



Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Fisiologia Animal Comparada

**Efeitos da Superexpressão do Hormônio de Crescimento (GH) e seu
Receptor (GHR) Sobre as Respostas ao Ciclo Claro-Escuro em *Zebrafish*
(*Danio rerio*).**

Bruno Pinto Cruz

Tese defendida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR em Fisiologia Animal Comparada.

Orientador: Dr. Luiz Eduardo Maia Nery

Co-orientador: Dr. Luis Fernando Marins

Rio Grande, Dezembro de 2013

**Este trabalho é dedicado à minha Mãe, ao meu Pai e ao meu Irmão,
que são as pessoas que mais amo em minha vida!**

Agradecimentos

1 Agradeço acima de tudo a minha família, meu ao Pai, Luiz Fernando
2 Prado Cruz, à minha Mãe, Marilda Pinto Cruz, e ao meu Irmão, Rafael Pinto
3 Cruz, por todo o carinho, cuidado e atenção que sempre tiveram comigo.
4 Obrigado por todo amor que recebi ao longo de minha vida e por me darem
5 sempre a certeza de que tenho um lugar para chamar de Lar, meu porto
6 seguro. Amo vocês!

7 A minha namorada, Cristiane Ferras Bolicó Rodrigues da Silva, minha
8 Preta, acima de tudo pelo companheirismo, amizade, amor e por ter segurado
9 minha mão e nunca ter desistido de mim, mesmo quando até eu já tinha
10 desistido. Teu amor é a cola que nos mantém juntos e me mantém em pé.
11 Mesmo depois de eu ter me partido em milhares de pedaços tu procuraste e
12 recuperaste, até hoje recuperas, caquinho por caquinho. Te amo minha
13 Pretinha!

14 Agradeço ao meu Amigo, mais que irmão, Luiz Gustavo Moita Lema
15 Garcia, por sempre ter me dado a certeza de que JAMAIS ficarei sem pelo
16 menos UM AMIGO, não importa o tamanho da m... que eu faça!!! Mano, o
17 tempo pode passar e a distância nos afastar por anos, mas sempre que nos
18 encontramos parece que foi ontem que nos falamos pela última vez.

19 Agradeço ao outro Gustavo de minha vida, Gustavo Richter Vaz, por
20 estar sempre presente e por me provar, mais uma vez, que uma grande
21 amizade resiste ao tempo mesmo que, por vezes, nossos caminhos se
22 afastem. Irmão, com certeza não só a minha vida e a da Preta, mas a de todos

1 a quem tu cativas, seriam muito mais vazias sem tua parceria. Não sei imaginar
2 um fim de semana sem nossa tradicional “janta de domingo” na companhia do
3 amigo.

4 Ao meu amigão Guilherme Granada que me provou que, por mais que a
5 vida nos endureça e nos torne desconfiados, nunca devemos fechar as portas
6 ao que pode vir a ser uma grande amizade. Obrigado pela amizade, parceria e
7 por ser esta pessoa sempre solícita, independentemente de quem precise de ti.
8 Tens um coração grande, que a vida nunca permita que percas essa qualidade!
9 Ah! E Obrigado por emprestar o notebook para os experimentos de
10 comportamento!!!

11 Aos meus sogro e sogra, João e Elenice, por permitirem a entrada do
12 “estranho no ninho”, e por sempre estarem presentes, facilitando e
13 incentivando uma vida junto ao bem mais precioso deles, a minha Preta.
14 Obrigado por me conceder um segundo lar, por permitirem amar a filha de
15 vocês e, acima de tudo, por acreditarem que sou capaz de fazer isso.

16 Agradeço as “Caróis” Peixoto e Batista, não só por terem feito o “meio
17 campo” com minha Preta, mas pela grande amizade. Obrigado por terem
18 entrado na minha vida e saber que sempre que eu precisar sei onde encontrar
19 uma palavra de conforto e um abraço carinhoso. Isso vale pra ti também
20 Maiara Marques!!!

21 Fábio Maciel... Meu amigo, meu mentor, minha... Banca?! Além de um
22 grande amigo és um exemplo de ponderação e objetividade que sempre levarei
23 comigo para toda a vida (juro que eu tento). Obrigado por sempre ter me

1 apoiado meu irmão, não sei o rumo que eu teria tomado profissionalmente se
2 não fosse tua amizade e incentivo.

3 Ao Ian Amaral, meu amigo, minha... Banca também?! Obrigado meu
4 velho, por me fazer acreditar que grandes amizades surgem quando, e de
5 onde, a gente menos espera. Por mais breve que tenha sido tua passagem
6 aqui pela terrinha, tenho certeza que ganhei uma amizade para o resto da vida.

7 Aos amigos Fred, Márcio e Dani, por jamais terem se afastado, mesmo
8 que eu me afastasse, por jamais terem me considerado só um colega de
9 trabalho e por estarem presentes no momento em que achei que ninguém mais
10 iria me estender a mão ao fim desta jornada de minha vida. Obrigado por
11 serem, acima de tudo, MEUS AMIGOS!

12 Agradeço a Glaucio Magalhães Sequeira, amigo da família de longa data
13 por ter emprestado a câmera usada nos experimentos de comportamento!!
14 Salvou minha tese meu velho, com esse simples gesto!

15 Ao professor Euclides dos Santos Filho e à professora Juliana Sandrini,
16 não só por aceitarem o convite para integrarem minha banca avaliadora, mas
17 também por serem exemplos de profissionalismo e inspiração à todos aqueles
18 que anseiam um lugar na vida acadêmica.

19 A Bruno da Silva Brandão Gonçalves pelas importantes contribuições
20 feitas nesta Tese e por ter sido sempre solícito a um completo estranho que
21 precisava de ajuda na outra ponta do país. Obrigado meu caro!

1 Ao professores Luiz Eduardo Maia Nery e Luis Fernando Marins que
2 sempre estiveram com as portas de suas salas abertas para mim, por mais que
3 eu me afastasse da vida acadêmica, entre um tropeço meu e outro, nunca me
4 deram as costas ou me negaram o dons mais precisos deles: O Conhecimento
5 e a Sabedoria. Obrigado meus mestres!

6 Agradeço aos órgãos de fomento, CAPES e CNPq, que financiaram a
7 bolsa de pesquisa e os custos da Tese desenvolvida.

Sumário

Resumo Geral	9
1. Introdução	11
1.1 Ritmos Biológicos.....	11
1.2 Ajuste dos Ritmos Biológicos	13
1.3 Localização dos Relógios Biológicos	14
Figura 1.....	15
1.4 Maquinário Intracelular do Relógio Circadiano	17
Figura 2.....	18
Figura 3.....	21
1.5 Relógios Biológicos Periféricos – Panorama Geral	21
1.6 Relógios Biológicos em Peixes	23
1.6.1 Localização dos Relógios Biológicos em Peixes	23
1.6.2 Maquinário Intracelular do Relógio Circadiano em Peixes.....	24
1.6.3 Relógios Biológicos Periféricos em Peixes	26
1.7 Ritmos Comportamentais e Fisiológicos	28
1.7.1 Ritmos Comportamentais e Fisiológicos – Panorama Geral.....	28
1.7.2 Ritmos Comportamentais e Fisiológicos em Peixes	30
1.7.2.1 Ritmos de Atividade Locomotora em Peixes.....	30
1.7.2.2 Ritmos Fisiológicos em Peixes.....	33
2. Objetivo	40
3. Capítulo I	41
Artigo 1	41
Abstract.....	42
Introduction.....	43
Material and Methods	47
Results.....	50
Discussion	53
Acknowledgements.....	58
Figure Captions	59
Figures.....	60
References	63
4. Capítulo II	72
Artigo 2	72

Abstract.....	73
Introduction.....	74
Material and Methods	77
Results.....	81
Discussion	84
Acknowledgements.....	89
Figure Captions	90
Figures.....	92
References	96
5. Discussão Geral	104
6. Referências Gerais.....	110

1 **Resumo Geral**

2 O sistema circadiano de *zebrafish* (*Danio rerio*), também conhecido por
3 *paulistinha*, pode ser ajustado por uma série de pistas ambientais tais como
4 temperatura, disponibilidade de alimento e, principalmente, a luz. Nesta
5 espécie, diferentes padrões de atividade comportamental em resposta a
6 diferentes *Zeitgebers* já foram documentados, além de diferentes padrões de
7 expressão de genes envolvidos nas alças de retroalimentação do sistema
8 circadianos em diferentes tecidos. No presente estudo, foi verificado se animais
9 geneticamente modificados, superexpressando o hormônio de crescimento
10 (GH), o seu receptor (GHR) ou ambos no mesmo indivíduo (GH/GHR),
11 estariam sofrendo alterações na resposta à luz, o principal *Zeitgeber* para
12 *paulistinha*, tanto em nível molecular, através da verificação dos níveis de
13 expressão dos genes do relógio em tecido muscular esquelético, quanto em
14 nível comportamental, através da avaliação do comportamento de atividade
15 locomotora ao longo do ciclo claro-escuro. Os animais GH e GHR-transgênicos
16 apresentaram diminuição na expressão dos parálogos do gene *clock*, na alça
17 positiva, e do gene *per*, na alça negativa, em geral nos horários em que
18 estudos prévios demonstraram seus picos de expressão. Estas diferenças
19 apontam para uma possível diminuição da amplitude na expressão destes
20 genes ao longo do ciclo claro-escuro. Além disso, ensaios comportamentais
21 submetendo animais à fotoperíodo 12C:12E e a pulsos de luz no meio da fase
22 escura revelaram uma atividade locomotora mais elevada durante o período de
23 descanso dos animais GH/GHR-transgênicos com conseqüente diminuição da
24 amplitude desta característica comportamental ao longo do ciclo claro-escuro.
25 Este fator evidencia, também, um possível efeito sinérgico de ambos, o

1 excesso de GH e seu receptor, quando superexpressos em um mesmo
2 indivíduo. O presente estudo demonstrou que estes animais apresentam
3 alterações, tanto em nível molecular quanto em nível comportamental,
4 provavelmente devido à uma ação direta do GH sobre o metabolismo destes
5 animais ou sobre as vias de sinalização que controlam a expressão de genes
6 do sistema circadiano, fazendo com que a resposta a luz esteja comprometida.

1 1. INTRODUÇÃO GERAL

2 1.1. RITMOS BIOLÓGICOS

3 Estímulos ambientais como temperatura, salinidade, luminosidade, entre
4 outros, fazem com que os animais respondam regulando suas funções
5 fisiológicas. Todos estes fatores podem gerar aos organismos uma noção de
6 tempo. Ao longo da evolução, os organismos que melhor se adaptaram às
7 variações ambientais foram aqueles que, de diferentes maneiras, conseguiram
8 acompanhar os fenômenos rítmicos da natureza, de forma a antecipá-los.
9 Portanto, as oscilações periódicas regulares do meio ambiente parecem ter tido
10 um papel importante na organização dos seres vivos. Estas adaptações, as
11 quais ocorrem de forma rítmica, são observadas em praticamente todos os filos
12 de organismos, desde seres unicelulares até mamíferos, e ocorrem de maneira
13 cíclica, com intervalo de tempo definido, sendo denominados Ritmos
14 Biológicos, os quais são ajustados periodicamente por estímulos ambientais, e
15 até mesmo endogenamente gerados pelos próprios organismos, através dos
16 chamados Relógios Biológicos ou Osciladores (para revisão ver Marques *et al.*,
17 1989).

18 Os diversos ciclos ambientais que são capazes de sincronizar o período
19 e a fase dos osciladores internos (relógios biológicos) são chamados de
20 *Zeitgeber* ou Arrastadores (Aschoff, 1960). Quando animais de diversas
21 espécies são mantidos isolados de pistas ambientais e sociais, eles não
22 perdem a ritmicidade de seus ciclos, mantendo um período constante, porém
23 levemente diferente do período ambiental ou social, os quais podem perdurar
24 por semanas ou até mesmo anos, sendo esta característica denominada de

1 livre-curso (Aschoff 1984, Czeisler & Klerman 1999). Quando o organismo
2 encontra-se sob esta condição, um determinado ritmo expressa o período
3 intrínscico (τ) do oscilador responsável pelo seu controle, sendo este
4 período sempre um pouco diferente do período do ciclo ambiental. Somente
5 quando os animais são submetidos a ciclos ambientais, sejam eles de luz ou
6 sociais, os osciladores internos têm seu período ajustado através do processo
7 denominado de arrastamento, fazendo com que o oscilador fique ajustado bem
8 próximo aos ritmos ambientais (Mrosovsky *et al.* 1989, Pittendrigh, 1993).
9 Diversos fatores ambientais, desde que sejam cíclicos, podem atuar como
10 *Zeitgeber*. O mais conhecido agente arrastador para os seres vivos é a
11 alternância proveniente do ciclo claro-escuro, correspondente a sucessão dos
12 dias e noites. Os ritmos biológicos com período de aproximadamente 24 horas,
13 ou seja, aqueles sincronizados, principalmente, pelo ciclo claro-escuro
14 ambiental são chamados Ritmos Circadianos (para revisão ver Dunlap *et al.*,
15 2004).

16 Porém, os seres vivos estão expostos a muitos outros ciclos ambientais,
17 além do ciclo luz/escuro (Ritmo Circadiano), com periodicidades muito
18 diferentes, e podem exibir, para cada um deles, capacidades de ajustes
19 também diferentes. As flutuações regulares da gravitação lunar, por exemplo,
20 geram ciclos de aproximadamente 12 horas, que regem as marés (Ritmo
21 Mareal), ou os de aproximadamente 15 dias, correspondentes à lua nova e
22 cheia. O ciclo lunar gera ainda outro ritmo, de aproximadamente 28 dias (Ritmo
23 Lunar), cuja característica principal é a iluminação noturna proporcionada pela
24 lua cheia, a qual influencia, por exemplo, a predação e forrageamento (Daly *et*
25 *al.*, 1992; Brown, 1999). Ainda existem os ciclos anuais que são gerados pela

1 posição da Terra em relação ao Sol dando origem as estações do ano com um
2 período de aproximadamente de 365 dias (Ritmos Anuais e Sazonais) (Haus e
3 Halberg, 1970, Haus *et al.*, 1984; Hofman, 2004; Lincoln, 2006; Dixit e
4 Sougrakpam, 2013).

5 **1.2 AJUSTE DOS RITMOS BIOLÓGICOS**

6 Cada espécie está sujeita a ação simultânea de diversos *Zeitgeber*.
7 Além da iluminação já foi observado, em mamíferos, que outros fatores atuam
8 como *Zeitgebers*. Um exemplo bem consolidado é a disponibilidade de
9 alimento no ambiente, qual se dá de forma cíclica (Stephan, 2002; O'Reilly *et*
10 *al.*, 1986; Zielinski, 1986; Boulos *et al.*, 1989; Kennedy *et al.*, 1990; Jilge, 1992;
11 Juárez *et al.*, 2012; Ware *et al.*, 2012; Zhdanova *et al.*, 2012). Existem indícios
12 de que a temperatura, apesar de atuar como um agente arrastador fraco,
13 também atua em algum nível no ajuste (Pohl, 1998; Rajaratnam e Redman,
14 1998; Hut *et al.*, 1999) ou na modulação do ritmo circadiano de mamíferos
15 (Refinetti, 2010). Nos seres humanos, o ciclo de iluminação é um importante
16 *Zeitgeber*, mas outros fatores cíclicos, decorrentes da organização social do
17 trabalho e do lazer, também são importantes estímulos, sendo denominados de
18 ritmos sociais (Marques e Menna-Barreto, 1997). A interação destes vários
19 ritmos constitui o padrão temporal de uma espécie (Marques e Menna-Barreto,
20 1997).

