influenciar na eficiência da PCR (CHA; THILLY, 1993), isto é, interferir na quantidade e na qualidade do DNA amplificado.

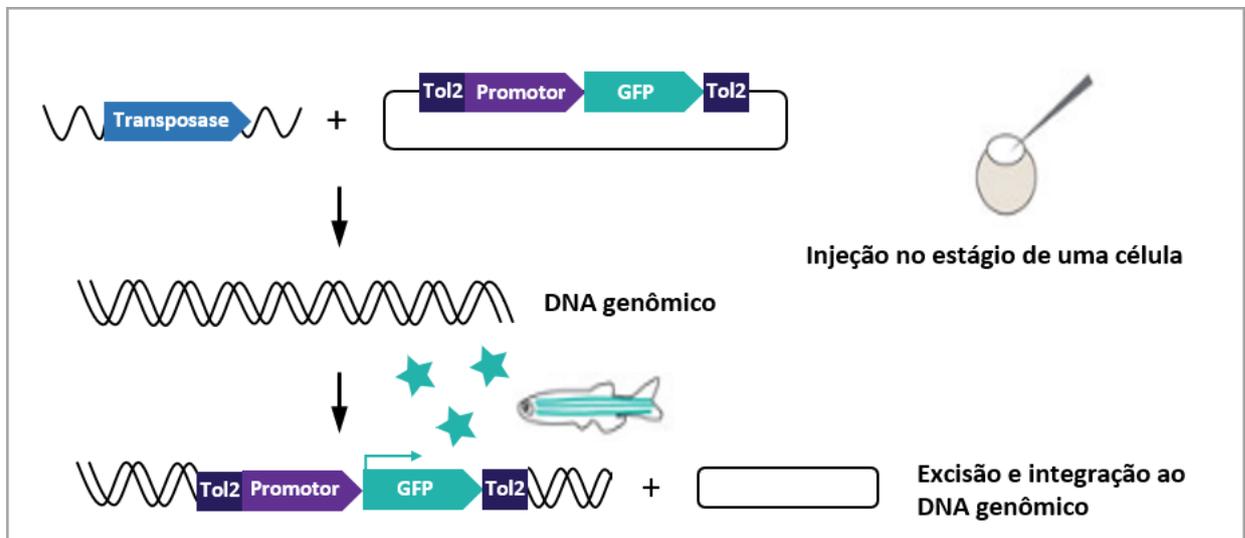
#### **2.4.1 O sistema transposon *Tol2***

Dentre os vetores de expressão, os plasmídeos contendo transposons - sequências repetitivas de DNA que podem mover-se de um *locus* a outro do genoma - são ferramentas comumente utilizadas para a transgênese animal (KAWAKAMI, K.; SHIMA; KAWAKAMI, 2000; NIKLAUS; NEUHAUSS, 2017). Para o peixe-zebra, o sistema do transposon *Tol2*, originado do peixe Medaka Japonês (*Oryzias latipes*), tem se mostrado o mais eficiente (CLARK et al., 2012), permitindo a inserção de fragmentos de DNA com mais de 100kb (SUSTER et al., 2011).

Para executar essa metodologia, a sequência de DNA de interesse dirigida por um promotor específico deve ser inserida em um vetor de expressão de modo a ser flanqueada pelo *Tol2* (figura 4). Esse vetor é injetado em embriões na primeira fase de desenvolvimento, junto ao mRNA da enzima transposase. Quando traduzida, a transposase reconhece a sequência flanqueada pelo *Tol2* e promove sua excisão do vetor e integração ao material genético do embrião. Como a inserção é realizada em locais aleatórios e ocorre ao longo do desenvolvimento embrionário, algumas células integram o DNA exógeno e outras não, gerando “animais mosaico”. Por esse motivo, é necessário realizar o cruzamento entre indivíduos, obtendo-se gerações transgênicas com maior taxa de integração (KAWAKAMI, 2007).

Em alguns casos, o material inserido interrompe a sequência de um gene ou o funcionamento de fatores regulatórios, causando mutações, por isso a inserção de DNA exógeno também é utilizada na mutagênese - alteração ou remoção da função gênica para verificação do fenótipo resultante e, posteriormente, presumir a função de um gene (NIKLAUS; NEUHAUSS, 2017). Técnicas avançadas, como a transgênese sítio-dirigida mediada por phiC31 e os sistemas binários Gal4/UAS (*Regulatory protein GAL4/Upstream activating sequence*) e Cre/Lox (*Cre recombinase/locus of X-over*), permitem o direcionamento do local de inserção e, de certa maneira, solucionam o problema de inserção aleatória (NIKLAUS; NEUHAUSS, 2017).

**Figura 4** - Transgênese utilizando o sistema do transposon *Tol2*



Fonte: adaptado de Niklaus; Nehaus (2017).

A sequência de DNA de interesse (GFP) dirigida por um promotor específico é inserida em um vetor de expressão de modo a ser flanqueada pelo *Tol2*. Esse vetor é injetado em embriões na primeira fase de desenvolvimento, junto ao mRNA da enzima transposase. Quando traduzida, a transposase reconhece a sequência flanqueada pelo *Tol2* e promove sua excisão do vetor e integração ao material genético do embrião.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo Geral

Construir um plasmídeo de expressão restrita e constitutiva do *clock1a* no músculo esquelético do peixe-zebra.

#### 3.2 Objetivos Específicos

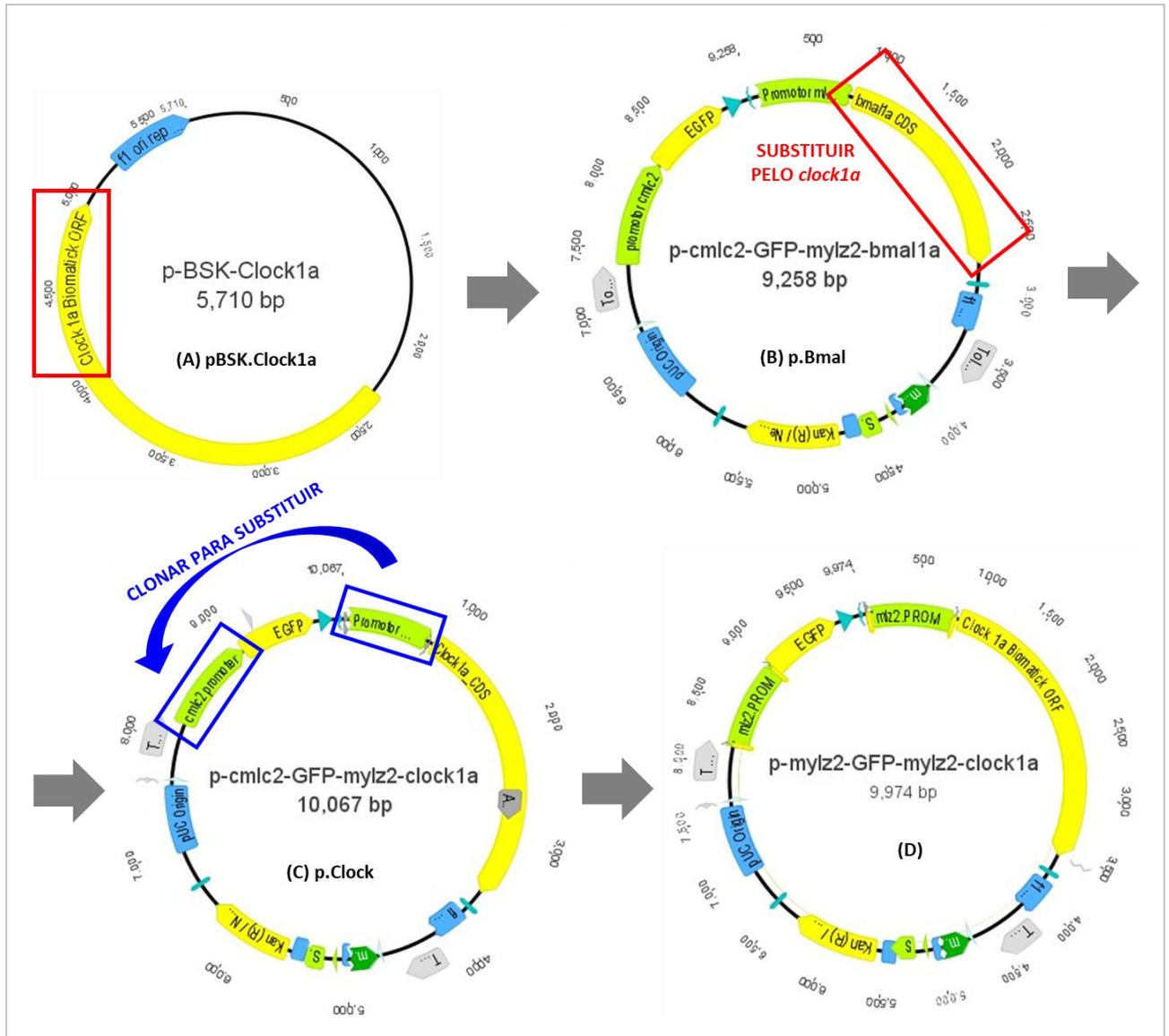
- Clonar o gene *clock1a* no plasmídeo *p-tol2-cmcl2-GFP-mylz2-Bmalla-tol2*, substituindo a sequência do *bmall1a*;
- Substituir, no vetor obtido, o promotor *cmcl2* pelo promotor *mylz2* para expressão da proteína verde fluorescente (GFP) no músculo esquelético;
- Investigar a configuração dos plasmídeos obtidos.