21 No cerne destes ajustes das atividades biológicas dos organismos,
22 principalmente em resposta aos ciclos claro-escuro, existe um fator evolutivo, o
23 qual provavelmente culminou na geração de um relógio endógeno, auto-
24 sustentável, com periodicidade de aproximadamente 24 horas que orchestra os

1 ritmos dos organismos e os sincroniza conforme a localidade geográfica
2 (Dunlap, 2004). Isso ocorre em consequência de os relógios circadianos
3 regularem uma extraordinária cadeia de células e sistemas fisiológicos em
4 vários organismos, possibilitando ajustes para o ciclo de 24 horas de claro-
5 escuro na Terra.

6 Em peixes, a maioria das espécies estudadas apresenta ritmos de
7 atividade locomotora e forrageamento os quais apresentam maior atividade no
8 período diurno ou noturno, dependendo da espécie (Reebs, 2002). Além disso,
9 algumas espécies apresentam comportamento dual, o qual consiste de
10 mudanças no padrão diário, mudando de diurno para noturno e vice-versa ao
11 longo do ciclo de vida (López-Olmeda e Sánchez-Vázquez, 2010). A atividade
12 locomotora e de forrageamento normalmente tem origem endógena, uma vez
13 que persistem quando os peixes são isolados de pistas externas. Além disso, o
14 comportamento de forrageio é estimulado por um oscilador direcionado por
15 alimento o qual parece estar acoplado ao oscilador estimulado pela luz
16 (Sánchez-Vázquez e Madrid, 2001).

17 **1.3. LOCALIZAÇÃO DOS RELÓGIOS BIOLÓGICOS**

18 Nos vertebrados, principalmente mamíferos, vários ritmos circadianos já
19 foram vistos e estudados tais como vigília-sono, atividade locomotora,
20 alimentação, termorregulação, entre outros (Underwood, 1981; Mayer *et al.*,
21 1997; Lumineau *et al.*, 2002; Lutterschmidt *et al.*, 2003). Estes ritmos são
22 sincronizados por grupos de células autônomas que formam discretos marca-
23 passos que regulam a expressão de ritmos em uma diversa gama de tecidos
24 em espécies com características e fases específicas. Estes grupos de células

1 formam o relógio biológico circadiano, o qual recebe a informação de variação
2 na luminosidade captada pelos fotorreceptores da retina (Figura 1).

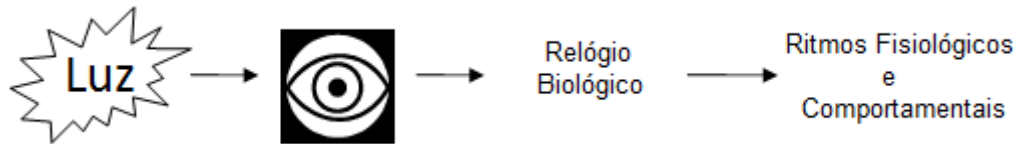


Figura 1: Modelo de mecanismo de arrastamento do ritmo circadiano de fenômenos fisiológicos e comportamentais. A luz estimula um fotorreceptor que por sua vez irá ativar células do relógio biológico que irão controlar processos fisiológicos e comportamentais ajustando-os para um período de aproximadamente 24 horas.

3 O núcleo supra-quiasmático (NSQ), localizado na porção ventral do
4 hipotálamo anterior, é o marca-passo circadiano central dos mamíferos e as
5 células que compõem esta estrutura são autônomas, uma vez que já foi
6 observado ritmo circadiano de atividade elétrica de membrana nas
7 concentrações intracelulares de Ca^{2+} , da atividade mitocondrial e da expressão
8 gênica em células isoladas do NSQ (Hastings and Herzog, 2004; Moore *et al.*,
9 2002). O NSQ é composto por vários subconjuntos de neurônios pequenos e
10 densos (aproximadamente 10.000 por núcleo) nos quais diferentes peptídeos
11 são sintetizados (Van den Pol *et al.*, 1992). A comunicação do NSQ com outras
12 partes do sistema nervoso central se dá a partir de projeções neuronais, sendo
13 que as duas principais subdivisões do NSQ, a região dorso-medial, a qual
14 expressa arginina vasopressina (AVP), e a região ventrolateral, a qual expressa
15 o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (Moore *et al.*, 2002). Além disso, a
16 sinalização via VIP e seu receptor (VAPC₂) poder ser um importante fator na
17 sustentação de um acoplamento robusto entre os neurônios do NSQ e a
18 manutenção da sincronização temporal em nível molecular em neurônios

1 individuais do NSQ (Aton *et al.*, 2005), uma vez que animais nocauteados para
2 estes peptídeos perdem sincronia interneuronal (Maywood *et al.* 2006) e
3 também apresentam ritmos de produção de corticosteróides e estrais
4 dessincronizados, os quais são conseqüentemente acompanhados por
5 mudanças na expressão gênica circadiana em tecidos periféricos (Dolatshad *et*
6 *al.* 2006, Sheward *et al.* 2007). Além disso, as células do NSQ são acopladas
7 através de uma comunicação intracelular via sinalização GABAérgica (Liu e
8 Reppert, 2000). A informação gerada pelo NSQ é transmitida para outros
9 tecidos e órgãos, principalmente pela glândula pineal via sistema nervoso
10 simpático, modulando a síntese da melatonina. Esta molécula ingressa na
11 corrente sanguínea se distribuindo pelo organismo e informando o período
12 circadiano às células alvo (Ganguly *et al.*, 2002).

13 Estudos clássicos mostram que a interrupção da comunicação do NSQ
14 culmina com abolição dos ritmos de quase todos os processos fisiológicos,
15 como a secreção de hormônios, e comportamentais, como a atividade
16 locomotora (Moore *et al.*, 1972; para revisão ver Antle *et al.*, 2005). Re-
17 implantes de NSQ em animais com a estrutura previamente removida
18 restabeleceram o ritmo de atividade locomotora (Aguilar-Roblero *et al.*, 1994).
19 Essa recuperação da ritmicidade pode ser direcionada por fatores liberados
20 pelo NSQ, os quais irão atuar em seus respectivos receptores no hipotálamo
21 periventricular para inibir a atividade locomotora (Kramer *et al.*, 2001; Cheng, *et*
22 *al.*, 2002; Kraves *et al.* 2006).

23 Além disso, curiosamente alguns estudos relataram que, quando se
24 lesionava ou até mesmo se retirava o NSQ de ratos, alguns ritmos em tecidos

1 específicos ainda eram observados por algum tempo. Este fato postulou a
2 existência de “relógios periféricos” capazes de gerar uma oscilação circadiana
3 mesmo sem a influência do relógio mestre.

4 **1.4. MAQUINÁRIO INTRACELULAR DO RELÓGIO CIRCADIANO**

5 Os relógios circadianos, como mencionado anteriormente, geram os
6 ritmos circadianos mesmo na ausência de estímulos ambientais (ciclo claro-
7 escuro, principalmente), fato que é possível devido à existência de alças de
8 retro-alimentação positiva e negativa envolvendo transcrição gênica e produção
9 de proteínas específicas (Hastings, 2000), as quais funcionam como as
10 engrenagens de um relógio mecânico. Estas proteínas interagem umas com
11 as outras de maneira intrincada e geram oscilações na expressão gênica. A
12 geração e manutenção da função do relógio circadiano dependem da
13 expressão de genes de relógio, e seus produtos protéicos, envolvidos em alças
14 de retroalimentação auto-regulatórios os quais consistem de elementos
15 positivos e negativos (Hastings, 2000). Apesar dos genes envolvidos nesse
16 mecanismo às vezes serem diferentes de organismo para organismo (para
17 revisão ver Young e Kay, 2001), de maneira geral, a ativação inicial de um
18 gene é regulada pelo outro, apresentando ciclos de aproximadamente 24
19 horas, onde elementos positivos ativam a expressão de elementos negativos
20 que, em troca, cessam a expressão dos elementos positivos (Figura 2). Esta
21 maquinaria de genes e proteínas, aparentemente tem se conservado ao longo
22 da evolução, pois a maioria deles ocorre tanto nos invertebrados como nos
23 vertebrados (Looby e Loudon, 2005).

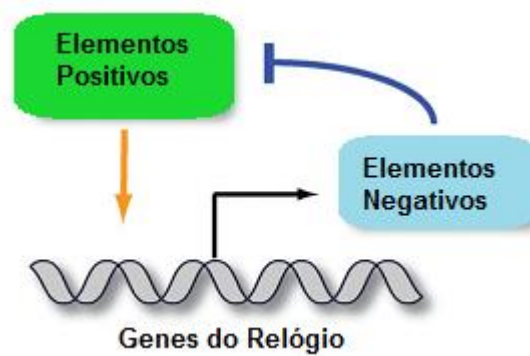


Figura 2: Princípio geral das alças autorregulatórias de retroalimentação presentes nas células do relógio circadiano.

1 Em mamíferos, o relógio circadiano é composto por duas alças
 2 regulatórias de retroalimentação (Figura 3). Na primeira (linhas azuis), dois
 3 ativadores de transcrição, Bmal1 (brain and muscle ARNT-like protein 1) e
 4 Clock (ou Npas no caso de tecido neuronal) formam heterodímeros no
 5 citoplasma e migram para o núcleo para se ligar aos promotores dos genes *per*
 6 (*Period*) e *cry* (*Cryptochrome*) e respectivas isoformas, induzindo a expressão
 7 destes. Várias combinações de dímeros das proteínas PER e CRY ocorrem no
 8 citoplasma as quais migram para o núcleo e inibem a ativação dos dímeros
 9 protéicos BMAL1/CLOCK ou BMAL/NPAS. Sem a ativação da transcrição dos
 10 genes de *per* e *cry*, os níveis de transcrição das proteínas resultantes
 11 começam a cair fazendo com que *per* e *cry* cessem sua própria transcrição
 12 (para revisão ver Ko e Takahashi, 2006).

13 Uma segunda alça regula a expressão do gene Bmal1. No núcleo, os
 14 heterodímeros BMAL/CLOCK ou BMAL/NPAS se ligam aos promotores de
 15 genes que codificam para os receptores nucleares órfãos relacionados ao
 16 ácido retinóico ROR α e REV-ERB α , os quais competem pelo elemento ROR
 17 (RORE) no promotor de Bmal1. ROR α ativa enquanto REV-ERB α inibe a

1 expressão de Bmal1 e, como consequência, as oscilações de Bmal1 e Rora/
2 Rev-erba ficam fora de fase, uma vez que as proteínas ROR α e REV-ERB α se
3 acumulam ao longo do dia circadiano (Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004).
4 Se a ativação supera a inibição, a expressão Bmal1 é induzida e a proteína é
5 produzida, a qual forma heterodímeros no citoplasma com CLOCK ou NPAS
6 (De Bruyne *et al.*, 2007). Consequentemente, estes heterodímeros migram
7 para o núcleo e iniciam o próximo ciclo de ambos os loops.

8 A ativação da transcrição da alça positiva é facilitada pela capacidade da
9 proteína CLOCK de atuar como uma acetil-transferase (HAT – Histone Acetyl
10 Transferase), uma vez que, a acetilação promove uma modificação das
11 histonas permitindo o desenrolamento da cromatina e, conseqüentemente,
12 permitindo acesso ao maquinário de transcrição. Essa capacidade da proteína
13 CLOCK é necessária para a ativação da transcrição dos genes *Per* e *Cry* e,
14 portanto, parece ser essencial na geração e manutenção dos ritmos endógenos
15 de mamíferos. A repressão da transcrição ocorre quando o complexo
16 PER/CRY se liga ao dímero CLOCK/BMAL1 resultando em perda da
17 capacidade de atuar como acetil-transferase da CLOCK, através da
18 fosforilação desta proteína, e/ou induzindo uma mudança conformacional no
19 complexo CLOCK/BMAL1. Após a degradação de PER e CRY, a proteína
20 CLOCK é desfosforilada ou degradada e sintetizada novamente para interagir
21 novamente com Bmal1 e dar início a um novo ciclo de transcrição.

22 A fosforilação e desfosforilação de proteínas são mecanismos
23 amplamente utilizados para regular a estabilização, atividade e estrutura de
24 proteínas em diversos processos biológicos tais como a transdução. Sendo

1 assim, a fosforilação e desfosforilação da proteína PER, e isoformas, é crucial
2 na determinação do comprimento do período. A proteína caseína-quinase 1 ϵ
3 ou δ (CK1 ϵ/δ), por exemplo, faz com que a proteína PER2 seja degradada, ou
4 estabilizada para interagir com as proteínas CRY e migrar para o núcleo onde
5 vão interferir nos complexos BMAL1/CLOCK ou BMAL1/NPAS) (para revisão
6 ver Albrecht, 2007). Considerando a proteína CRY, esta provavelmente é
7 regulada pelo mesmo mecanismo. A quantidade de CRY é regulada por uma
8 proteína, FBXL3, a qual é uma ubiquitina que reconhece alvos para
9 degradação por proteossomo (Busino *et al.*, 2007; Godinho *et al.*, 2007; Siepka
10 *et al.*, 2007). Após a interação entre Cry e Fbxl3, a proteína Cry é degradada
11 pelo proteossomo. Sendo assim, parece que os osciladores circadianos são
12 ajustados por uma delicada taxa de proteínas Cry e Per, as quais têm os níveis
13 regulados por fosforilação e ubiquitinização. Se a abundância relativa destas é
14 alterada, conseqüentemente o oscilador circadiano também é alterado (Oster *et*
15 *al.*, 2003).

16 A expressão de ritmos circadianos é coordenada também pela
17 expressão de outro conjunto de genes chamados genes controlados pelo
18 relógio (CCGs; *do inglês Clock-controlled genes*) (Hastings *et al.*, 2003;
19 Dardente *et al.*, 2004). Alguns destes genes são expressos ritmicamente em
20 fase com Per e Cry e são considerados como “outputs” moleculares do
21 mecanismo de relógio central. Destes genes, os mais notáveis são aqueles
22 codificando para peptídeos no NSQ tais como o AVP (Hastings *et al.*, 2003), o
23 fator de transcrição proteína D ligante em albumina (Dbp). O último é altamente
24 rítmico com uma amplitude semelhante à do gene Per1 e sua expressão não é
25 influenciada diretamente pela luz (Lopez-Molina *et al.*, 1997).

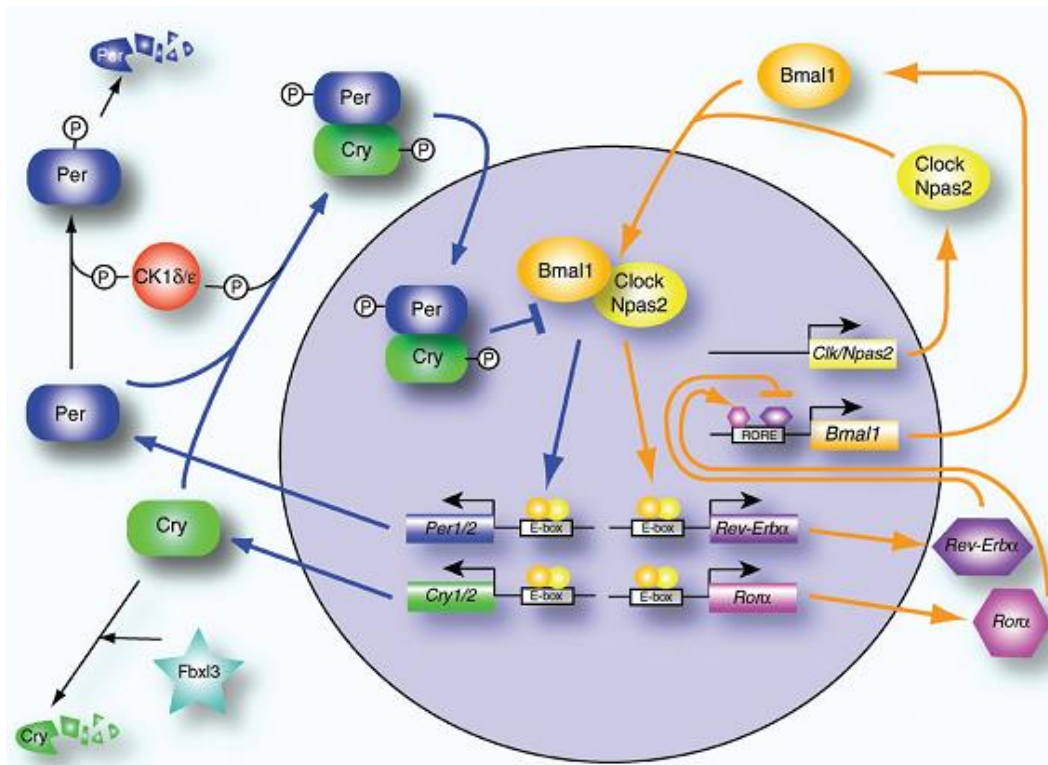


Figura 3: Esquema geral do maquinário intracelular do relógio circadiano de mamíferos indicando as alças positiva (amarelo) e negativa (azul). Maiores detalhes ver texto. Fonte: Albrecht e Ripperger, 2008.

1 1.5 RELÓGIOS BIOLÓGICOS PERIFÉRICOS – PANORAMA GERAL

2 Subseqüentemente a descoberta de diversos genes de relógio de
 3 mamíferos e ao uso de ferramentas de biologia molecular, a presença de
 4 relógios circadianos em tecidos periféricos e em outras regiões do cérebro, fora
 5 do NSQ, foi também demonstrada (Abe *et al.*, 2002; Balsalobre, 2002; Schibler
 6 *et al.*, 2003). A expressão circadiana de genes de relógio já foi observada no
 7 fígado, coração, músculo, rins, pâncreas, tecido adiposo e pulmões de
 8 mamíferos (Balsalobre, 2002; Schibler *et al.*, 2003; Muhlbauer *et al.*, 2004;
 9 Zvonic *et al.*, 2006). Além disso, foi observada a expressão gênica com padrão
 10 circadiano do gene *per*, e de outros fatores de transcrição, em fibroblastos de
 11 ratos e camundongos quando estas células eram estimuladas com altas

1 concentrações de plasma de diferentes espécies (Balsalobre *et al.*, 1998).
2 Assim como o NSQ exibe a expressão de CCGs, os relógios periféricos
3 modulam diretamente alguns destes genes (Oishi *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*,
4 2004). A expressão de alguns genes varia de maneira circadiana nos tecidos
5 periféricos, tais como o fígado e o coração (Yamamoto *et al.*, 2004). Por
6 exemplo, Dbp é um CCG que controla a expressão circadiana de diversas
7 enzimas digestivas no fígado, as quais são relevantes para o metabolismo
8 (Lavery *et al.*, 1999). Uma característica importante dos relógios periféricos de
9 mamíferos é que suas oscilações se mostravam ser amenizadas rapidamente e
10 sua expressão gênica circadiana era atrasada comparada a expressão gênica
11 observada no NSQ (Abe *et al.*, 2002; Balsalobre, 2002; Yamazaki *et al.*, 2000).
12 Contudo, foi demonstrado em ratos que as oscilações circadianas do gene
13 Per2 são mantidas em diversos tecidos periféricos durante vários dias,
14 independentemente da estimulação gerada pelo NSQ (Yoo *et al.*, 2004). Ratos
15 que tiveram o NSQ extirpado apresentam ritmicidade nos tecidos periféricos,
16 mas estes não funcionam de maneira coordenada e apresentam suas fases
17 diferindo amplamente de tecido para tecido (Yoo *et al.*, 2004).

18 Além disso, alguns estudos já demonstraram ritmos de genes de relógio
19 em outras regiões cerebrais (Abe *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2004; Granados-
20 Fuentes *et al.*, 2004; Inouye *et al.*, 1979; Lamont *et al.*, 2005; Yamazaki *et al.*,
21 1998). Curiosamente, algumas destas estruturas são capazes de sustentar a
22 ritmicidade por alguns dias, independentemente do NSQ (Abe *et al.*, 2002;
23 Granados-Fuentes *et al.*, 2004). Os alças moleculares que geram as oscilações
24 circadianas em células periféricas têm sido parcialmente caracterizadas e são
25 similares àqueles observadas no NSQ. Contudo, osciladores do cérebro em

1 regiões fora do NSQ parecem usar fatores de transcrição homólogos ao
2 CLOCK, o qual já foi mencionado ser um importante componente do NSQ
3 (Rutter *et al.*, 2001). Sendo assim, os dados mencionados acima levam a crer
4 que, mesmo que alguns destes osciladores circadianos, dentro ou fora do
5 cérebro, precisem de estímulo advindo do NSQ para sustentar sua ritmicidade,
6 fazendo com que o NSQ atue como um relógio mestre (Albrecht e Eichele,
7 2003), estes relógios biológicos periféricos podem ser ajustados por outras
8 pistas, independentemente do NSQ.

9 **1.6 RELÓGIOS BIOLÓGICOS EM PEIXES**

10 *1.6.1 Localização dos relógios biológicos em peixes*

11 Em mamíferos, o papel do NSQ como o relógio central que coordena os
12 ritmos biológicos dos relógios periféricos parece estar bem estabelecido.
13 Considerando outros vertebrados, como os peixes, tem sido demonstrado que
14 a glândula pineal atua como um órgão fotorreceptivo central, na interpretação da
15 luz como uma evidência da passagem do tempo, regendo a secreção rítmica
16 de melatonina através de um maquinário de osciladores circadianos (Cahill,
17 2002). Contudo, o papel da pineal tem sido intensamente questionado e seu
18 papel como um marca-passo central ainda não foi totalmente esclarecido, uma
19 vez que já foi identificada a expressão de genes de relógio em uma série de
20 tecidos periféricos (Amaral e Johnston, 2012; Kaneko *et al.*, 2006; Velarde *et*
21 *al.*, 2009). Apesar da pineal de teleósteos ter um sistema capaz de gerar ritmos
22 de forma autônoma, alguns estudos já demonstram a participação do NSQ na
23 manutenção da ritmicidade circadiana no cérebro de embriões e larvas de
24 peixes (Noche *et al.*, 2011), sugerindo a participação da estrutura, em algum

1 nível, sobre o controle do ritmo circadiano de teleósteos. Esta suspeita foi
2 primeiramente levantada quando o NSQ foi identificado em *zebrafish*, baseado
3 na estrutura anatômica e nas características fisiológicas, tais como a expressão
4 da enzima tirosina-hidroxilase, envolvida na produção de dopamina, e do
5 neuropeptídeo vasopressina, previamente observadas em mamíferos (Burril e
6 Easter, 1994; Filippi *et al.*, 2010; Rink e Wullimann, 2004).

7 1.6.2 Maquinário intracelular do relógio circadiano em peixes.

8 Os mecanismos moleculares por trás da geração de ritmos circadianos
9 em peixes parecem ter muito em comum com o sistema já amplamente
10 estudado de mamíferos. Porém, existem algumas diferenças as quais merecem
11 uma atenção mais detalhada. Grandes avanços têm sido realizados através do
12 consagrado modelo biológico *zebrafish* (*Danio rerio*). Neste animal,
13 provavelmente eventos os quais ocasionaram duplicação do genoma levaram a
14 uma condição de existência de várias cópias de genes nesta espécie quando
15 comparados a ratos (Postlethwait *et al.*, 1998). Conseqüentemente, conforme
16 foram sendo ampliados os estudos nesta espécie, diversos parálogos de genes
17 do relógio circadiano foram sendo identificados, como no caso do gene *cry*,
18 com 6 parálogos (Kobayashi *et al.*, 2000).

19 De maneira geral, o mecanismo responsável pela geração de padrões
20 rítmicos em peixes funciona, basicamente, como o apresentado na Figura 2,
21 onde elementos positivos ativam a expressão de elementos negativos e estes,
22 por sua vez, inibem ou cessam a expressão dos primeiros. Três parálogos do
23 gene *clock* (atualmente chamadas de *clock 1a*, *clock 1b* e *clock 2*) e três
24 parálogos de *Bmal* (*Bmal 1a*, *Bmal 1b* e *Bmal 2*) já foram identificadas em

1 *paulistinha* sendo capazes de formar heterodímeros em diversas combinações
2 entre as seis proteínas resultantes (Wang, 2008; Wang, 2009; Hirayama *et al.*,
3 2003; Ishikawa *et al.*, 2002). Estes heterodímeros possuem diferentes
4 eficiências e capacidades de ativação da transcrição e são inibidos por
5 proteínas resultantes da expressão dos parálogos do gene *cry*. Além disso,
6 diferentemente do que é observado em mamíferos, no qual a expressão de
7 RNA dos parálogos do gene *bmal* apresenta perfil rítmico, o primeiro parálogo
8 dos genes do relógio identificada em *paulistinha*, *clock 1a*, apresenta um
9 padrão de expressão que acompanha, juntamente com os outros parálogos de
10 *clock*, o padrão observado para os parálogos de *bmal*. Estes foram os
11 primeiros indícios de diferenças significativas, no que diz respeito ao sistema
12 de retroalimentação do mecanismo do relógio central, entre mamíferos e peixes
13 (Cermakian *et al.*, 2000; Shearman *et al.*, 1999; Whitmore *et al.*, 1998).

14 Considerando a alça negativa do sistema circadiano do *paulistinha*, seis
15 parálogos de *Cry* foram identificadas (*Cry 1a*, *Cry 1b*, *Cry 2a*, *Cry 2b*, *Cry 3*, *Cry*
16 *4*) (Kobayashi *et al.*, 2000). Em geral, os parálogos de *Cry*, funcionam na
17 repressão da transcrição dos parálogos dos genes *Clock* e *Bmal*, porém, as
18 sequências gênicas e o padrão de expressão destes genes apresentam-se
19 bem variados, existindo inclusive alguma especulação a respeito de que a
20 expressão de alguns parálogos sejam ativados diretamente pela luz, como *Cry*
21 *1a* (Amaral e Johnston, 2012, Kobayashi *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 2007),
22 fazendo com que isoforma protéica resultante torne-se uma importante
23 candidata a ser responsável por ajustar o relógio em função da luz durante o
24 ciclo claro escuro. Sendo assim, parece haver diferentes funções para os
25 parálogos do gene *Cry*.

1 A situação do controle transcricional dos parálogos do gene *Per* é
2 igualmente complexa. São quatro parálogos (*Per 1a*, *Per 1b*, *Per 2* e *Per 3*),
3 sendo a expressão de *Per 2* induzida pela luz e as restantes ajustadas pela
4 oscilação das alças do relógio (Wang, 2008). Este parálogo, juntamente com
5 *Cry 1a* parece funcionar como parte do mecanismo da via de estimulação do
6 mecanismo de relógio, bem como parece ser importante no desenvolvimento
7 da pineal durante a fase embrionária (Hirayama *et al.*, 2003; Tamai *et al.*, 2007;
8 Ziv *et al.*, 2005; Ziv e Gothilf, 2006). Sendo assim, parece que, assim como
9 para os parálogos do gene *Cry*, os parálogos de *Per* parecem apresentar um
10 nível de especialização em suas funções.

11 1.6.3 Relógios Biológicos Periféricos em Peixes

12 Assim como em mamíferos, tecidos periféricos tais como o coração,
13 fígado, rim, baço, pineal, olhos e músculo esquelético de peixes também
14 apresentam osciladores com perfil de ritmicidade circadiana, mas,
15 diferentemente, apresentam mecanismos fotorreceptivos responsivos aos
16 ciclos claro-escuro e exibem ritmicidade nos níveis de expressão do gene
17 *Clock* e respectivas isoformas (Whitmore *et al.* 1998, Whitmore *et al.* 2000;
18 Pando *et al.* 2001; Amaral e Johnston; 2012). Nestes órgãos, o ritmo diário de
19 expressão gênica de *Clock* é persistente sob condições constantes *in vitro*,
20 porém, é reajustado quando o ciclo claro-escuro é invertido, indicando a
21 existência de um maquinário envolvendo estruturas fotorreceptoras acoplado a
22 osciladores circadianos nestes órgãos (Whitmore *et al.* 2000). Além disso,
23 diferentes linhagens celulares de embriões de *paulistinha* também se
24 mostraram capazes de reajustar sua atividade rítmica, uma vez que

1 apresentam osciladores circadianos sensíveis a luz (Whitmore *et al.* 2000;
2 Pando *et al.* 2001).

3 Como mencionado anteriormente, a presença deste maquinário
4 compreendendo a presença de células fotorreceptoras e osciladores
5 circadianos em diversos tecidos periféricos, põe a prova se, em peixes,
6 realmente existiria uma estrutura marca-passo central como a observada em
7 mamíferos. Apesar das evidências descritas anteriormente, indicando uma
8 integração entre a fotorrecepção retiniana e a pineal, culminando com um
9 controle sobre a síntese de melatonina, a qual atuaria como um sinal
10 integrativo para o resto do organismo, ritmos de atividade locomotora foram
11 observados em larvas de *zebrafish* pinealotomizadas e sem capacidade visual
12 (Hurd e Cahill, 2002). Isso mostra que nenhum destes órgãos é dominante no
13 controle circadiano da atividade locomotora nestes animais. Além disso,
14 existem também evidências de uma atuação em conjunto destas estruturas
15 com o NSQ em prol da manutenção da atividade circadiana em peixes (Noche
16 *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2012).