## 4 METODOLOGIA

Tendo em vista que a construção de um plasmídeo é um trabalho bastante laborioso e considerando a confiabilidade do trabalho anterior de Sousa (2016), orientado pelo Professor Ian Porto Gurgel do Amaral e realizado em colaboração com o Prof. Luiz Fernando Fernandes Marins (FURG), decidiu-se aproveitar o constructo por eles obtido – denominado p.Bmal - como base para obtenção do plasmídeo p.Clock, contendo o gene *clock1a* dirigido pelo promotor da cadeia leve da miosina esquelética (*mylz2*). O p.Bmal (p-tol2-cmcl2-GFP-mylz2-Bmal1a-tol2) foi construído com o objetivo de expressar o gene *bmalla* constitutivamente no músculo esquelético do peixe-zebra utilizando o promotor *mylz*. Dessa forma, a expressão circadiana do gene é modificada para uma expressão constante e independente do ciclo claro:escuro.

A primeira etapa para obtenção do p.Clock foi sub-clonar a sequência do gene *clock1a* - sintetizado em laboratório e clonado no plasmídeo comercial pBSK.Clock1a (figura 5A) - no plasmídeo p.Bmal (figura 5B), substituindo a sequência do gene *bmalla*. Como a marcação de transgenia da linhagem transgênica para o *bmalla* ocorre pela expressão da proteína verde fluorescente (GFP) no coração do animal, um diferente tipo de marcação para identificar a futura linhagem transgênica para o *clock1a* deveria ser utilizado. Assim, a partir do p.Clock, optou-se por substituir o promotor específico para músculo cardíaco (*cmcl2*), que dirige a expressão da proteína verde fluorescente (GFP), pelo promotor *mylz2* (figura 5C), obtendo-se o plasmídeo p-tol2-mylz2-GFP-mylz2-clock1a-tol2 (figura 5D), que poderia permitir a visualização de transgenia através de fluorescência verde no músculo esquelético. Os protocolos experimentais utilizados para construir e verificar a estrutura do plasmídeo ao longo dessas etapas estão descritos nos tópicos a seguir.

**Figura 5** - Construção do plasmídeo p-tol2-mylz2-GFP-mylz2-clock1a-tol2



Fonte: a autora (2018).

Uma finalidade da metodologia adotada foi sub-clonar a sequência do gene *clock1a*, sintetizado em laboratório e clonado em um plasmídeo comercial (A), em outro plasmídeo (B), substituindo a sequência do gene *bmal1a*, de expressão dirigida pelo promotor do gene da cadeia leve da miosina esquelética (*mylz2*). A partir do produto obtido, objetivou-se substituir o promotor específico para músculo cardíaco (*cm1c2*), que dirige a expressão da proteína verde fluorescente (GFP), pelo promotor *mylz2* (C), obtendo-se o plasmídeo p-tol2-mylz2-GFP-mylz2-clock1a-tol2 (D), que poderá permitir a visualização de transgenia através de fluorescência verde no músculo esquelético.

#### 4.1 Sub-clonagem do Gene *clock1a*

A sequência codificadora do gene *clock1a* (número de acesso ENSDARG00000011703 na base de dados Ensembl) foi sintetizada *in vitro* por uma empresa de Biotecnologia (Biomatik, Canadá), com sequências de reconhecimento das enzimas de restrição *KpnI* e *NotI* flanqueando a sequência codificadora do gene. O gene foi clonado no plasmídeo pBluescript II SK (+),

originando o plasmídeo pBSK.Clock1a (figura 5A), o qual foi utilizado para transformar células quimiocompetentes de *Escherichia coli*. Após o crescimento por 16h da linhagem transformada, o plasmídeo foi purificado com o kit *PureLink® Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen) e digerido com as enzimas de restrição *KpnI* e *NotI* por 2h a 37°C, utilizando as concentrações recomendadas pelo fabricante. O produto de tamanho esperado - 2718 pares de base (pb) - foi identificado e purificado com o kit *illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Sigma).

O plasmídeo pBmal (tol2-cmcl2-GFP-mylz2-Bmal1a-tol2), possui marca de resistência à canamicina e também contém sítios de restrição para as enzimas *KpnI* e *NotI* flanqueando a sequência codificadora do *bmal1a*. Após a restrição deste plasmídeo com as enzimas *KpnI* e *NotI* por 2h a 37°C, utilizando as concentrações recomendadas pelo fabricante, o produto com tamanho de 7357pb foi purificado. Em seguida, a sequência codificadora do *clock1a*, anteriormente purificada, foi ligada com este produto (utilizando DNA ligase, em concentração recomendada pelo fabricante), resultando em um plasmídeo de 10067pb (p-tol2-cmcl2-GFP-mylz2-Clock1a-tol2) denominado p.Clock. Células quimiocompetentes de *Escherichia coli* foram transformadas com o pB.Clock, originando várias colônias positivas, correspondentes a 15 clones (p.Clock#1 a p.Clock#15).

## 4.2 Análises de Restrição

Para confirmação da obtenção do p-tol2-cmcl2-GFP-mylz2-Clock1a-tol2 na posição correta, foi selecionada a linhagem de *E. coli* p.Clock#15. Os plasmídeos foram purificados com o kit *PureLink® Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen). A concentração e a qualidade de DNA total foram determinadas utilizando a técnica de espectrofotometria com o aparelho *NanoDrop® spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific), por meio das relações A260nm/A280nm e A260nm/A230nm.

As enzimas de restrição utilizadas foram a *KpnI*-HF (BioLabs cod. R31425) e a *NotI*-HF (BioLabs cod. R31895) que flanqueiam a sequência codificadora do *clock1a*. No total, foram realizadas quatro reações: 1) Controle (com plasmídeo, sem enzimas), 2) Digestão com a *NotI* (produto esperado: cerca de 1000pb), 3) Digestão com a *KpnI* (produto esperado: cerca de 1000pb) e 4) Digestão com *NotI* e *KpnI* (produtos esperados: fragmentos de 7300pb e 2700pb). As reações foram realizadas com a concentração de 750ng de DNAtotal e de acordo os protocolos apresentados na Tabela 2. O termociclo da reação foi realizado em uma etapa a 37°C por 90min (etapa de restrição), seguida por uma segunda etapa a 65°C por 20min (inativação da *NotI*, a *KpnI*

não é desativada por calor). Equipamentos e software utilizados: BioRad C1000 Thermal Cycler + CFX96 Real-Time System \_ CFX Manager 2.0. Para visualização do resultado, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose (0,8%), utilizando o *GelRed* como marcador de peso molecular.