17 Estudos empregando ferramentas moleculares têm demonstrado a
18 expressão rítmica de genes de relógio em tecidos periféricos. Diversos tecidos,
19 anteriormente mencionados, e linhagens celulares de *paulistinha*
20 demonstraram indução da expressão dos genes *per 2* e *cry 1a* desencadeada
21 pela exposição à luz e, devido ao papel desempenhado por estes genes no
22 maquinário do relógio central, foi sugerido que esta indução da transcrição
23 direcionada pela luz seria um mecanismo chave no ajuste do relógio (Tamai *et*
24 *al.* 2007; Cermakian *et al.* 2002). Além disso, recentemente foram

1 demonstrados ritmos robustos na expressão de diversos genes comumente
2 atribuídos ao relógio central no tecido muscular de *paulistinha* mantidos sob
3 condições de escuro constante (Amaral e Johnston, 2012).

4 Sendo assim, as evidências não apontam para uma estrutura principal
5 responsável por atuar como um marca-passo central, como observado em
6 mamíferos. A manutenção dos ritmos mesmo após a retirada de estruturas que
7 funcionariam como tal, tais como NSQ e a pineal, além da presença de
8 osciladores fotossensíveis em vários tecidos periféricos levam a crer que o
9 sistema circadiano de *paulistinha* é constituído de diferentes marca-passos
10 distribuídos por todo o organismo e ajustados, em sua maioria, pela luz.

11 **1.7 RITMOS COMPORTAMENTAIS E FISIOLÓGICOS**

12 **1.7.1 Ritmos Comportamentais e Fisiológicos – Panorama Geral**

13 Ritmos diários e sazonais no sistema endócrino são coordenados pelo
14 NSQ o qual, como mencionado anteriormente, é sincronizado, principalmente,
15 pelo período de duração do ciclo claro-escuro através de vias aferentes da
16 retina. Sendo assim, a maioria dos osciladores periféricos não reage
17 diretamente à luz, mas são sincronizados por estímulos neurais e humorais
18 advindos do NSQ, sendo a síntese e secreção de hormônios variável de
19 maneira previsível no curso de horas, dias, meses, anos ou até de uma vida
20 inteira (Hastings, 1991; Czeisler & Klerman, 1999; Shearman *et al.*, 2000).

21 Em mamíferos, o NSQ orchestra vários processos metabólicos através
22 da regulação sistêmica de uma série de hormônios que coordenam atividades
23 de forrageamento (Yang *et al.*, 2009), taxa metabólica (Bechtold, *et al.*, 2008),

1 atividade locomotora (Aguilar-Roblero *et al.*, 1994; Challet *et al.*, 1997; Piccione
2 *et al.*, 2007), sono-vigília (Dudley *et al.*, 2003; Hofman e Swaab, *et al.*, 2006;
3 Kramer *et al.*, 2001) e mobilização e acúmulo de substrato energético (Shimba,
4 *et al.*, 2005; Turek *et al.*, 2005), através do balanço das alças positiva e
5 negativa, e respectivos co-fatores, do relógio central. Isso ocorre através de
6 uma série de projeções e conexões neurais específicas do NSQ que
7 direcionam os ciclos endócrinos, além de outros (Buijs & Kalsbeek, 2001;
8 Saper *et al.*, 2005; Kalsbeek *et al.*, 2006).

9 A regulação do eixo somatotrópico, por exemplo, é complexa,
10 dependendo do tempo e da interação com outras variáveis endócrinas e
11 neuroendócrinas, muitas das quais são rítmicas, e os ritmos dos seus órgãos-
12 alvo acabam por gerar uma complexa ritmicidade de frequências múltiplas no
13 sistema como um todo (Litman *et al.*, 1958; Veldhuis *et al.*, 2006). Por exemplo,
14 o ciclo sono-vigília rege a amplitude da secreção de GH, LH, prolactina e
15 cortisol os quais, dependendo da maturidade sexual e fase reprodutiva do
16 indivíduo, terão sua secreção modulada (Van Cauter e Refetoff, 1985; Van
17 Cauter e Honickx, 1985; Soules *et al.*, 1984). Na adrenal, a luz pode
18 desencadear a síntese e liberação de glicocorticóides, através de sinais
19 circadianos provenientes do NSQ transmitidos via sistema nervoso simpático,
20 sem necessariamente acompanhar a ativação via hipotálamo-adeno-hipófise
21 (Ishida *et al.*, 2005). Semelhantemente, a secreção noturna de melatonina, a
22 qual é um importante regulador do ciclo sono-vigília e ritmos sazonais
23 (Hastings, 1991; Wyatt *et al.*, 2006), e os ritmos de secreção diários de
24 adrenocorticotrofinas (ACTH), gonadotrofinas e outros hormônios metabólicos,
25 são modulados diretamente por conexões neurais entre o hipotálamo e a

1 glândula pineal (Kalsbeek *et al.*, 2006). A secreção rítmica de glicocorticóides e
2 a sua habilidade de regular a mudança de fase dos relógios periféricos os torna
3 candidatos prováveis a serem os responsáveis por estabelecer a conexão entre
4 o marca-passo do NSQ e os osciladores periféricos (Le Minh *et al.*, 2001).
5 Outro hormônio que apresenta um ritmo diário bem definido de secreção é o
6 cortisol, sendo a sua fase de secreção fortemente correlacionada com o
7 comportamento do animal (Dickmeis, 2009).

8 De maneira geral, parece que o NSQ secreta uma série de fatores
9 “temporizadores” e é, portanto, capaz de definir fases no ciclo circadiano em
10 seus diversos tecidos-alvo.

11 *1.7.2 Ritmos Comportamentais e Fisiológicos em Peixes*

12 *1.7.2.1 Ritmos de Atividade Locomotora em Peixes*

13 Estudos envolvendo ritmos de atividade locomotora de animais mantidos
14 sob condições constantes têm sido extensivamente utilizados para analisar a
15 organização fisiológica dos sistemas circadianos de mamíferos, aves e répteis
16 (Martin *et al.*, 2010; Pittendrigh e Daan, 1976; Takahashi e Menaker, 1979;
17 Underwood, 1983). Semelhantemente, em peixes, a análise do comportamento
18 locomotor tem sido também utilizada como modelo em estudos envolvendo
19 ritmos biológicos por exibirem ritmos circadianos (Reebs, 2002; Zhdanova e
20 Reebs, 2006), ciclos fisiológicos e mudanças comportamentais que ocorrem
21 em um determinado período de tempo. Sob condições de laboratório
22 constantes, estes ritmos endógenos ocorrem com uma periodicidade próxima a
23 24 horas. Contudo, na natureza estes ritmos são ajustados por pistas

1 ambientais específicas, os já mencionados *Zeitgebers*, sendo o principal deles
2 a luz, o qual é mediado por órgãos fotorreceptivos que respondem às variações
3 luminosas diárias (Bell-Pedersen *et al.*, 2005). Alguns estudos já
4 demonstraram, em peixes, padrões rítmicos de atividade locomotora, grande
5 parte destes utilizando o peixe *paulistinha* como modelo biológico. Hurd e
6 colaboradores (1998) demonstraram que estes animais são mais ativos durante
7 o período diurno quando mantidos sob condições de fotoperíodo de 12C:12E.
8 Contudo, alguns animais deste estudo demonstraram-se mais ativos durante a
9 noite subjetiva quando mantidos sob escuro constante. Além disso, neste
10 mesmo estudo foi observado que o período de atividade locomotora era
11 compensado pela temperatura, demonstrando que a atividade locomotora
12 nesta espécie é regulada por um relógio circadiano que pode ser ajustado por
13 este fator. Dados de um estudo mais recente demonstraram que a temperatura
14 tem um papel importante sobre o perfil de atividade locomotora exibido por
15 *paulistinha* e que a responsividade ao ciclo claro-escuro estaria acoplada a
16 variações deste fator (López-Olmeda e Sánchez-Vázquez, 2009). Outro fator
17 que parece exercer influência sobre atividade locomotora de *Danio rerio*
18 (*paulistinha*) é a alimentação. Em um estudo visando verificar a presença de
19 atividade antecipatória à alimentação, foi verificada uma variação na atividade
20 locomotora dependente do momento em que o alimento era disponibilizado aos
21 animais (Sanchez e Sanchez-Vazquez, 2009).

22 Semelhantemente ao observado para exemplares de *paulistinha* adultos,
23 foi observada uma marcada ritmicidade de atividade locomotora em larvas
24 desta espécie, apresentando maior atividade durante o período diurno,
25 indicando que, em larvas, existe um mecanismo de relógio fortemente ajustado

1 pela luz (Cahill *et al.*, 1998). Ao contrário do observado para *paulistinha*, o
2 peixe-gato andador *Clarias batrachus* exibe um padrão de atividade locomotora
3 mais alta durante a fase noturna, quando sob fotoperíodo 12C:12E mas é
4 igualmente independente do sexo (Ramteke *et al.*, 2009). A idade também se
5 parece ser um fator de influência sobre alguns aspectos da ritmicidade em
6 *paulistinha*, uma vez que animais mais velhos produzem menos melatonina e,
7 conseqüentemente, a cognição e o comportamento de repouso destes animais,
8 o qual normalmente ocorre durante a fase escura, encontra-se diminuído
9 (Zhdanova *et al.*, 2008). Um estudo mais recente realizado com a enguia
10 *Anguilla anguilla*, revelou um padrão comportamental semelhante ao observado
11 em *C. batrachus*, onde a maioria dos exemplares estudados (63%) apresentou
12 atividade locomotora mais elevada durante o período noturno (López-Olmeda
13 *et al.*, 2012)

14 Alguns estudos também revelaram a influência do maquinário circadiano
15 sobre o sistema visual de *paulistinha*. Em um ensaio comportamental foi
16 demonstrado que estes animais eram menos responsivos a luz durante a noite,
17 sendo necessária uma intensidade luminosa maior do que a aplicada durante o
18 período de luz (Li e Dowling, 1998). Ensaos utilizando eletroretinogramas
19 neste mesmo estudo demonstraram que porções do sistema visual do modelo
20 biológico estariam sendo moduladas pelo relógio biológico. Estudos
21 envolvendo lesões de grupos celulares retinianos, e mutantes apresentando
22 menor número deste mesmo grupo de células, foram desenvolvidos na
23 tentativa de compreender quais as vias estariam envolvidas na geração e
24 modulação dos ritmos estimulados pela luz em *paulistinha* (Li e Dowling 2000
25 a,b). Os dados destes estudos indicaram que as células interplexiformes

1 dopaminérgicas e as vias eferentes olfato-retinianas que as inervam são
2 necessárias para a expressão de diversos aspectos da ritmicidade do sistema
3 visual porém, não esclareceram se estas células tem participação direta na
4 geração dos ritmos ou se permitem a expressão de ritmos gerados na retina.

5 1.7.2.2 Ritmos Fisiológicos em Peixes

6 Como já comentado, um amplo número de hormônios apresenta ritmos
7 diários de produção e secreção em vertebrados. Nos peixes são observados
8 ritmos de frequências variadas em quase todas as atividades fisiológicas, com
9 marcado padrão de crescimento, reprodução e fisiologia do sistema imune.
10 *Zeitgebers* externos, tais como fotoperíodo, temperatura, precipitação, além de
11 qualidade e quantidade de alimento disponível, tem sido demonstrados como
12 fatores capazes de ajustar estes ritmos. As pistas externas dependem de
13 variações sazonais e da influência de diversas atividades fisiológicas pelo
14 envolvimento de glândulas e seus moduladores.

15 A síntese de melatonina *paulistinha*, como em outros vertebrados, por
16 exemplo, tem aparecido como um regulador de ritmos de metabolismo
17 fotorreceptor (Cahill e Besharse, 1995). O padrão de síntese desta indolamina
18 nas retinas de *paulistinha* é elevado à noite e baixo durante o dia, como já
19 observado em outros vertebrados, sendo este ritmo persistente mesmo quando
20 o tecido é mantido *in vitro* sob condições de escuro constante, indicando um
21 controle da síntese de melatonina por um oscilador fraco na retina (Cahill,
22 1996). Além disso, neste mesmo trabalho também foram demonstrados ritmos
23 robustos de síntese e secreção de melatonina em culturas de pineais *in vitro*,
24 assim como já previamente observado em outros teleósteos (Falcón *et al.*,

1 1989; Kezuka *et al.*, 1989; Zachmann *et al.*, 1992; Bolliet *et al.*, 1996). Esta
2 ritmicidade observada para a síntese e produção de melatonina é parcialmente
3 dependente do controle rítmico, através do sistema de relógio, da expressão do
4 gene responsável pela produção da enzima arilalquilamina-N-acetil-transferase
5 (AANAT), um fator limitante para a produção de melatonina (Bégay *et al.*, 1998;
6 Gamse *et al.*, 2001). Uma vez que a pineal de peixes é fotossensível, a luz
7 exerce uma função de ajuste do relógio dependente de fase na glândula, além
8 de inibir a síntese de melatonina independentemente da fase do ciclo claro-
9 escuro (Cahill, 1996).

10 Como os hormônios envolvidos no metabolismo apresentam ritmicidade
11 circadiana, seria lógico pensar que os processos metabólicos ocorrem com
12 perfil de variação circadiano. Ritmos diários nos níveis de glicose (López-
13 Olmeda e Sánchez-Vázquez, 2010; López-Olmeda *et al.*, 2012) e cortisol
14 (López-Olmeda *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013) sanguíneos já foram
15 descritos em espécies de peixe, sendo que o cortisol tem papel importante
16 sobre a regulação da ingestão de alimento e resposta ao stress (Kulczykowska
17 e Sánchez-Vázquez, 2010) e parece ter seu ritmo de produção influenciado
18 pela alimentação, bem como pela disponibilidade de alimento (López-Olmeda
19 *et al.*, 2009; Montoya *et al.*, 2010b). Ritmos diários no sistema gastrointestinal
20 de mamíferos já foram amplamente estudados, incluindo a atividade da
21 atividade de enzimas digestivas (Keller e Layer 2002; Zabielski, 2004). Em
22 peixes, porém, apenas recentemente foi demonstrado ritmo de atividade total
23 de amilase e protease alcalina em *Spaurus aurata* (Montoya *et al.* 2010b) e
24 este ritmo parece ser influenciado pelo momento de alimentação. Em *A.*
25 *anguilla*, também foram observadas diferenças entre dia e noite na atividade

1 total de enzimas do trato digestivo (amilase, proteases alcalina e ácida), porém
2 sem padrão rítmico (López-Olmeda *et al.*, 2009)

3 O hormônio de crescimento está envolvido na regulação de várias
4 funções fisiológicas, tais como o crescimento e desenvolvimento,
5 osmorregulação, reprodução, sistema imune, secreção endócrina, entre outros,
6 em peixes. Uma sincronização precisa da produção e liberação do GH com
7 outros hormônios do eixo hipotálamo-hipófise se faz necessária para a
8 manutenção das atividades mencionadas. Sendo assim, os hormônios são
9 liberados, em geral, de forma rítmica e, fazendo-os ter uma ação mais efetiva.
10 Existe uma grande gama de estudos relatando padrão de secreção rítmica de
11 hormônios tais como gonadotrofinas (de Vlaming e Vodcnik 1977; Hontela e
12 Peter 1978; Khan e Thomas 1994; Harikrishanan *et al.* 2002), esteróides
13 (Lamba *et al.* 1983; Singh e Singh 1987) e tireotróficos (Stacey *et al.* 1984;
14 Cook e Eales 1987; Sinha *et al.* 1992). Além disso, os níveis plasmáticos de
15 GH parecem estar sob a influência de variações diárias e sazonais em peixes
16 (Marchant e Peter 1986; Gomez *et al.* 1996; Canosa e Peter 2005), porém, os
17 resultados são altamente discutíveis, uma vez que a maioria dos estudos foi
18 realizado em um único mês ou em uma única fase do ciclo reprodutivo. Além
19 disso, o controle da secreção de GH nos peixes é multifatorial e é caracterizada
20 pelo balanço entre fatores estimulatórios e inibitórios que devem variar de
21 espécie para espécie (Peng e Peter 1977). Um estudo realizado em trutas
22 (Blaise *et al.*, 1995) já havia enfatizado a necessidade de uma investigação
23 mais ampla envolvendo a secreção de GH, abordando um maior número de
24 espécies de peixes. Um estudo visando esclarecer aspectos relativos às
25 variações diárias dos níveis de GH em um peixe de água doce demonstrou que

1 os padrões rítmicos de secreção e as concentrações de GH plasmático podem
2 ter forte correlação com a mudança dos parâmetros de duração do dia,
3 temperatura, forrageamento e atividade reprodutora (Singh *et al.*, 2009).