**Tabela 2** - Protocolos das reações de restrição do p.Clock#15 com as enzimas *NotI* e *KpnI*

Componente	Volume (µL) por reação			
	Controle	<i>NotI</i>	<i>KpnI</i>	<i>NotI</i> + <i>KpnI</i>
Tampão	1,00	1,00	1,00	1,00
Enzima <i>NotI</i>	0,00	0,10	0,00	0,10
Enzima <i>KpnI</i>	0,00	0,00	0,10	0,10
Plasmídeo	3,78	3,78	3,78	3,78
Água	15,02	15,12	15,12	15,22

Fonte: a autora (2018).

### 4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para obter o plasmídeo *tol2-mylz2-GFP-mylz2-Clock1a-tol2*, optou-se por amplificar toda a sequência do plasmídeo *tol2-cmcl2-GFP-mylz2-Clock1a-tol2*, excetuando-se a região do promotor *cmcl2*, e efetuar a ligação da sequência do promotor *mylz2* previamente purificado. Para isso, foram desenhados dois pares de primers pVector01 F/R e pVector02 F/R que foram utilizados nas reações de PCR. Como esses primers não foram capazes de produzir os produtos de PCR esperados, um novo par de primers foi desenhado, pVector01.curto F/R e pVector02.curto F/R, mais específicos e menores, com o intuito de aumentar a possibilidade de obtenção dos produtos. Dessa forma, foram realizados dois conjuntos de reações (PCR 1 e PCR 2), utilizando como *template* o p.Clock#15. Como controles positivos, se estabeleceu as ampliações realizadas pelos primers *mylz2.curto* F/R e *Clock.Biomatik* F/R, que correspondem, respectivamente, às sequências do promotor *mylz2* e do gene *clock1a*. As sequências dos primers utilizados e a extensão de seus produtos estão descritas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Primers utilizados nas reações de PCR convencional

<b>Primer</b>	<b>Sequência 5' - 3'</b>	<b>Tamanho</b>	<b>%GC</b>	<b>Produto</b>
pVector01	F: ACAGTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAG R: GTCGCGCCGCTTTACTGAGGAGGAGGGTTGC	F: 27pb R: 32pb	F: 59 R: 66	4.562pb
pVector02	F: AAAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACC R: TTACATATGAGATCTGCGAAGATACGGCC	F: 36pb R: 29pb	F: 51 R: 45	4.619pb
pVector01.curto	F: CATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG R: GTCGCGCCGCTTTACTGAGG	F: 22pb R: 21pb	F: 64 R: 67	4.563pb
pVector02.curto	F: AAAGCGGCCGCGACTCTAGATC R: AGATCTGCGAAGATACGGCCACG	F: 22pb R: 23pb	F: 59 R: 57	4.620pb
mylz2.curto	F: CAACATATGAATTCTGACCGGGTGAGGTC R: ACCGTCGACCGTCGAGACGGTATGTGTGAAAGTC	F: 29pb R: 33pb	F: 48 R: 58	803pb
Clock.Biomatik	F: CTGGGAGAACACAGCGAAGT R: TGTCTCAAAGGCGTGTCTC	F: 20pb R: 20pb	F: 55 R: 55	256pb

Fonte: a autora (2018).

F: forward; R: reverse. %GC: conteúdo GC em porcentagem.

Os reagentes das reações foram adicionados de acordo com o protocolo descrito na Tabela 4. O termociclo da PCR 1 consistiu em ativação inicial a 95°C por 30s, seguida por quarenta ciclos de 95°C por 30s, 55°C por 30s (para os *primers* mylz2, Clock.Biomatik e pVector01), 62,4°C por 30s (para o *primer* pVector02) e 72°C por 5min, seguidos por um ciclo de terminação a 72°C por 5min. Para a PCR 2, foi realizada a ativação inicial a 95°C por 30s, seguida por 40 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 30s (para todos os *primers*) e 72°C por 5min, seguidos por um ciclo de terminação a 72°C por 5min. O termociclador utilizado foi o *BioRad C1000 Thermal Cycler (CFX96 Real-Time System \_ CFX Manager 2.0)*. O resultado foi visualizado pela técnica de eletroforese em gel de agarose (0,8%), utilizando *GelRed* como marcador de peso molecular.

**Tabela 4** - Composição da reação de PCR convencional

<b>Componente</b>	<b>Volume (µL)</b>
Tampão (10x)	1,250
dNTP (10 mM)	0,250
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,750
Primer	0,250
Template	0,250
Taq polimerase	0,075
Água	9,675
Volume total	12,50

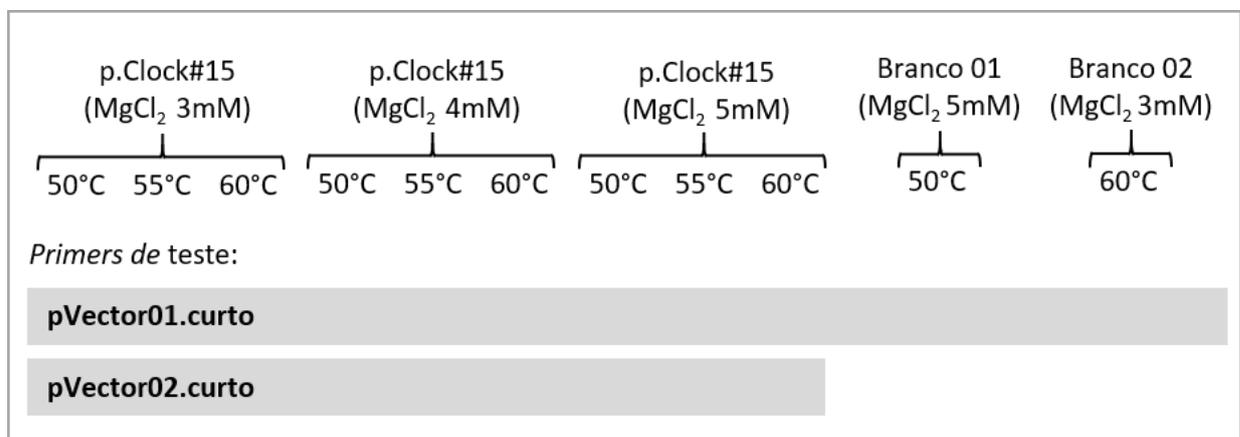
Fonte: a autora (2018).

### 4.3.1 Otimização da PCR

Como os produtos de PCR esperados não foram obtidos, foi necessário testar outras condições de reação, visto esses produtos são necessários para as próximas etapas do projeto. Este teste foi realizado para aumentar a permissividade e diminuir a especificidade da reação, combinando-se diferentes concentrações do cofator  $MgCl_2$  e diferentes temperaturas de anelamento. Quanto maior a concentração de  $MgCl_2$  e menor temperatura de reação, maior a permissividade da enzima e menor sua especificidade.

Os primers de teste utilizados foram pVector01.curto F/R (4.563 pb), pVector02.curto F/R (4.620 pb). As reações (figura 6) foram adaptadas para concentrações distintas do  $MgCl_2$  (3mM, 4mM e 5mM) e realizadas em temperaturas de 50°C, 55°C e 60°C. O *template* teste utilizado foi o pClock#15. As reações de branco (sem o *template* teste) foram realizadas apenas para o pVector01.curto F/R nas condições de menor permissividade e maior especificidade ( $MgCl_2$  3mM à 60°C) e de maior permissividade e menor especificidade ( $MgCl_2$  5mM à 50°C). O termociclo para as 21 reações consistiu em ativação inicial a 95°C por 30s, seguida por quarenta ciclos de 95°C por 30s, gradientes de 50°C, 55°C e 60°C por 30s e 72°C por 5min, seguidos por um ciclo de terminação a 72°C por 5min. Como controle positivo, utilizou-se o primer mylz2 F/R (812 pb), sem alterações na concentração de  $MgCl_2$  e com temperatura de anelamento de 50°C. O termociclador foi BioRad C1000 Thermal Cycler + CFX96 Real-Time System \_ CFX Manage. O resultado foi verificado através da técnica de eletroforese (100V) em gel de agarose (0,8%), utilizando *GelRed* como marcador de peso molecular.