4 Visando avaliar os efeitos do excesso de GH endógeno, foi desenvolvido
5 um modelo de peixe transgênico, utilizando *paulistinha*, capaz de
6 superexpressar o GH do peixe-rei marinho (*Odontheistes argentinensis*) em
7 todos os tecidos, sendo a primeira linhagem de peixes transgênicos a ser
8 produzida no Brasil (Figueiredo *et al.*, 2007a). A linhagem, denominada
9 F0104, ganhou reconhecimento internacional e integra o “The *Zebrafish* Model
10 Organism Database” (ZFIN - <http://zfin.org>). Utilizando diferentes genótipos da
11 linhagem mencionada, foram desenvolvidos estudos os quais relatam um
12 aumento significativo na taxa de crescimento e no nível de expressão gênica
13 de GHR (do inglês - Growth Hormone Receptor) e IGF-I no fígado de animais
14 hemizigotos (Figueiredo *et al.*, 2007b). Além disso, neste mesmo estudo,
15 animais homozigotos, os quais expressam duplamente o gene para o GH, não
16 apresentaram crescimento proporcional à expressão deste gene no organismo.
17 Este crescimento abaixo do esperado, observado em indivíduos homozigotos,
18 pode estar correlacionado ao custo energético voltado à manutenção das vias
19 de regulação do mecanismo de retroalimentação da liberação de GH
20 (Studzinski *et al.* 2009). Outros estudos, envolvendo os animais homozigotos,
21 relataram ainda o desenvolvimento de senilidade precoce, aparentemente
22 causada por depleção das defesas antioxidantes, além do aumento da geração
23 de espécies reativas de oxigênio (ROS) em consequência do aumento do
24 consumo de oxigênio e da taxa metabólica (Rosa *et al.*, 2008, 2010, 2011).

1 Recentemente, Figueiredo e colaboradores (2012) desenvolveram uma
2 linhagem de *paulistinha* transgênico capaz de superexpressar o receptor do
3 hormônio de crescimento (GHR) no músculo deste animal, a qual foi
4 denominada MYO-GHR, visando estudar os efeitos desta manipulação sobre a
5 regulação da expressão gênica dos mecanismos envolvidos no crescimento
6 muscular deste animal. Neste estudo, apesar de ser relatado um aumento do
7 número de células (hiperplasia), não foi observado aumento de peso dos
8 animais, talvez devido à diminuição observada da expressão do fator de
9 crescimento tipo insulina I (IGF-I). Cabe ressaltar que o cruzamento das duas
10 linhagens mencionadas, F0104 e MYO-GHR, gera indivíduos com quatro
11 fenótipos diferentes, compreendendo animais unicamente superexpressando o
12 GH (aqui chamados GH-transgênicos), unicamente superexpressando o
13 receptor do GH (aqui chamados GHR-transgênicos), animais
14 superexpressando ambos, GH e GHR (nomeados GH/GHR-transgênicos), e
15 animais que não apresentam alteração gênica para GH e GHR, chamados
16 Não-transgênicos (NT).

17 Até o presente momento, pode-se afirmar que, como mencionado
18 anteriormente, o principal, ou pelo menos o mais forte, *zeitgeber* ao qual *Danio*
19 *rerio* é responsivo, é a luz. Diferentemente de mamíferos, o *paulistinha* parece
20 ter relógio o circadiano descentralizado, uma vez que foi observada a presença
21 de órgãos e tecidos periféricos com mecanismos fotorreceptivos exibindo a
22 expressão gênica de osciladores com robusto padrão circadiano (Whitmore *et*
23 *al.* 2000; Pando *et al.* 2001; Amaral e Johnston; 2012). Tais evidências
24 demonstram que a luz tem forte influência sobre o comportamento de atividade
25 locomotora destes animais (Hurd *et al.*,1998; Cahill *et al.*,1998; Li e Dowling,

1 1998; Emran *et al.*, 2008; Blanco-Vives e Sanchez-Vazquez, 2009), além de
2 possivelmente influenciar sobre o padrão rítmico de atividade metabólica,
3 através da síntese e liberação de hormônios envolvidos no metabolismo, como
4 visto não só em *paulistinha* mas também em outras espécies (López-Olmeda *et*
5 *al.*, 2009; Montoya *et al.* 2010b; López-Olmeda *et al.*, 2012). Além disso,
6 existem evidências de que a ritmicidade observada em tecidos e órgãos
7 periféricos poderiam estar sendo ajustados por fatores endógenos tais como os
8 níveis de glicocorticóides, no caso o cortisol (Dickmeis *et al.*, 2007). Porém,
9 além da luz, outros fatores podem atuar como potentes *Zeitgerbers* em
10 *paulistinha*, sendo que as respostas ao ciclo claro-escuro previamente
11 observadas (Cahill *et al.*, 1998; Hurd *et al.*, 1998) estariam acopladas à
12 resposta a fatores tais como a temperatura (López-Olmeda e Sánchez-
13 Vázquez, 2009) e o momento de alimentação (Sanchez e Sanchez-Vazquez,
14 2009).

15 Considerando os dados mencionados acima, demonstrando a
16 capacidade observada em *paulistinha* de responder a diferentes parâmetros
17 ambientais, os quais podem atuar como *Zeitgebers* nesta espécie, bem como a
18 influencia destes fatores sobre o metabolismo em diferentes espécies de
19 teleósteos, no presente estudo levantamos a hipótese de que os animais
20 geneticamente modificados para o hormônio de crescimento, anteriormente
21 mencionados, seriam menos responsivos ao principal arrastador do ritmo
22 circadiano em *paulistinha*, a luz. Ao longo dos anos, durante o manejo destes
23 animais nos estudos desenvolvidos com as diferentes linhagens, F0104, MYO-
24 GHR e o cruzamento entre estas (Figueiredo *et al.*, 2007 a,b; Rosa *et al.*,
25 2008, 2010, 2011; Studzinski *et al.*, 2009; Figueiredo *et al.*, 2012) no Instituto

1 de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande, RS – Brasil,
2 foram coletadas evidências, ainda não reportadas, de que estes animais
3 apresentariam um nível de atividade locomotora mais elevado ao longo do ciclo
4 claro-escuro. Com o intuito de verificar esta hipótese, neste estudo foi
5 verificado inicialmente o nível de expressão dos genes dos fatores de ativação
6 (*clock 1a*, *clock 1b*, *bmal 1a* e *bmal 1b*) e repressão (*per 1a*, *per 1b*, *per 2*, *per 3*
7 *cry 1b* e *cry 2b*) do mecanismo circadiano, no músculo esquelético de
8 *paulistinha*, visando verificar se o robusto ritmo de expressão destes genes
9 neste tecido, previamente verificado (Amaral e Johnston, 2012), estaria
10 alterado. Além disso, ensaios comportamentais sob diferentes condições de
11 luminosidade foram aplicados para verificar se o ritmo de atividade locomotora
12 destes animais em resposta a luz, mais elevado durante a fase luminosa e
13 menor durante a fase escura (Cahill *et al.*, 1998; Hurd *et al.*, 1998), estaria
14 alterado.

1 **2. OBJETIVO**

2 O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos da superexpressão
3 do GH, do GHR e de ambos sobre a expressão dos genes envolvidos na
4 regulação das alças de retroalimentação positiva e negativa do relógio
5 circadiano no músculo esquelético de *paulistinha* (*Danio rerio*) e sobre o
6 comportamento da sua atividade locomotora ao longo do ciclo claro-escuro.

3. Capítulo I

Artigo 1

Clock genes expression are altered in GH and GHR transgenic *zebrafish* along the light-dark cycle

Cruz, B.P.¹, Flores, L.B.¹, Nery, L.E.M.¹, Marins, L.F.¹

¹ *Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG)*

* Author for correspondence: L.E.M. Nery. Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Itália, Km 8, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil. e-mail: luiznery@furg.br

The authors declare no conflicts of interest.

**Artigo a ser publicado na revista *Comparative Biochemistry and
Physiology - A***

1 **Abstract**

2 The circadian system of *zebrafish* can be entrained by a wide variety of
3 *Zeitgebers* such as light, temperature and feeding time. Besides, the expression
4 of genes involved in the control of the circadian clock machinery has been
5 documented in many different tissues with robust patterns along the LD cycle.
6 In the present work it was demonstrated that the transgenic *Danio rerio* model
7 overexpressing growth hormone (GH-transgenic) and growth hormone receptor
8 (GHR-transgenic), present altered gene expression in the positive and negative
9 loops of the circadian system. Gene expression of *clock* paralogs was reduced
10 at the beginning of the dark phase while *per* and *cry* paralogs expression was,
11 in general, reduced during the light phase in GH and GHR-transgenic animals.
12 These data suggest a diminishing in gene expression amplitude along the LD
13 cycle of both, positive and negative loops of the circadian system, and that the
14 GH overexpression could be responsible for these alterations, either by
15 affecting the pathways involved in the expression of genes from the circadian
16 system or by altering the metabolism.

17 **Keywords:** zebrafish, growth-hormone, LD cycle, gene expression, *Zeitgeber*

1 1. Introduction

2 The physiological functioning and behavior of living organisms are driven by
3 environmental clues which allow them to anticipate changes in daylight,
4 temperature and food availability conditions occurring with marked periodicity
5 (Aschoff, 1976; Moore-Ede *et al.*, 1976; Moore-Ede *et al.*, 1982). Such
6 capability relies on evolutionary events which culminated on the development of
7 an internal, self-sustaining clock, with periodicity near 24 hours, which
8 orchestrates their rhythms, according to their geographical localization
9 (DeCoursey, 2004; Dunlap, 2004). This clock is composed by molecular
10 oscillators formed by transcriptional activators and inhibitors of the clock itself
11 and other genes, forming positive and negative loops, respectively (Dunlap,
12 2004).

13 In mammals, the circadian clock system is centralized in the
14 suprachiasmatic nucleus (SCN) which receives environmental light information,
15 through retinohypothalamic tract, and synchronizes neuronal activity and the
16 peripheral oscillators, localized in other organs and tissues, by humoral and
17 neural outputs (Dunlap, 1999; Bell-Pedersen, 2005). The positive molecular
18 loop, localized in the SNC cells, is formed by the protein complex
19 CLOCK/BMAL1 that activates the transcription of *per* (*period*) and *cry*
20 (*cryptochrome*) genes. The resulting CRY and PER proteins dimmers migrate
21 into the nucleus and inhibit their own transcription by inhibiting the activation of
22 the complex CLOCK/BMAL1 (reviewed in Ko and Takahashi, 2006). Besides, a
23 second loop is responsible to set the phase of *bmal1* expression (Preitner *et al.*,
24 2002; Sato *et al.*, 2004) and consequently control the formation of

1 CLOCK/BMAL1 dimmers (De Bruyne *et al.*, 2007), therefore stabilizing the
2 clock mechanism.

3 Concerning teleost fish, the pineal gland appears to be the main circadian
4 pacemaker which drives the rhythmic secretion of melatonin through a
5 machinery of circadian oscillator (Cahill, 2002). However, the role of pineal
6 gland as the central circadian pacemaker has been questioned in non-
7 mammalian vertebrates because these groups of animals appear to have a
8 decentralized circadian clock, once the presence of photoreceptive mechanisms
9 have been observed, in peripheral organs and tissues, exhibiting robust
10 patterns of circadian expression of genes known to be activators and repressors
11 from the circadian system (Whitmore *et al.* 2000; Pando *et al.* 2001; Amaral and
12 Johnston, 2012).

13 Great advances have been achieved using the experimental model
14 *zebrafish* (*Danio rerio*). This animal presents diverse paralogs of clock genes of
15 the circadian system (Kobayashi *et al.*, 2000), probably due to an evolutionary
16 event leading to genome duplication (Postlethwait *et al.*, 1998). Different
17 paralogs of genes from the positive loop have been identified in the species
18 allowing different combinations of the resulting proteins, with different efficiency
19 of transcription activation, which are inhibited by CRY proteins isoforms
20 (Hirayama *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2002; Wang, 2008, 2009). Besides,
21 differently from what is observed in mammals (Shearman *et al.*, 1999), *clock*
22 genes paralogs evince an expression pattern equally followed by *bmal* paralogs
23 (Cermakian *et al.*, 2000). Regarding the negative loop, six *cry* genes paralogs
24 have been identified and the resulting proteins, in general, act as transcriptional

1 repressors of *clock* and *bmal* (Kobayashi *et al.*, 2000). Besides, some studies
2 have shown that *cry 1a* expression is directly driven by light and, therefore, this
3 gene expression could be an important mechanism underlying light entrainment
4 into the circadian system (Kobayashi *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 2007; Amaral
5 and Johnston, 2012). The transcriptional situation is similar in *per* genes
6 paralogs expression. Three, from the four paralogs are clock regulated and *per*
7 2 is light inducible (Wang, 2008). Together, *per 2* and *cry 1a* appear to have a
8 key role on the light entrainment to the clock machinery and seems to present
9 an important involvement at embryonic stages (Hirayama *et al.*, 2003; Ziv *et al.*,
10 2005; Tamai *et al.*, 2007). Besides, robust rhythmic expression of core-clock
11 genes was recently shown in skeletal muscle *zebrafish*, including the light-
12 driven *cry 1a* and *per2* (Amaral and Johnston, 2012).

13 Some studies have shown the influence of the circadian clock
14 mechanism on hormones release pattern, such as melatonin (Bégay *et al.*,
15 1998; Cahill and Besharse, 1995; Cahill, 1996; Gamse *et al.*, 2001), cortisol
16 (Kulczykowska and Sánchez-Vázquez, 2010; Montoya *et al.*, 2010) and growth
17 hormone (Gomez *et al.* 1996; Canosa and Peter 2005; Singh *et al.*, 2009) of
18 fish along the LD cycle. Also, the rhythm observed in peripheral organs could
19 also be adjusted by endogenous factors such cortisol (Dickmeis *et al.*, 2007).
20 Besides, transgenic *zebrafish* models have been used in the last decade aiming
21 to understand the structures and molecular mechanisms underlying the
22 circadian clock system, principally when entrained by light (Gothilf *et al.*, 2002;
23 Kaneko and Cahill, 2005; Kaneko *et al.*, 2006; Dickmeis *et al.*, 2007; Kojima *et*
24 *al.*, 2008; Vatine *et al.*, 2009). Considering the available data regarding
25 *zebrafish* behavioral and metabolic responses to different *Zeitgebers*, by setting

1 the circadian clock system and the pattern of hormone release, the present
2 study aimed to verify if genetically modified *D. rerio* for growth hormone
3 production are able to maintain the response to light, the main environmental
4 *Zeitgeber* in the species. For that goal, an internationally recognized (F0104)
5 (Figueiredo *et al.*, 2007a) and a recently developed (MYO-GHR) (Figueiredo *et*
6 *al.*, 2012) lineage of transgenic *zebrafish* were used in the present study. These
7 animals have been widely employed by our research group (Figueiredo *et al.*,
8 2007a, 2007b; Rosa *et al.*, 2008, 2010, 2011; Studzinski *et al.*, 2009;
9 Figueiredo *et al.*, 2012). No evidence has been shown, until the present
10 moment, regarding the effects of GH and GHR overexpression on the circadian
11 system of fish.

12 The aim of the present work was to verify the effects of growth hormone
13 (GH) and growth hormone receptor (GHR) overexpression on core-clock genes
14 expression on the skeletal muscle of *zebrafish* (*Danio rerio*).

1 **2. Material and Methods**

2 The fish used in the present study were provided by the transgenic fish
3 vivarium from Universidade Federal do Rio Grande (FURG – RS, Brazil) and
4 were cultured in a water recirculation system, according to Westerfield (1995),
5 kept at room temperature of 28°C, with a 12 hours light: 12 hours dark (12:12
6 LD) photoperiod (lights on 08:00 hours; lights off 20:00 hours; ZT0 = 08:00) and
7 fed with commercial flake food twice a day at any time during the light phase
8 until satiety. Transgenic *zebrafish* were all from the same brood and were
9 obtained by mating of GH-transgenic (F0104 lineage) females and GHR-
10 transgenic (MYO-GHR lineage) males. Therefore, the brood consisted of four
11 genotypes comprising non-transgenic (NT), GH, GHR and GH/GHR transgenic
12 animals. The GH/GHR animals were not included in the experiment once, due
13 higher mortality, these were not enough to fulfill the necessary number of
14 animals in each time point. Animals were 10 months-old and males and females
15 were used.

16 All experiments were conducted in compliance with the Ethics Committee
17 of Animal Use (Comitê de Ética em Uso Animal – CEUA – process number:
18 23116.005683/2013-12) from Universidade Federal do Rio Grande – FURG,
19 RS, Brazil.

20 *2.2 Experimental Procedures*

21 Animals were kept in the culture system and divided in different aquaria by
22 lineage (25 individuals/ aquarium). The aquaria were kept isolated in the culture
23 system to avoid disturbances during the experiment and a dim light was used

1 during night sampling. The animals were directly collected from the aquaria at
2 different time-points (10:00 – ZT02, 16:00 – ZT08, 22:00 – ZT14 and 04:00 –
3 ZT20) along one LD cycle. No sudden changes in animal's activity were
4 observed during sample collections. The fish were killed with a lethal dose of
5 tricaine (MS-222; Ethyl-3 aminobenzoate) and stored in ice until tissue
6 collection. During the night procedures, the animals were taken from the room
7 inside sealed boxes to avoid light.

8 Fast skeletal muscle was dissected from the dorsal epaxial myotomes,
9 directly immersed in TRIZOL Reagent™ (Invitrogen, Brazil) and consecutively
10 stored in -80°C until total RNA extraction procedures.

11 *2.3 Total RNA extraction and cDNA synthesis*

12 Total RNA was isolated by the TRIZOL Reagent Solution™ method
13 according to manufacturer's instructions (Invitrogen, Brazil). RNA integrity was
14 further checked by agarose gel electrophoresis. Consecutively, the obtained
15 total RNA was used as a template for cDNA synthesis using High-Capacity
16 cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Brazil) according to
17 manufacturer's instructions.

18 *2.4 Primers design and gene expression*

19 The sequence of ten primer pairs, for genes described as core-clock
20 genes in other vertebrate models (*clock1a*, *clock1b*, *bmal1a*, *bmal1b*, *cry1b*,
21 *cry2b*, *per1a*, *per1b*, *per2* and *per3*), were obtained from a previous study
22 (Amaral and Johnston, 2012). The primers for two genes, beta-actin (BAC) and
23 beta-2-microglobulin (B2M), used as internal controls, were designed using the

1 software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Brasil) based on sequences
2 available at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3 Gene expression was analyzed by real time quantitative PCR (qPCR).
4 Each sample was analyzed in duplicate ($n=5$) and PCR reactions were
5 performed in a in a 7300 Real-Time System (Applied Biosystems – Brazil) using
6 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kit (Invitrogen, Brazil). The
7 thermocycling program consisted of 2 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 95°C
8 and 30 s at 61.3°C. Serial dilutions were realized for all primer pairs to
9 determine the efficiency of qPCR reaction.

10 *2.5 Data analysis*

11 Results from serial dilutions were analyzed by the software REST (Pfaffl
12 *et. al.*, 2002) and significant differences in gene expression data among all
13 groups (NT, GH and GHR transgenic animals) were accessed by $2^{-\Delta Ct}$ method
14 for each paralog in each time point. Consecutively, one-way ANOVA was
15 performed followed by Neuman-Keuls *post-hoc* test and mathematic
16 transformations were applied when necessary. Data are expressed as mean
17 (\pm SE). Significant differences were assumed when $p < 0.05$ for all analyses.

1 **3. Results**

2 *3.1 Activator Paralogs of the circadian mechanism*

3 Gene expression of the transcriptional activator paralogs of the circadian
4 system *clock 1a* and *clock 1b* was significantly lower during the dark phase of
5 the LD cycle in both, GH-transgenic and GHR-transgenic animals, when
6 compared with the control group. Expression of *clock1a* was diminished at 22h
7 and 04h in both lineages, when compared with NT, and no significant
8 differences were observed in gene expression when comparing the transgenic
9 animals (Figure 1c and d). Gene expression of *clock1b* was also decreased at
10 time point 22h for both lineages (Figure 1c) but was only diminished in GHR
11 animals at time point 04h, when compared with control group (Figure 1d), and
12 no differences in gene expression were observed between the transgenic
13 animals. No significant differences among groups were observed for gene
14 expression of these paralogs in the other time points (10h and 16h) as well as
15 for the paralogs *bmal 1a* and *bmal 1b* gene expression in all time points (Figure
16 1a and b).

17 *3.2 Repressor Paralogs of the circadian mechanism*

18 Gene expression of the transcriptional repressor paralogs of the
19 circadian system *cry 1b* and *cry 2b* were both decreased at time point 10h,
20 during the light phase from the LD cycle, in GHR-transgenic animals. The
21 expression of *cry 1b* was significantly diminished in GHR animals when
22 compared with both, control group (NT) and GH-transgenic animals, but *cry 2b*
23 expression was decreased only when compared with NT (Figure 2a). No

1 significant differences were observed among groups for both genes at the
2 remaining time points (16h, 22h and 04h – Figure 2b, c and d).

3 Gene expression of the paralogs *per 1a* and *per 1b* was decreased at
4 time point 10h, from the light phase of the LD cycle, in GHR-transgenic animals
5 when compared with control group. Gene expression of *per 1a* was diminished
6 in GHR-transgenic fish when compared with both, non-transgenic and GH-
7 transgenic animals, while *per 1b* expression was diminished in GH and GHR-
8 transgenic animals when compared with control group, although no differences
9 were observed between the transgenic animals (Figure 2a). Expression of *per*
10 *1a* was also decreased at 22h in GHR-transgenic animals when compared with
11 both, non-transgenic and GH-transgenic animals (Figure 2c). No significant
12 differences were observed among groups in the other time points for these
13 genes expression (16h and 04h – Figure 2b and d).

14 Gene expression of *per 2* was significantly increased at time point 22 h in
15 GH-transgenic fish when compared with GHR-transgenic and non-transgenic
16 fish, but no differences were observed between GHR-transgenic and non-
17 transgenic animals (Figure 3c). Although no significant differences were
18 observed between GH and GHR-transgenic animals at time point 04h, *per 2*
19 gene expression was decreased in both when compared with control group
20 (Figure 2d). No significant differences were observed among groups in *per 2*
21 expression at the remaining time points (10h and 16h – Figure 2a and b).

22 Expression of gene *per 3* was significantly diminished in GHR-transgenic
23 animals when compared with non-transgenic and GH-transgenic animals at
24 time points 10h and 22h (Figures 3a and c), but no differences were observed

1 between GH and NT groups. Besides, at time point 04h, *per 3* gene expression
2 was only decreased in GHR-transgenic animals when compared with non-
3 transgenic and no significant differences were observed between GH and GHR
4 (Figure 3d). No significant differences were observed among all groups for *per 3*
5 expression at 16h (Figure 2b).

1 4. Discussion

2 Physiological and behavioral circadian rhythms in *D. rerio* can be
3 entrained by a wide variety of *Zeitgebers* such as light, temperature and feeding
4 time (Hurd *et al.*, 1998; Cahill *et al.*, 1998; López-Olmeda *et al.*, 2009; López-
5 Olmeda and Sánchez-Vázquez 2009; López-Olmeda *et al.*, 2010; Del Pozo *et*
6 *al.*, 2011; López-Olmeda *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013). Besides, differently
7 from mammals, *zebrafish* appears to have a decentralized circadian clock and
8 many peripheral tissues can be directly responsive to light, the strongest
9 *Zeitgeber* capable to set the circadian machinery in the species by adjusting the
10 expression pattern of genes known to be activators and repressors of the
11 circadian system (Whitmore *et al.*, 2000; Pando *et al.* 2001; Vallone *et al.*, 2004;
12 Vatine *et al.*, 2009; Amaral and Johnston, 2012; Mracek *et al.*, 2012). However,
13 many studies have shown that circadian rhythms can be entrained by other
14 *Zeitgebers* which, sometimes, are as powerful as light. Therefore, these studies
15 aim to understand the profile of circadian rhythm in different tissues while
16 challenging the response of the clock machinery to light with other entrainment
17 such as temperature, feeding time and endurance (Lahiri *et al.*, 2005; López-
18 Olmeda *et al.*, 2010; Egg, *et al.*, 2012).

19 Concerning the genes from the positive loop of the circadian system,
20 some studies, involving *clock* and *bmal* paralogs, were able to identify a strong
21 expression pattern in the central pacemaker and peripheral tissues of *zebrafish*
22 such as brain, eye, pineal, heart, kidney, spleen (Whitmore *et al.*, 1998;
23 Cermakian *et al.*, 2000) and muscle (Amaral and Johnston, 2012) along the LD
24 cycle, peaking at the beginning of the evening. In this last, the acrophase of all

1 *clock* and *bmal* paralogs occurred 2 hours after the beginning of the dark phase
2 and, except for *bmal1a*, the scotophase occurred 2 hours after the beginning of
3 the light phase. Therefore, the decreased expression of *clock1a* and *clock 1b*
4 (Figure 1a,b) observed in GH and GHR-transgenic animals, compared with the
5 control group, along the whole dark phase, mainly at time point 22h, when
6 expression levels of the mentioned genes were supposed to be peaking, and
7 the absence of differences among groups for *bmal* paralogs (*bmal1a* and
8 *bmal1b*) (Figure 1c and d), points to a possible control of circadian rhythm by
9 *clock* paralogs in the transgenic animals, once CLOCK/BMAL complex is the
10 central transcriptional activator of the circadian system. Furthermore, lower
11 amplitude in the expression pattern of *clock* paralogs might be found along the
12 LD cycle in these animals, which could lead to diminished amplitude of
13 physiological and behavioral patterns.

14 The negative loop of the molecular clock machinery is composed by PER
15 and CRY proteins. Gene expression of *per1* and *per3* paralogs present a well
16 defined oscillation pattern under LD cycles and are more likely to be driven by a
17 circadian oscillator, once this pattern is persistent under constant dark
18 conditions (DD) and peaks near the transition from dark to light phase
19 (Delaunay *et al.*, 2000; Vallone *et al.*, 2004; Lahiri *et al.*, 2005) in cell lines
20 generated from embryonic *zebrafish*. Differently, *per2* expression has been
21 described as light inducible in different tissues, once its expression levels
22 increase following lights on and dampens right after the animals, or isolated
23 tissues, are transferred to DD conditions (Ziv *et al.*, 2005; Vatine *et al.*, 2011;
24 Mracek *et al.*, 2012). Interestingly, Amaral and Johnston (2012) have found
25 robust circadian rhythm of *per2* with peak before the shifting between dark and

1 light phase in the skeletal muscle of animals kept under DD conditions.
2 Regarding *cry* paralogs, the expression pattern has been shown to be quite
3 variable (Kobayashi *et al.*, 2000, Vatine *et al.*, 2011) as observed the eyes,
4 brain and pineal. Except for *cry 1a*, which is light-inducible and plays an
5 important role in the maintenance of light-entrained rhythms, the remaining *cry*
6 paralogs are clock regulated and the resulting protein products have been
7 shown to inhibit the protein complex CLOCK:BMAL (Vatine *et al.*, 2011),
8 although *cry 1b* does not present a circadian pattern in the skeletal muscle
9 (Amaral and Johnston, 2012) as observed in central pacemakers (Kobayashi *et*
10 *al.*, 2000). Except for *cry 2a* and *cry 2b*, all genes from the negative loop were
11 expressed almost in anti-phase in the skeletal muscle of *zebrafish* (Amaral and
12 Johnston, 2012), once *clock* and *bmal* paralogs were expressed in the
13 beginning of the evening and *cry 1a* and *per* paralogs at the end of the dark
14 phase or beginning of the light phase.

15 GH-transgenic *zebrafish* present evidence of altered metabolic profile, as
16 previously studies have demonstrated (Figueiredo *et al.*, 2007; Rosa *et al.*,
17 2008, 2010, 2011; Studzinski *et al.*, 2009; Dalmolin *et al.*, 2014a, 2014b).
18 Regarding GHR-transgenic animals, although no evidence of altered metabolic
19 rate was observed in these animals, GHR overexpression induced hyperplasia
20 but not hypertrophy in these animals. Our data have shown significant
21 transcriptional inhibition of genes composing the negative loop of the circadian
22 system when compared with the control group. Expression of *cry* paralogs was
23 decreased at time point 10 hours. Considering the expression patterns
24 previously observed for skeletal muscle (Amaral and Johnston, 2012), *cry 2b* is
25 already downregulated at the beginning of the light phase and, curiously, *cry*

1 *1b* expression, which presented no circadian pattern and therefore it was not
2 implicated in the circadian mechanism in skeletal muscle, it was diminished in
3 both *zebrafish* transgenic lineages. Except for *per 1a* (Figure 1d) and *per 2*
4 (Figure 3a) in GH-transgenic group at time point 22 hours, the remaining *per*
5 paralogs studied here presented diminished expression in transgenic animals
6 when compared with control group. According to the expression pattern found in
7 the skeletal muscle of *D. rerio* (Amaral and Johnston, 2012), *per 1a* and *per 2*
8 should be peaking at the end of the dark phase while *per 1b* and *per 3* should
9 be peaking at the beginning of the light phase. Therefore, *per* genes expression
10 peak in the transition between light and dark periods. In general, the diminished
11 expression observed for *per* genes, mostly in GHR-transgenic animals, also
12 points to diminished amplitude of the expression pattern along the LD cycle in
13 these animals.