**Figura 6** - Configuração das reações de otimização da PCR de acordo com o primer de teste



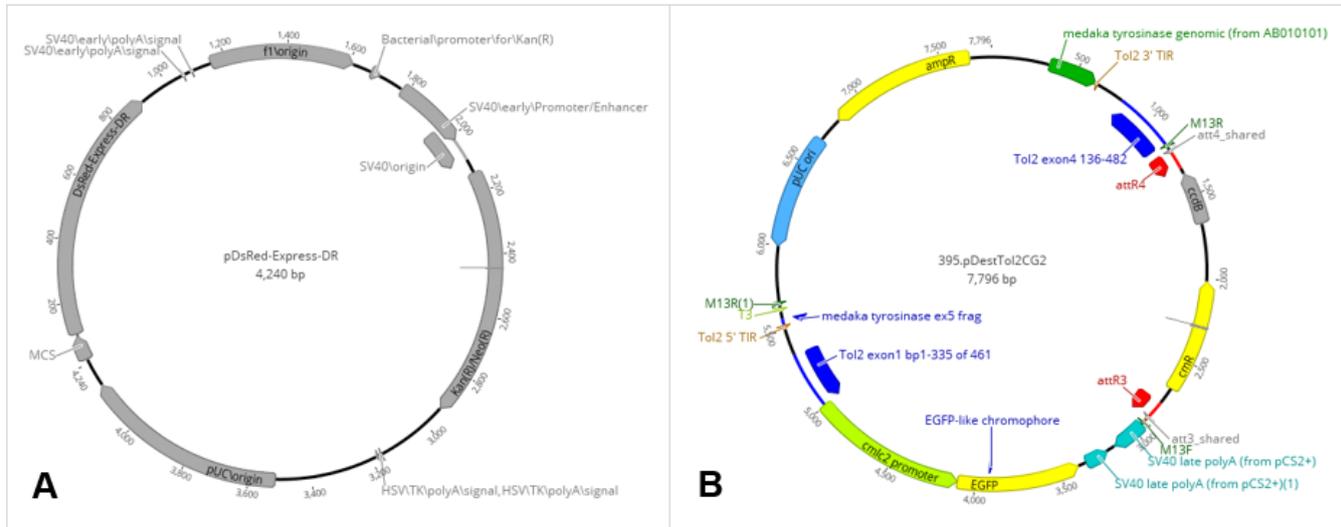
Fonte: a autora (2018).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

É importante destacar que a abordagem do presente trabalho é bastante técnica e baseia-se em metodologias cientificamente consolidadas (análise de restrição e clonagem por PCR). Os trabalhos mais atuais sobre transgenia animal focam na análise da taxa de transgenia e na observação dos efeitos consequentes, portanto, relatam a construção do vetor de expressão como método, não abordando detalhadamente as etapas para obtenção e verificação da configuração do constructo. Além disso, embora seja comum o estudo do relógio molecular a partir de modificações por mutagênese ou transgênese, poucos artigos relatam a indução da modificação na expressão do gene *clock1a* no músculo-esquelético de vertebrados com o intuito de obter informações sobre os efeitos dessa alteração. Para peixes, especificamente, estudos similares com esse objetivo não foram encontrados.

Por esse motivo, optou-se por utilizar como principal referencial comparativo o projeto desenvolvido anteriormente no LABOrA/UFPB, em que houve a construção do plasmídeo *tol2-cmcl2-GFP-mylz2-Bmal1a-tol2* (SOUSA, 2017). Esse plasmídeo possui o promotor *cmcl2* para dirigir a expressão da GFP no coração e o *mylz2* para induzir a expressão constitutiva do *bmal1a* no músculo esquelético do peixe-zebra. Com essa construção, objetivou-se confirmar a transgenia pela fluorescência verde no coração e modificar a expressão circadiana do gene para uma expressão constante e independente do ciclo claro:escuro, permitindo avaliar a importância da expressão circadiana deste gene para a fisiologia e crescimento do animal. Para sua construção, Sousa (2017) descreve a utilização de dois outros vetores (figura 7), o pDsRED-Express-DR (*Clontech Laboratories, Inc*) e o pDestTol2CG2 (KWAN et al., 2007). A partir do pDsRED-Express-DR foi obtida a região codificadora do gene de resistência ao antibiótico canamicina e a região MCS, que contém sequências de restrição para diversas enzimas, permitindo a inserção do DNA de interesse. O pDestTol2CG2 foi doador do sistema *Tol2* e da sequência *cmcl2:GFP*. As sequências dos genes *bmal1a* e *mylz2* foram obtidas diretamente do peixe-zebra por isolamento do mRNA, utilizado para produção do cDNA e posterior amplificação com primers específicos (realizado em colaboração com o Prof. Dr. Luis Fernando Fernandes Marins, FURG). Após etapas de restrição com enzimas específicas as sequências citadas foram ligadas para obtenção do constructo final, aqui denominado p.Bmal.

**Figura 7** - Plasmídeos pDsRED-Express-DR e pDestTol2CG2



Fonte: a autora (2018).

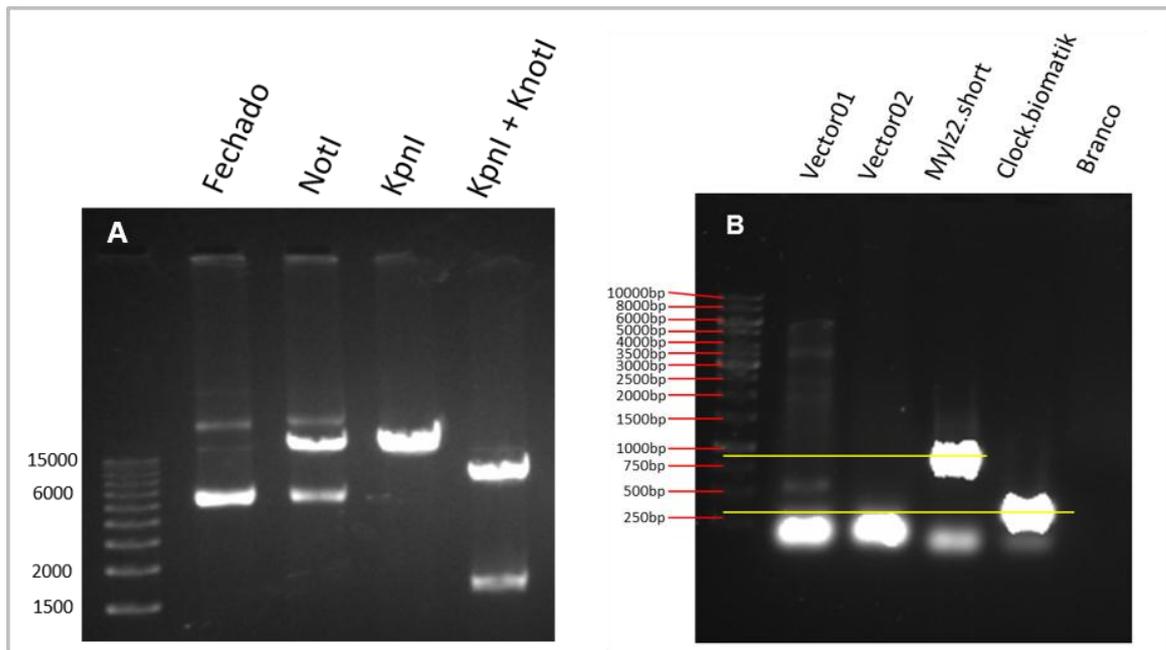
(A) A partir do pDsRED-Express-DR foi obtida a região codificadora do gene de resistência ao antibiótico canamicina e a região MCS. (B) O pDestTol2CG2 foi doador do sistema *Tol2* e da sequência *cmcl2:GFP*.

Tendo em vista que tantas etapas para construção de um plasmídeo tornam o trabalho bastante laborioso e considerando a confiabilidade do trabalho anterior, decidiu-se aproveitar o constructo obtido por Sousa (2017) e colaboradores como base para obtenção do plasmídeo contendo o *clock1a*. Assim, as regiões essenciais ao plasmídeo (MCS, sequência de resistência à canamicina, *Tol2*, *mylz2* e *GFP*) seriam prontamente obtidas. Diferentemente do que foi realizado por Sousa (2017), a sequência do gene de interesse - o *clock1a*, neste caso - foi obtida por síntese *in vitro* e clonada no plasmídeo pBSK.Clock1a. Essa é uma técnica de alto custo financeiro, devido à necessidade de correção de erros e à complexidade de sintetizar longos fragmentos de DNA (CZAR et al., 2008; KOSURI; CHURCH, 2014; XIONG et al., 2008), porém foi a alternativa mais viável após tentativas malsucedidas de amplificar o cDNA do transcrito extraído do músculo do peixe-zebra.

A sequência clonada no plasmídeo pBSK.Clock1a foi isolada e purificada para ser inserida no p.Bmal, efetuando-se a troca do gene *bmal1a* pelo *clock1a*, originando o plasmídeo p.Clock (tol2- cmcl2-GFP-mylz2-Clock1a-tol2). Após essa etapa foi realizada a análise de restrição do clone p.Clock#15 utilizando-se as enzimas que flanqueiam a sequência do *clock1a* (*KpnI* e *NotI*). Embora não tenha sido publicado, no projeto anterior com o *bmal*, também foi realizado o procedimento de restrição com essas enzimas - que flanqueiam a sequência do *bmal1a* - e foi confirmada a configuração esperada do plasmídeo. Além disso, a microinjeção desse plasmídeo foi realizada e a linhagem transgênica foi obtida com sucesso, atestando a funcionalidade do constructo (SOUSA, 2017). No presente trabalho, as análises de restrição do p.Clock#15 com as enzimas *NotI* e *KpnI*, individualmente, resultaram nos produtos lineares

previstos, observados na faixa acima de 15,000pb (figura 8A). A reação com as duas enzimas também originou os produtos esperados, um maior, na região aproximada entre 6000 e 15000bp, e um menor, observado próximo à região de 2000pb. Embora não estejam na faixa exata de comprimento dos fragmentos (7300pb e 2700pb) – o que pode ter acontecido devido ao efeito do marcador de peso molecular utilizado (*GelRed*) – a análise de restrição com o p.Clock#15 confirmou a inserção do *Clock1a* na posição correta.

**Figura 8** - Análise de restrição e PCR com os primers pVector01 F/R e pVector02 F/R



Fonte: a autora (2018).

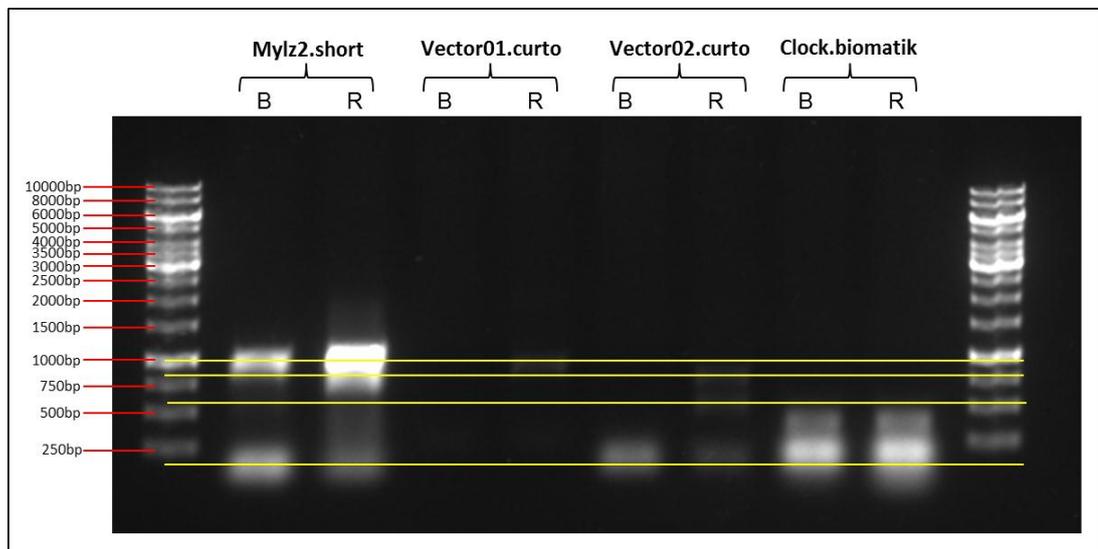
(A) Restrições do p.Clock#15 com as enzimas *NotI* e *KpnI*. Os produtos observados na faixa acima de 15,000pb, nas colunas da *NotI* e *KpnI*, indicam os fragmentos lineares esperados. A reação com as duas enzimas (*NotI* + *KpnI*) também originou os produtos esperados, um maior, na região aproximada entre 6000 e 15000bp, e um menor, observado próximo à região de 2000pb. (B) PCR do p.Clock#15 com os primers Vector01 F/R e Vector02 F/R. Observa-se apenas o indício de fragmentos aleatórios com tamanho menor do que os fragmentos esperados (cerca de 5000pb). Controles positivos: *mylz2.short* F/R (803 pb) e *Clock.biomatik* F/R (256 pb).

Para permitir a distinção entre a linhagem transgênica para o *bmal* obtida por Sousa (2017) e colaboradores, e a futura linhagem transgênica para o *clock1a*, um diferente tipo de marcação deveria ser utilizado. Assim, optou-se por construir o plasmídeo tol2- *mylz2*-GFP-*mylz2*-*Clock1a*-tol2, em que o *mylz2* dirige a expressão da GFP para marcação da transgenia no músculo esquelético. A maneira mais prática encontrada para construção dessa estrutura foi amplificar todo o p.Clock, exceto a região codificadora do *cmcl2*, e posteriormente ligar a sequência clonada do *mylz2*. Para isso, foram desenhados dois *primers*: pVector01 F/R e pVector02 F/R. O pVector01 F/R deveria amplificar a região de 4.562pb correspondente à sequência do GFP, do *mylz2* e do *clock1a*. Enquanto o pVector02 F/R deveria amplificar segunda parte do plasmídeo (4.619 pb), que corresponde da região posterior ao *clock1a* à região anterior

ao *cmcl2*. Assim, após a confirmação da posição do *clock1a*, o próximo passo para a construção do plasmídeo final seria a amplificação dessas regiões. No entanto, na PCR realizada com esses *primers* (figura 8B) esses produtos não foram obtidos. Observa-se apenas o indício de fragmentos aleatórios com tamanho menor do que os fragmentos esperados (cerca de 5000pb).

Esse resultado pode estar atrelado à baixa eficiência de anelamento dos *primers*, que é um fator importante para o sucesso e a precisão de uma PCR (SIPOS et al., 2007). Uma alternativa para contornar esse problema é aumentar a probabilidade de anelamento dos primers com sequências correspondentes, isso significa aumentar sua permissividade e diminuir sua especificidade. Uma maneira de controlar essa propriedade é alterar o tamanho do *primer*, uma vez que primers menores são menos específicos (APTE; DANIEL, 2009; DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1993). Portanto, os *primers* pVector01.curto F/R (4.562 pb) e pVector02.curto F/R (4.619 pb), de menor extensão, foram desenhados e uma nova PCR foi realizada. Nos resultados dessa reação (figura 9), é possível perceber que há bandas fracas na faixa de 250pb e entre 1000 e 2000pb para o pVector02.curto F/R. Enquanto isso, para o pVector01.curto F/R há uma banda mais fraca na faixa de 1000pb. Portanto, os resultados esperados também não foram obtidos.

**Figura 9** - PCR com pVector01.curto F/R e pVector02.curto F/R



Fonte: a autora (2018).

Reações com (pVector01.curto F/R (4.562 pb) e pVector02.curto F/R (4.619 pb) para aumentar a permissividade e diminuir a especificidade da reação. Os resultados esperados também não foram obtidos, observa-se apenas bandas fracas nas regiões de pequeno comprimento. Legenda: B = branco e R = reação.