14 These differences observed in the expression of genes from the
15 circadian machinery, in GH-transgenic animals, could be related with the
16 evidence of higher metabolic level characteristics already documented, such as
17 higher growth rate and gene expression levels of GHR and IGF-I in liver
18 (Figueiredo *et al.*, 2007), higher levels of oxygen consumption and reactive
19 species of oxygen production (Rosa *et al.*, 2008, 2011), the energetic cost of a
20 downregulation mechanism in the somatotropic axis (Studzinski *et al.*, 2009),
21 early senility (Rosa *et al.*, 2008) and increased hexokinase gene expression,
22 besides higher food intake (Dalmolin *et al.*, 2014a, 2014b). On the other hand,
23 the excess of growth hormone could be directly altering the expression pattern
24 of genes involved in the circadian system in the skeletal muscle of GH-
25 transgenic *zebrafish*, by triggering different pathways involved in the control of

1 genes from the circadian machinery. This direct effect of GH on the expression
2 of genes from the circadian system could explain the alterations observed in
3 GHR-transgenic animals, in which no evidence of altered metabolic level was
4 reported until the present moment. Besides, a more pronounced effect might be
5 observed in gene expression of transgenic animals when crossing GH and GHR
6 animals caused by a synergic effect of both, the excess of growth hormone and
7 growth hormone receptor in the same individual. In this case, a strong
8 diminishing of amplitude from genes of the positive and negative loops
9 composing the circadian system should be observed. Therefore, studies
10 involving an output, such as locomotor activity entrained by light, should be
11 made aiming to verify if the altered gene expression observed for the transgenic
12 animals of the present study are enough to compromise the circadian clock
13 system of *D. rerio*.

14 The present work shows evidence that GH and GHR transgenesis in
15 *zebrafish* causes altered responses in the expression pattern of genes from the
16 circadian system in the skeletal muscle along the LD cycle. Besides, although
17 light is a strong *Zeitgeber* for zebrafish, the altered gene expression observed in
18 transgenic animals could trigger stronger responses to other entrainments.
19 New behavioral studies employing different light conditions, food availability and
20 feeding time should be considered, once GH and GHR transgenesis in these
21 animals could be leading to diminished expression amplitude of genes from the
22 circadian system in transgenic *zebrafish*.

1 **Acknowledgements**

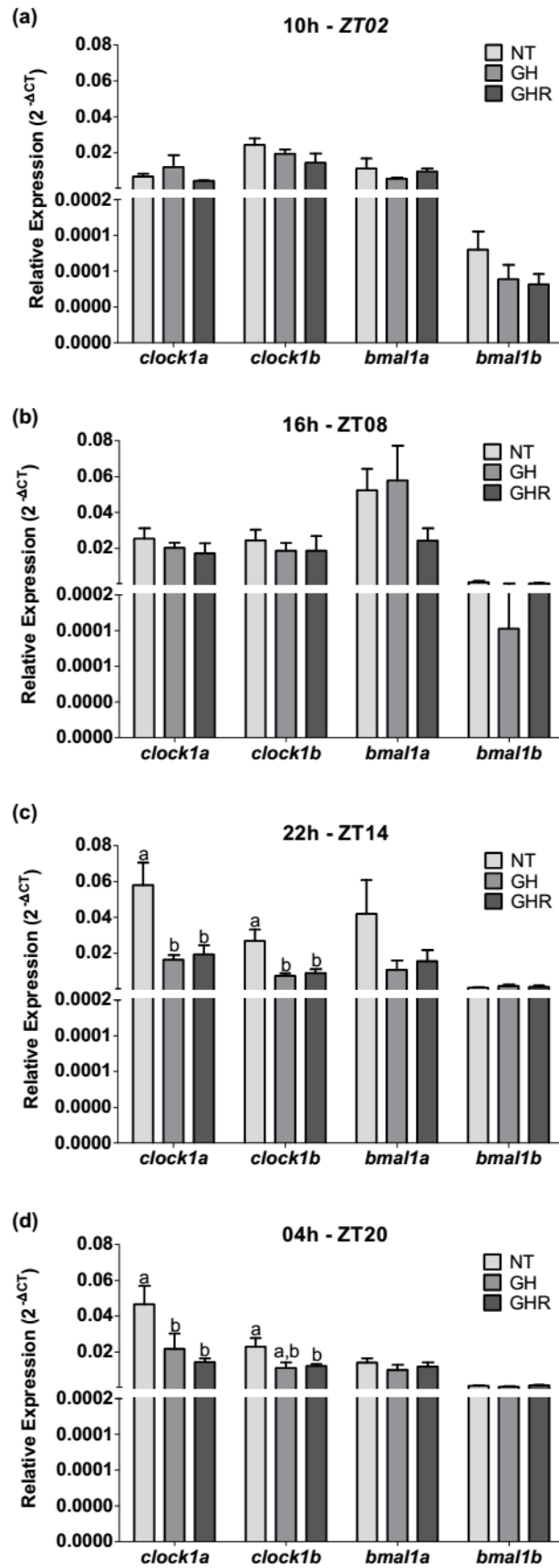
2 The authors would like to thank Carlos Frederico Ceccon Lanes, Daniela
3 Volcan Almeida and Marcio de Azevedo Figueiredo who gently helped during
4 tissue extraction and samples processing. This work was supported by Brazilian
5 CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and
6 CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

1 **Figure Captions**

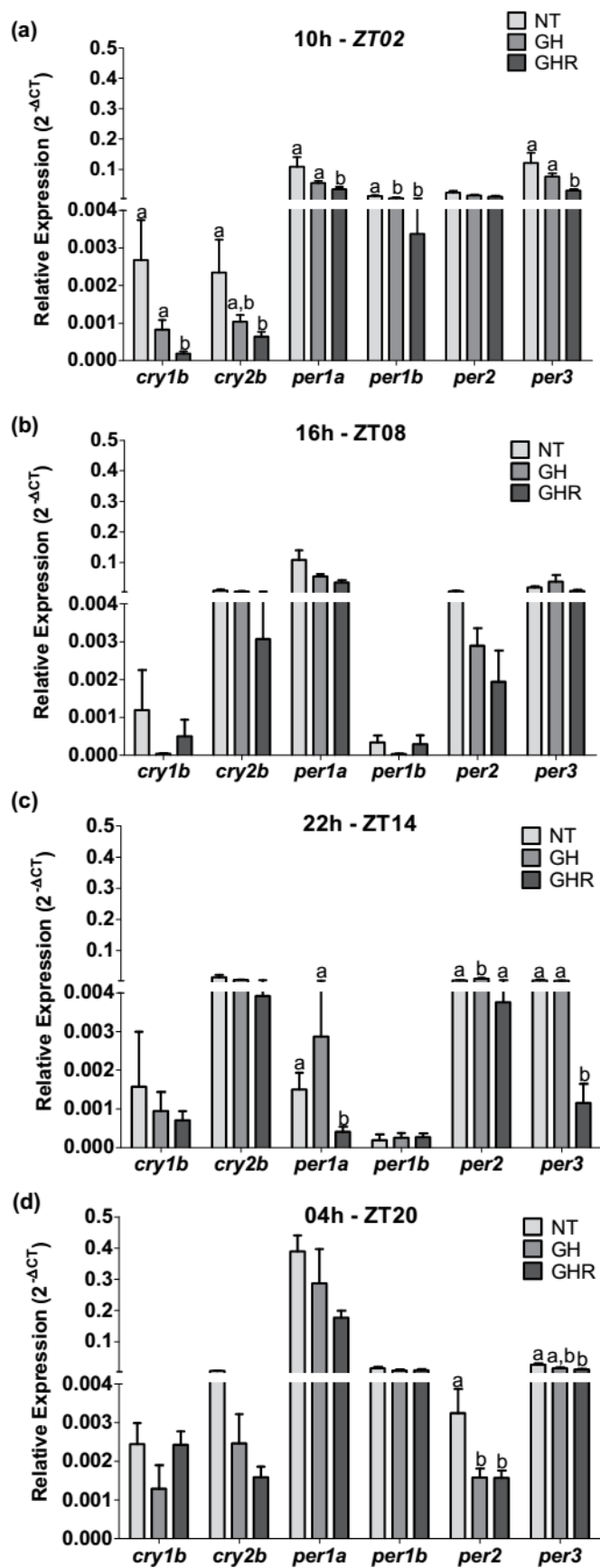
2 **Figure 1:** Differences in the expression of genes known to be activators of the
3 circadian system among NT (light-grey bars), GH (grey bars) and GHR (dark-
4 grey bars) animals at time points 10h (a), 16h (b), 22h (c) and 04h (d). ZT
5 means *Zeitgeber* time. Values are represented as means \pm SE, n = 5 per time
6 point. Different letters represent significant statistical differences among groups
7 for each gene in each time point ($p < 0.05$).

8 **Figure 2:** Differences in the expression of genes known to be repressors of the
9 circadian system among NT (light-grey bars), GH (grey bars) and GHR (dark-
10 grey bars) animals at time points 10h (a), 16h (b), 22h (c) and 04h (d). ZT
11 means *Zeitgeber* time. Values are represented as means \pm SE, n = 5 per time
12 point. Different letters represent significant statistical differences among groups
13 for each gene in each time point ($p < 0.05$).

1 **Figures**
 2 **Figure 1**



1 Figure 2



1 **References**

- 2 Amaral, I. P.G., Johnston, I.A., 2012. Circadian expression of clock and putative
3 zebrafish clock-controlled genes in skeletal muscle of the zebrafish. *Am.*
4 *J.Physiol. Regul. Integr. Comp Physiol.* 302: R193-R206.
- 5 Aschoff, J., 1960. Exogenous and endogenous components in circadian
6 rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 25: 11-28.
- 7 Aschoff J. 1976. Circadian systems in man and their implications. *Hospital*
8 *Practice* 11(05), 51-57.
- 9 Bégay, V., Falcón, J., Cahill, G.M., Klein, D.C., Coon, S.L., 1998. Transcripts
10 encoding two melatonin synthesis enzymes in the teleost pineal organ:
11 circadian regulation in pike and zebrafish, but not in trout. *Endocrinology*
12 139, 905-912.
- 13 Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E.,
14 Thomas, T., Zoran, M., 2005. Circadian rhythm from multiple oscillators:
15 lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* 6: 544-556.
16 doi:10.1038/nrg1633. PubMed: 15951747.
- 17 Cahill, G.M., Besharse, J.C., 1995. Circadian rhythmicity in vertebrate retinas:
18 regulation by a photoreceptor oscillator. *Prog Retinal Eye Res* 14, 267-291.
- 19 Cahill, G.M., 1996. Circadian regulation of melatonin production in cultured
20 zebrafish pineal and retina. *Brain Res* 708, 177-181.
- 21 Cahill, G.M., Hurd, M.W., Batchelor, M.M., 1998. Circadian rhythmicity in the

- 1 locomotor activity of larval zebrafish. *Neuroreport*, 9, 3445–3449.
- 2 Cahill, G.M., 2002. Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res* 309: 27-34.
- 3 Canosa, L.F., Peter, R.E., 2005. Pre-pro-somatostatin-III may have cortistatin
4 like function in fish. *AnnNY Acad Sci.* 1040, 253–256.
- 5 Cermakian, N., Whitmore, D., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P., 2000.
6 Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal
7 differential clock control and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4339–
8 4344.
- 9 Dalmolin, C., Almeida, D.V., Azevedo, M.A., Marins, L.F., 2014a. Energy
10 delivery to the brain: effects of genotype and fasting in transgenic *zebrafish*
11 model overexpressing growth hormone. *Trans. Res.* (Submitted).
- 12 Dalmolin, C., Almeida, D.V., Azevedo, M.A., Marins, L.F., 2014b. GH-
13 transgenesis induces different mechanisms of appetite control in a sex-
14 dependent manner in *zebrafish*. *GCE* (Submitted).
- 15 DeBruyne, J.P., Weaver, D.R., Reppert, S.M., 2007. CLOCK and NPAS2 have
16 overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat. Neurosc.* 10,
17 543-545.
- 18 DeCoursey, P.J., 2004. The behavioral ecology and evolution of biological
19 timing systems. In: Dunlap J.C., Loros J.J., DeCoursey PJ (eds)
20 Chronobiology. Biological timekeeping. Sinauer Associates, Sunderland, pp
21 27-65.

- 1 Delaunay, F., Thisse, C., Marchand, O., Laudet, V., Thisse, B., 2000. An
2 inherited functional circadian clock in zebrafish embryos. *Science* 289, 297-
3 300.
- 4 Del Pozo, A., Sánchez-Férez, J. A., Sánchez-Vázquez, F. J., 2011. Circadian
5 Rhythms of Self-feeding and Locomotor Activity in Zebrafish (*Danio Rerio*).
6 *Chron. Int.*, 28(1), 39-47.
- 7 Dickmeis, T., K. Lahiri, G. Nica, D. Vallone, C. Santoriello, C.J. Neumann, M.
8 Hammerschmidt Foulkes, N.S., 2007. Glucocorticoids play a key role in
9 circadian cell cycle rhythms. *PLoS Biology* 5, e78.
- 10 Dunlap, J.C., 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96, 271-290.
- 11 Dunlap J.C., Loros, J.J., DeCoursey, P.J., 2004. *Chronobiology: Biological*
12 *Timekeeping*. Ed. Sinauer Associates, Inc.
- 13 Egg M., Tischler, A., Schwerte, T., Sandbichler, A, Folterbauer, C., Pelster B.,
14 2012. Endurance exercise modifies the circadian clock in zebrafish (*Danio*
15 *rerio*) temperature independently. *Acta Physiol*, 205,167-176
- 16 Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Proietti, M.C., Marins, L.F.,
17 2007a. The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation
18 in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem.*
19 *Physiol. Part D. Gen. Prot.* 2, 228-233.
- 20 Figueiredo M.A., Lanes C.F.C., Almeida D.V., Marins L.F., 2007b. Improving
21 the production of transgenic fish germline: in vivo mosaicism
22 evaluation by GFP transgene co-injection strategy. *Genet. Mol. Biol.*, 30,

- 1 31-36.
- 2 Figueiredo, M.A., Mareco, E.A., Silva, M.D.P., Marins, L.F., 2012. Muscle-
3 specific growth hormone receptor (GHR) overexpression induces
4 hyperplasia but not hypertrophy in transgenic zebrafish. *Transgenic*
5 *Research*, 21, 3, 457-469.
- 6 Gamse, J.T., Shen, Y.C., Thisse, C., Thisse, B., Raymond, P.A., Halpern, M.E.,
7 Liang, J.O., 2001. *Otx5* regulates genes that show circadian expression in
8 the zebrafish pineal complex. *Nat. Genet.* 30, 117-121.7
- 9 Gothilf, Y., Toyama, R., Coon, S.L., Du, S.J., Dawid, I.B. and Klein, D.C., 2002.
10 Pineal-specific expression of green fluorescent protein under the control of
11 the serotonin-N-acetyltransferase gene regulatory regions in transgenic
12 zebrafish. *Dev. Dyn.* 225, 241-249
- 13 Gomez, J.M., Boujard, T., Fostier, A., Le Bail, P.Y., 1996. Characterization of
14 growth hormone nycthermal plasma profiles in catheterized rainbow trout,
15 *Oncorhynchus mukiss*. *J. Exp. Zool.* 274, 171-180.
- 16 Hirayama, J., Fukuda, I., Ishikawa, T., Kobayashi, Y. and Todo, T., 2003. New
17 role of zCRY and zPER2 as regulators of sub-cellular distributions of
18 zCLOCK and zBMAL proteins. *Nuc. Ac. Res.* 31, 935–943.
- 19 Hurd, M.W., Debruyne, J., Straume, M., Cahill, G.M., 1998. Circadian rhythms
20 of locomotor activity in zebrafish. *Physiol. Behav.* 65, 465-472
- 21 Ishikawa, T., Hirayama, J., Kobayashi, Y. and Todo, T., 2002. Zebrafish CRY
22 represses transcription mediated by CLOCK-BMAL heterodimer without

1 inhibiting its binding to DNA. *Genes Cells* 7, 1073-1086.