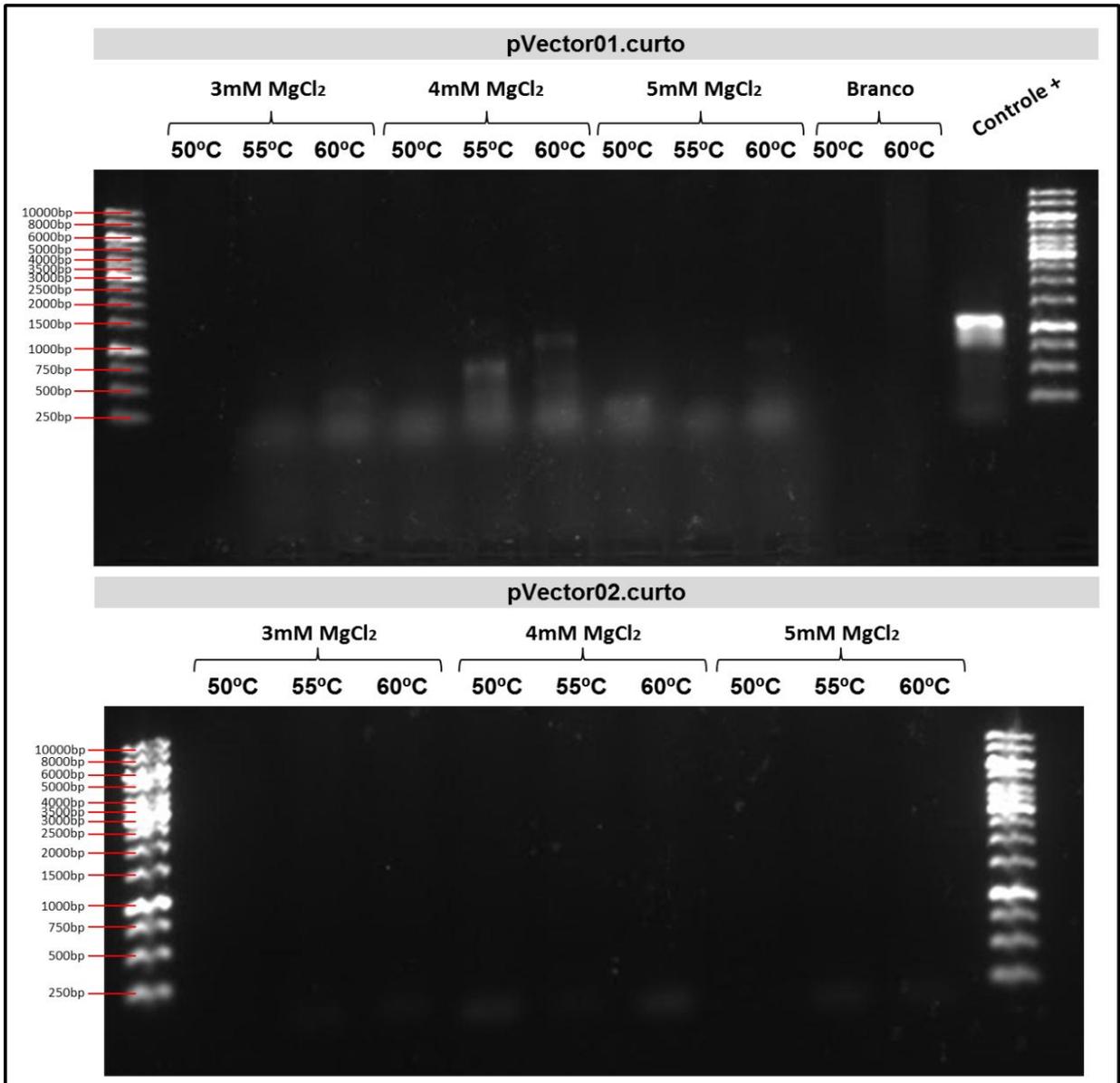
Outro fator importante que pode interferir na eficiência da PCR é a atividade da Taq Polimerase (SPIBIDA et al., 2017). Na duas PCRs realizadas (figuras 8B e 9) a amplificação

com os *primers* mylz2.curto F/R (803 pb) e Clock.Biomatik F/R (256 pb), utilizados como controles positivos, indica a configuração correta do *mylz2* e do *clock1a* e também atesta o funcionamento da Taq. No entanto, a capacidade de amplificação da polimerase é influenciada por fatores como o comprimento do fragmento a ser amplificado e o conteúdo GC (MAMEDOV et al., 2008). Fragmentos longos ou com grande percentual de pares GC tendem a dificultar a reação. Como as regiões amplificadas pelos primers pVector01 F/R, pVector02 F/R, pVector01.curto F/R e pVector02.curto F/R são maiores do que as sequências do *clock1a* e do *mylz2* e podem ter maior conteúdo GC, é possível que a Taq Polimerase não tenha sido capaz de amplificá-las eficientemente. Uma alternativa para esse problema é troca da Taq Polimerase por polimerases mais eficientes ou a utilização de misturas de polimerases (DAVALIEVA; EFREMOV, 2010; ŠPIBIDA et al., 2017). Além disso, estudos demonstram que é possível melhorar a eficiência de amplificação de sequências com alto conteúdo GC (GC > 60%) adicionando-se solventes orgânicos, como DMSO (dimetilsulfóxido) e formamida, e outros potencializadores, como soro bovino (FARELL; ALEXANDRE, 2012).

Além desses problemas outros fatores podem afetar o desempenho da PCR. De acordo com Markoulatos et al. (2002), a temperatura de anelamento é o principal parâmetro para otimização de uma PCR, uma vez que é fácil de medir e modificar. Geralmente, temperaturas mais altas favorecem o anelamento do primer e aumentam a eficiência de amplificação (APTE, 2009). Outros estudos afirmam que a concentração de íons magnésio ( $Mg^{2+}$ ) é também um fator importante. Esses e outros íons, como  $MgSO_4$  e  $Mn^{2+}$ , estabilizam a estrutura do DNA e dos dNTPs, facilitando as ligações (SLACK et al., 2011). De modo geral, elevadas concentrações diminuem a especificidade da reação e aumentam a eficiência da polimerização.

Considerando esses aspectos, optou-se por testar a combinação entre diferentes concentrações do cofator  $MgCl_2$  (3mM, 4mM e 5mM) e diferentes temperaturas de anelamento (50°C, 55°C e 60°C) com os primers curtos. Analisando-se o resultado (figura 10), destaca-se o maior número de reações com o pVector01.curto F/R que amplificaram pequenos fragmentos, em comparação com o pVector02.curto F/R. Para o primeiro primer também são observados *amplicons* maiores (entre 1000 e 2000bp) nas reações com  $MgCl_2$  4mM a 55° e 60°C e com  $MgCl_2$  5mM a 60°C. Para o pVector02.curto F/R duas bandas fracas, porém evidentes, são observadas para as reações com  $MgCl_2$  4mM, a 50° e 60°C na região de 250pb. Dessa forma, nesse teste de otimização, também não foi possível obter os produtos necessários para a produção do plasmídeo final.

**Figura 10** - Otimização da PCR com os primers pVector01.curto F/R e pVector02.curto F/R



Fonte: a autora (2018).

Em uma segunda estratégia para obter os produtos esperados, optou-se por testar a combinação entre diferentes concentrações do cofator MgCl<sub>2</sub> (3mM, 4mM e 5mM) e diferentes temperaturas de anelamento (50°C, 55°C e 60°C) com os *primers* pVector01.curto F/R e pVector02.curto F/R. Controle positivo: mylz2.curto F/R (50°C).

Embora muitos trabalhos relatem efeitos positivos da otimização com alterações na temperatura e na concentração de MgCl<sub>2</sub>, efeitos negativos ou nulos também podem ser observados (RIEDEL; WINGFIELD; BRITZ, 1992). Além disso, outros parâmetros, isolados ou combinados, também podem afetar o desempenho de uma PCR, tais como: qualidade e concentração do *template* de DNA; concentração dos desoxinucleotídeos (dNTPs); o sistema tampão da PCR; a concentração da DNA polimerase; condições do termociclo da PCR (MARKOULATOS; SIAFAKAS; MONCANY, 2002) e, inclusive, o erro experimental. Por

isso, diante dos resultados obtidos, outras configurações de PCR devem ser testadas para dar continuidade à construção do plasmídeo p-tol2-mylz2-GFP-mylz2-Bmal1a-tol2.

## 6 CONCLUSÃO

Foi obtido o plasmídeo p.Clock#15 (p-tol2-cmcl2-GFP-mylz2-Clock1a-tol2) que contém o gene *clock1a* dirigido pelo promotor da miosina leve do músculo esquelético como gene de interesse e o gene da proteína verde fluorescente dirigido pelo promotor da miosina cardíaca como marcador de seleção. A obtenção do plasmídeo p-tol2-mylz2-GFP-mylz2-clock1a-tol2, contendo a proteína verde fluorescente com o promotor da cadeia leve da miosina esquelética, não foi possível com a metodologia e os reagentes utilizados. Portanto, outras metodologias devem ser testadas para dar continuidade à construção desse plasmídeo.

## REFERÊNCIAS

- ACTIS, L. A.; TOLMASKY, M. E.; CROSA, J. H. Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. **Frontiers in Bioscience**, 1999.
- ADDGENE. **Plasmids 101: A Desktop Resource**. 3. ed. Watertown: Addgene, 2017. v. 190.
- ALMEIDA, A. P; et al. Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.133-148. 2010.
- AMARAL, I. P. G. do. **Transcriptional regulation in skeletal muscle of zebrafish in response to nutritional status, photoperiod and experimental selection for body size**. 181 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Scottish Oceans Institute. University of St Andrews, Scotland. 2011.
- 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**, v. 107, n. 44, p. 19090–19095, 2010.
- APTE, A.; DANIEL, S. PCR primer design. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 4, n. 3, p. 1–10, 2009.
- BAXENDALE, S.; VAN EEDEN, F.; WILKINSON, R. The Power of Zebrafish in Personalised Medicine. In: EL-KHAMISY, S. (Ed.). **Personalised Medicine: Advances in Experimental Medicine and Biology**. Cham: Springer, 2017. v. 1007. Cap. 10. p. 179–197.
- BEN-MOSHE LIVNE, Z. et al. Genetically Blocking the Zebrafish Pineal Clock Affects Circadian Behavior. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 11, p. 1–26, 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.
- BISWAS, A. K.; ENDO, M.; TAKEUCHI, T. Effect of different photoperiod cycles on metabolic rate and energy loss of both fed and unfed young tilapia: Part I. **Fisheries Science**, v. 68, p. 465–477, 2002.
- BISWAS, A. K.; TAKEUCHI, M. E. Effect of different photoperiod cycles on metabolic rate and energy loss of both fed and unfed young tilapia: Part II. **Fisheries Science**, v. 68, p. 465–477, 2002.
- BUIJS, R. M.; KALSBECK, A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 7, p. 521–526, 2001.

- BUTTGEREIT, F. et al. Clocking in: Chronobiology in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 6, p. 349–356, 2015.
- CAHILL, G. M. Clock mechanisms in zebrafish. **Cell and Tissue Research**, 15, v. 309, n. 1, p. 27–34, 2002.
- CAVALLARI, N. et al. A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. **PLoS Biology**, v. 9, n. 9, 2011.
- CECON, E.; FLÔRES, D. E. de F. L. Regulação da expressão gênica nas engrenagens do relógio circadiano de mamíferos. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 28–33, jun. 2010.
- CHA, Rita S.; THILLY, William G. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. **PCR Methods Appl**, v. 3, n. 3, p. 18–29, 1993.
- 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, 15 maio 2013.
- CHATTERJEE, S.; MA, K. Circadian clock regulation of skeletal muscle growth and repair. **F1000Research**, v. 5, p. 1549, 30 jun. 2016.
- CHAVES, I. et al. The Cryptochromes: Blue Light Photoreceptors in Plants and Animals. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, n. 1, p. 335–364, 2011.
- 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. NIH Public Access. **Methods in cell biology**, v. 104, p. 137–149, 2012.
- COHEN, S. N. et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 11, p. 3240–4, nov. 1973.
- COHEN, S. N.; CHANG, A. C.; HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 8, p. 2110–4, ago. 1972.
- CRAIG, S. E. **Characterizing the Role for the Timeless Gene in Planarian Regeneration**. 2018. Indiana University of Pennsylvania, 2018.
- CRUMBLEY, C. et al. Characterization of the core mammalian clock component, NPAS2, as a REV-ERB $\alpha$ /ROR $\alpha$  target gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 46, p. 35386–35392, 2010.
- CRUMBLEY, C.; BURRIS, T. P. Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. 2–7, 2011.
- CZAR, M. J. et al. **Gene synthesis demystified**. **Trends in Biotechnology**. [S.l.: s.n.]. 2009
- 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.
- DAVALIEVA, K. G.; EFREMOV, G. D. A new thermostable DNA polymerase mixture for efficient amplification of long DNA fragments. **Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia**, v. 46, n. 2, p. 248–252, 2010.
- DIEFFENBACH, C. W.; LOWE, T. M.; DVEKSLER, G. S. General concepts for PCR primer design. **PCR methods and applications**, v. 3, n. 3, p. S30-7, dez. 1993.
- DUNLAP, J. C. Molecular bases for circadian clocks. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 271–290, 1999.
- DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J. The Neurospora circadian system. **Journal of Biological Rhythms**, v. 19, n. 5, p. 414–424, 2004.
- EL-SAYED, A. F. M.; KAWANNA, M. Effects of dietary protein and energy levels on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock in a recycling system. **Aquaculture**, v. 280, n. 1–4, p. 179–184, 2008.
- ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in The Wild: A Review of Natural History And New Notes from The Field. **Zebrafish**, v. 4, n. 1, p. 21–40, 2007.
- FARELL, E. M.; ALEXANDRE, G. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. **BMC Research Notes**, v. 5, 2012.
- FLÔRES, D. E. F. L. et al. Entrainment of circadian rhythms to irregular light/dark cycles: a subterranean perspective. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2016.
- GARCIA, J. G. N.; MA, S. F. Polymerase chain reaction: A landmark in the history of gene technology. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12 SUPPL., p. 429–432, 2005.
- GARDNER, M. J. et al. How plants tell the time. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 1, p. 15–24, 1 jul. 2006.
- GAVRIOUCHKINA, D. et al. Thyrotroph embryonic factor regulates light-induced transcription of repair genes in zebrafish embryonic cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–10, 2010.
- GHENO, E. M. et al. Zebrafish in Brazilian Science: Scientific Production, Impact, and Collaboration. **Zebrafish**, 15, v. 13, n. 3, p. 217–225, 2016.
- GIEBULTOWICZ, J. M. et al. Transplanted Drosophila excretory tubules maintain circadian clock cycling out of phase with the host. **Current Biology**, v. 10, n. 2, p. 107–110, 2000.
- GONG, Z. et al. Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, n. 1, p. 58–63, 2003.
- GOTHILF, Y. et al. Pineal-specific expression of green fluorescent protein under the control of the serotonin-N-acetyltransferase gene regulatory regions in transgenic zebrafish. **Developmental Dynamics**, transgênicopinealaanat, v. 225, n. 3, p. 241–249, 2002.

- GREEN, A. J.; PLANCHART, A. The neurological toxicity of heavy metals: A fish perspective. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 208, n. November, p. 12–19, 2018.
- HELSINKI, D. R. Introduction to plasmids: a selective view of their history. **Plasmid Biology**, p. 1–21, 2004.
- HOLTZMAN, G. et al. Learning to fish with genetics: a primer on the vertebrate model *Danio rerio*. **Genetics**, v. 203, n. 3, p. 1069-1089, 2016.
- HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.
- HUT, R. A. et al. Latitudinal clines: An evolutionary view on biological rhythms. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1765, p. 1–9, 2013.
- IDILLI, A. I. et al. Zebrafish in translational cancer research: Insight into leukemia, melanoma, Glioma and endocrine tumor biology. **Genes, câncer**, v. 8, n. 9, 2017.
- JOHNSTON, I. A. Plasticity of muscle fibre number in seawater stages of Atlantic salmon in response to photoperiod manipulation. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 19, p. 3425–3435, 2003.
- JOHNSTON, I. A.; BOWER, N. I.; MACQUEEN, D. J. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. **Journal of Experimental Biology**, Transgênicos crescimento muscular, v. 214, n. 10, p. 1617–1628, 2011.
- KANEKO, M.; HERNANDEZ-BORSETTI, N.; CAHILL, G. M. Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 39, p. 14614–14619, 2006.
- KAWAKAMI, K. et al. Gal4 Driver Transgenic Zebrafish: Powerful Tools to Study Developmental Biology, Organogenesis, and Neuroscience. In: **Advances in Genetics**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 95p. 65–87.
- KAWAKAMI, K. Tol2: A versatile gene transfer vector in vertebrates. **Genome Biology**, v. 8, n. SUPPL. 1, p. 1–10, 2007.
- KAWAKAMI, K.; SHIMA, A.; KAWAKAMI, N. Identification of a functional transposase of the Tol2 element, an Ac-like element from the Japanese medaka fish, and its transposition in the zebrafish germ lineage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 21, p. 11403–11408, 2000.
- KOSURI, S.; CHURCH, G. M. Large-scale de novo DNA synthesis : technologies and applications. v. 11, n. 5, p. 499–507, 2014.
- KUHLMAN, S. J.; CRAIG, L. M.; DUFFY, J. F. Introduction to Chronobiology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. a033613, 2017.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Common features of circadian timekeeping in diverse organisms. **Current Opinion in Physiology**, v. 5, p. 58–67, 2018.

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

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.

LEDERBERG, J. Cell Genetics and Hereditary Symbiosis. **Physiological reviews**, v. 32, n. 4, p. 403–430, 1952.

LELE, Z.; KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**, v. 14, n. 1, p. 57–72, 1996.

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

MAMEDOV, T. G. et al. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. **Computational Biology and Chemistry**, v. 32, n. 6, p. 452–457, 2008.

MARELLI, F.; PERSANI, L. How zebrafish research has helped in understanding thyroid diseases. **F1000Research**, v. 6, n. 0, p. 2137, 2017.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, n. 1, p. 47–51, 2002.

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.

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.

MOHAWK, J. A.; GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S. Central and peripheral circadian clocks in mammals. **Annual review of neuroscience**, v. 35, p. 445–62, 2012.

MOORE, H. A.; WHITMORE, D. Circadian rhythmicity and light sensitivity of the zebrafish brain. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

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

NIKLAUS, S.; NEUHAUSS, S. C. F. Genetic approaches to retinal research in zebrafish.

**Journal of Neurogenetics**, v. 31, n. 3, p. 70–87, 2017.

PAGANO, C. et al. The Fish Circadian Timing System: The Illuminating Case of Light-Responsive Peripheral Clocks. In: KUMAR, V. (Org.). **Biol. Timekeep. Clocks, Rhythm. Behav.** New Delhi: Springer, New Delhi, 2017. p. 177–192.

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.

PLAUT, I.; GORDON, M. Swimming metabolism of wild-type and cloned zebrafish *brachydanio rerio*. **The Journal of experimental biology**, v. 194, n. 1, p. 209–23, set. 1994.

RAGHUPATHY, R.; PATNAIK, S.; SHU, X. Transgenic Zebrafish Models for Understanding Retinitis Pigmentosa. **Cloning & Transgenesis**, v. 02, n. 02, 2013.

RAMOS, B. C. R. et al. From blue light to clock genes in zebrafish ZEM-2S cells. **PLoS ONE**, fotorreceptores periféricos, v. 9, n. 9, p. 1–12, 2014.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; GALANO, A. Melatonin: Exceeding Expectations. **Physiology**, v. 29, n. 5, p. 325–333, 2014.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 935–941, 29 ago. 2002.

RIEDEL, K. H. J.; WINGFIELD, B. D.; BRITZ, T. J. Combined influence of magnesium concentration and polymerase chain reaction specificity enhancers. **FEMS Microbiology Letters**, v. 92, n. 1, p. 69–72, 1992.

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.

SIPOS, R. et al. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, n. 2, p. 341–350, 2007.

SLACK, G. S. et al. Optimising PCR reactions; remember magnesium? **Journal of clinical virology**, v. 52, n. 1, p. 63–4, 2011.

SOUSA, J. P. **Peixe-zebra (*Danio rerio*) transgênico para o gene *bmalla*: efeitos no relógio molecular do músculo esquelético**. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Biotecnologia. Universidade Federal da Paraíba. 2016.

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

ŚPIBIDA, M. et al. Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. **Journal of Applied Genetics**, v. 58, n. 1, p. 133–142, 2017.

STUART, G. W.; MCMURRAY, J. V.; WESTERFIELD, M. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos.

**Development (Cambridge, England)**, v. 103, n. 2, p. 403–12, 1988.

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

TACHINARDI, P. et al. A test of the circadian thermo-energetics hypothesis in a subterranean rodent: a laboratory and field approach. **Physiological and Biochemical Zoology**, p. 693003, 2017.

\_\_\_\_\_. Nocturnal to diurnal switches with spontaneous suppression of wheel-running behavior in a subterranean rodent. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 11–17, 2015.

TAMAI, T. K. et al. Flies and fish: Birds of a feather. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, n. 4, p. 344–349, 2003.

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, 11 set. 2007.

TOLOZA-VILLALOBOS, J.; ARROYO, J. I.; OPAZO, J. C. The Circadian Clock of Teleost Fish: A Comparative Analysis Reveals Distinct Fates for Duplicated Genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 80, n. 1, p. 57–64, 2014.

TONELLI, F. M. P. et al. Progress and biotechnological prospects in fish transgenesis. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 6, p. 832–844, 2017.

VANSTEENSEL, M. J.; MICHEL, S.; MEIJER, J. H. Organization of cell and tissue circadian pacemakers: A comparison among species. **Brain Research Reviews**, v. 58, n. 1, p. 18–47, 2008.

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**, Osciladores circadianos periféricos independentes gene clock, v. 1, n. 8, p. 701–707, 1998.

XIONG, A. et al. Chemical gene synthesis : strategies , softwares , error corrections , and applications. v. 32, p. 522–540, 2008.

ZANG, L.; MADDISON, L. A.; CHEN, W. Zebrafish as a Model for Obesity and Diabetes. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, n. August, p. 1–13, 2018.

ZHONG, Z. et al. Molecular Genetic and Genomic Analyses of Zebrafish Circadian Rhythmicity. In: KUMAR, V. (Org.). . **Biol. Timekeep. Clocks, Rhythm. Behav.** New Delhi: Springer, New Delhi, 2017. p. 193–209.

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.

## GLOSSÁRIO

<b>Anelamento</b>	Pareamento do primer à fita simples de DNA.
<b>Amplificação</b>	Adição de nucleotídeos pela DNA polimerase na reação de PCR.
<b>Vetor de expressão</b>	Vetores de clonagem que possuem todos os elementos genéticos que permitem a expressão de proteínas.
<b>Heliotrópico</b>	Organismo que orienta sua movimentação em resposta à luz do Sol.
<b>Teleósteos</b>	Grupo de peixes que possuem esqueleto ósseo, pertencentes à infra-classe Teleostei da classe Actinopterygii.
<b>Vetor de clonagem</b>	Molécula de DNA usada para introduzir o gene a ser clonado numa célula hospedeira apropriada.
<b>Template</b>	Fragmento de DNA de interesse adicionado na reação de PCR.
<b>Conteúdo GC</b>	Quantidade de pares de guanina (G) e citosina (C) em uma sequência de DNA.
<b>Amplicon</b>	Fragmentos amplificados por PCR.