2 Kaneko, M., Cahill, G.M., 2005. Light-dependent development of circadian gene
3 expression in transgenic *zebrafish*. *PLoS Biol.* 3, e34

4 Kaneko, M., Hernandez-Borsetti, N., Cahill, G.M., 2006. Diversity of zebrafish
5 peripheral oscillators revealed by luciferase reporting, *Proc. Natl. Acad. Sci.*
6 *USA* 103, 14614-14619.

7 Ko, C.H., Takahashi, J.S., 2006. Molecular components of the mammalian
8 circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15(2), R271–R277.

9 Kobayashi, Y., Ishikawa T., Hirayama J., Daiyasu H., Kanai S., Toh Hi., Fukuda
10 I., Tsujimura T., Terada N., Kamei Y., Yuba S., Iwai S., Todo T., 2000.
11 Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types
12 of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells* 5, 725-738.

13 Kojima D., Torii M., Fukada Y., Dowling J.E., 2008. Differential expression of
14 duplicated VAL-opsin genes in the developing zebrafish. *Journal of*
15 *neurochemistry* 104, 1364–1371.

16 Kulczykowska, E., Sánchez-Vázquez, F.J., 2010. Neurohormonal regulation of
17 feed intake and response to nutrients in fish: aspects of feeding rhythm and
18 stress. *Aquac. Res.* 41, 654–667

19 Lahiri, K., Vallone, D., Gondi, S.B., Santoriello, C., Dickmeis, T., Foulkes, N.S.,
20 2005. Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock.
21 *PLoS Biol.* 3, e351.

- 1 López-Olmeda, J.F., Sánchez-Vázquez, F.J., 2009. Zebrafish temperature
2 selection and synchronization of locomotor activity circadian rhythm to
3 ahemeral cycles of light and temperature. *Chronobiol. Int.*, 26(2), 200-218.
- 4 López-Olmeda, J.F., Montoya, A., Oliveira C, Sánchez-Vázquez F.J., 2009.
5 Synchronization to light and restricted-feeding schedules of behavioral and
6 humoral daily rhythms in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Chronobiol.*
7 *Int.* 26, 1389–1408.
- 8 López-Olmeda J. F., Tartaglione E. V., de la Iglesia H. O., Sánchez-Vázquez F.
9 J. 2010. Feeding entrainment of food-anticipatory activity and *per1*
10 expression in the brain and liver of zebrafish under different lighting and
11 feeding conditions. *Chronobiol. Int.*, 27(7), 1380–1400.
- 12 López-Olmeda, J. F., López-García I., Sánchez-Muros M. J., Blanco-Vives B.,
13 Aparicio R., Sánchez-Vázquez F. J., 2012. Daily rhythms of digestive
14 physiology, metabolism and behaviour in the European eel (*Anguilla*
15 *anguilla*). *Aquacult. Int.* 20, 1085–1096
- 16 Mracek, P., Santoriello, C., Idda, M.L., Pagano, C., Ben-Moshe, Z., Gothilf, Y.,
17 Vallone, D., Foulkes, N. S., 2012. Regulation of *per* and *cry* Genes Reveals
18 a Central Role for the D-Box Enhancer in Light-Dependent Gene
19 Expression. *PLoS ONE* 7(12), e51278. doi:10.1371/journal.pone.0051278.
- 20 Montoya, A., López-Olmeda, J.F., Garayzar, A.B.S., Sánchez-Vázquez, F.J.,
21 2010. Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma
22 glucose, cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream
23 (*Sparus aurata*) under a light-dark cycle. *Physiol. Behav.* 101, 101-107.

- 1 Moore-Ede, M.C., W.S., Schmelzer, D.A., Kass & J.A. Herd., 1976. Internal
2 organization of the circadian timing system in multicellular animals. Fed.
3 Proc. 35, 2333-2338.
- 4 Moore-Ede, M., Sulzman, F.M., Fuller, C.A., 1982. The Clocks That Time Us:
5 Physiology of the Circadian Timing System: Commonwealth Fund
6 Publications. Harvard University Press.
- 7 Oliveira C. C. V., Aparício, R., Blanco-Vives, B., Chereguini, O., Martín I.,
8 Sánchez-Vazquez, F. J., 2013. Endocrine (plasma cortisol and glucose)
9 and behavioral (locomotor and self-feeding activity) circadian rhythms in
10 Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) exposed to light/dark
11 cycles or constant light. *Fish Physiol. Biochem.* 39, 479–487.
- 12 Pando, M.P., Pinchak, A.B., Cermakian, N., Sassone-Corsi, P., 2001. A cell-
13 based system that recapitulates the dynamic light dependent regulation of
14 the vertebrate clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10178–10183.
- 15 Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L., 2002. Relative expression software tool
16 (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative
17 expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36
- 18 Postlethwait J.H., Yan Y-L., Gates M., Horne S., Amores A., Brownlie A.,
19 Donovan A., Egan E., Force A., Gong Z., Goutel C., Fritz A., Kelsh R.,
20 Knapik E., Liao E., Paw P., Ransom D., Singer A., Thomson M.,
21 Abduljabbar T.S., Yelick P., Beier D., Joly J-S., Larhammar D., Rosa F.,
22 Westerfield M., Zon L.I., Johnson S.L., Talbot W.S., 1998. Vertebrate
23 genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.* 18, 345-349.

1 Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht,
2 U., Schibler, U., 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERB α
3 controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian
4 circadian oscillator. *Cell*.110, 251-260.

5 Rosa, C.E., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Monserrat, J.M.,
6 Marins, L.F., 2008. Metabolic rate and reactive oxygen species
7 production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp.*
8 *Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 149, 209-214.

9 Rosa, C.E., Kuradomi, R.Y., Almeida, D.V., Lanes, C.F.C., Figueiredo,
10 M.A., Dytz, A.G., Fonseca, D.B., Marins, L.F., 2010. GH
11 overexpression modifies muscle expression of anti-oxidant enzymes
12 and increases spinal curvature of old zebrafish. *Exp. Gerontol.* 45, 449-
13 456.

14 Rosa, C.E., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Marins, L.F.,
15 2011. Genotype-dependent gene expression profile of the antioxidant
16 defense system (ADS) in the liver of a GH-transgenic zebrafish model.
17 *Transgenic Res.* 20, 85-89.

18 Sato, T.K., Panda, S., Miraglia, L.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P.,
19 Naik, K.A., FitzGerald, G.A., Kay, S.A., Hogenesch, J.B., 2004. A functional
20 genomicsstrategy reveals Rora as a component of the mammalian
21 circadian clock. *Neuron* 43, 527-537.

22 Shearman, L.P., Zylka, M.J., Reppert, S.M. and Weaver, D.R., 1999.
23 Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse

1 suprachiasmatic nucleus. *Neurosc.* 89, 387-397

2 Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the
3 comparative CT method. *Nat. Prot.* 3, 1101-1108.

4 Singh, A.K., Lal B., Pati A. K., 2009. Variability in the characteristics of ultradian
5 and circadian rhythms in plasma levels of growth hormone in the Indian
6 walking catfish, *Clarias batrachus*. *Biological Rhythm Research*. Vol. 40,
7 No. 3, June 2009, 211-221.

8 Studzinski, A.L., Almeida, D.V., Lanes, C.F., Figueiredo, M.A., Marins,
9 L.F., 2009. SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the
10 somatotrophic axis in liver of omozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio*
11 *rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 67-72.

12 Tamai, T.K., Young, L.C., Whitmore, D., 2007. Light signaling to the zebrafish
13 circadian clock by Cryptochrome 1a. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104,
14 14712-14717.

15 Vallone, D., Gondi, S.B., Whitmore, D., Foulkes, N.S., 2004. E-box function in a
16 period gene repressed by light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 4106-
17 4111.

18 Vatine, G., Vallone, D., Appelbaum, L., Mracek, P., Ben-Moshe, Z., Lahiri, K.,
19 Gothilf, Y. and Foulkes, N.S., 2009. Light directs zebrafish period2
20 expression via conserved D and E boxes. *PLoS Biol.* 7, e1000223

21 Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., Foulkes, N.S., 2011. It's time to swim!
22 Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett.* 585, 1485-1494.

- 1 Wang, H., 2008. Comparative analysis of teleost fish genomes reveals
2 preservation of different ancient clock duplicates in different fishes. *Mar*
3 *Genomics* 1, 69–78.
- 4 Wang, H., 2009. Comparative genomic analysis of teleost fish *bmal* genes.
5 *Genetica* 136, 149-161. *Genomics* 1, 69-78.
- 6 Westerfield M. *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish*
7 *Danio rerio*, 3rd edn. University of Oregon Press, Eugene, 1995.
- 8 Whitmore, D., Foulkes, N.S., Strahle, U., Sassone-Corsi, P. 1998. Zebrafish
9 clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian
10 oscillators. *Nat. Neurosci.* 1, 701-707.
- 11 Whitmore, D., Foulkes, N.S. Sassone-Corsi, P., 2000. Light acts directly on
12 organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 404,
13 87-91.
- 14 Ziv, L., Levkovitz, S., Toyama, R., Falcon, J., Gothilf, Y., 2005. Functional
15 development of the zebrafish pineal gland: light-induced expression of
16 period 2 is required for onset of the circadian clock. *J Neuroendocrinol* 17:
17 314-320.

4. Capítulo II

Artigo 2

Somatotropic axis transgenesis causes altered response to light as a Zeitgeber in zebrafish (*Danio rerio*)

Cruz, B.P.¹, Popiolek, P.², Gonçalves, B.S.B.³, Figueiredo, M.A.⁴, Da Rosa,
V.S.², Nery, L.E.M.¹, Marins, L.F.^{1,4}

¹ *Programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada; Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – Universidade Federal do Rio Grande (FURG, Brazil).*

² *Centro de Ciências Computacionais (C3) – Universidade Federal do Rio Grande (FURG, Brazil).*

³ *Instituto Federal Sudeste de Minas Gerais - Campus Barbacena.*

⁴ *Programa de Pós-graduação em Aquicultura; Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG, Brazil)*

* Author for correspondence: L.E.M. Nery. Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Itália, Km 8, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil. e-mail: luiznery@furg.br

Artigo a ser publicado na revista *Physiology and Behavior*

1 **Abstract**

2 The circadian rhythm of locomotor activity in *zebrafish* can be entrained and/or
3 modulated by a different *Zeitgebers* such as light, temperature and feeding
4 time. In the present work it was demonstrated that the transgenic *Danio rerio*
5 model overexpressing growth hormone (GH-transgenic), growth hormone
6 receptor (GHR-transgenic) and both (GH/GHR-transgenic), present altered
7 locomotor activity along the light-dark (LD) cycle. Differently from the picture
8 commonly observed in *zebrafish*, all groups presented an inverted pattern of
9 locomotor activity along the LD cycle, evincing higher activity during the night
10 phase and lower along the light phase. Only GH/GHR group presented
11 significant differences in the locomotor activity behavior. Significant higher
12 locomotor activity behavior along the 10 hours of higher activity and 5 hours of
13 lower activity (L5) were found. Although the relative activity during the night
14 phase was lower than in the other groups, similar values of Relative Rest (RR)
15 were observed, reflecting in lower relative amplitude. Furthermore, non-
16 transgenic (NT) animals submitted to a light pulse, at the middle of the dark
17 phase of the LD cycle, presented higher RR and lower L5 values, evincing
18 higher activity along the light phase. The altered behavior pattern observed for
19 transgenic animals could be caused by a direct action of GH or GHR or even by
20 a synergism of both on the signaling pathways controlling the expression of
21 genes from the circadian system, leading to a lower response to the main
22 *Zeitgeber* in *zebrafish*, the light, and higher response to other environmental
23 clues.

24 **Keywords:** *zebrafish*, growth-hormone, *Zeitgeber*, light-pulse, LD cycle

1 **1. Introduction**

2 Living forms, from unicellular to complex organisms such as mammals,
3 are under constant influence of environmental factors evincing cyclic patterns of
4 variation such as light, temperature and food availability. At some point during
5 evolution, the organisms have developed the ability to synchronize their
6 behavioral and metabolic activities to the environmental cycles, mainly to the
7 shifting between light and dark (LD) cycles, by developing an internal, self-
8 sustaining clock, with periodicity near 24 hours, which orchestrates their
9 rhythms, according to their geographical localization [1], and such ability
10 enabled living forms to optimize their responses and save energy by predicting
11 environmental changes [2].

12 Many studies involving locomotor activity rhythms of animals kept under
13 constant conditions have been developed aiming to understand the
14 physiological organization of different circadian systems in a wide range of
15 species [3-8]. Therefore, as in many other organisms, fish present behavioral
16 and physiological rhythms [8-11] occurring within a determined time interval
17 which, under constant laboratory conditions, have periodicity near 24 hours.
18 When organisms are into their natural environment, these rhythms are
19 entrained by specific clues, named *Zeitgebers* [12]. The main factor capable to
20 synchronize the circadian rhythms in animals is light, which is mediated by
21 photoreceptive organs able to respond to daily variations [13].

22 Regarding fish species, many other environmental factors, besides light
23 [8-10, 14], can entrain and/or modulate the circadian system of these animals,
24 such as temperature [14-16] and feeding [8, 17, 18]. The age [19] and light

1 intensity [20] have also been implicated to influence some aspects of behavioral
2 rhythms in fish. Concerning the experimental model *zebrafish*, the main
3 *Zeitgeber* capable to entrain the circadian system is light, which strongly
4 influences on the locomotor activity behavior [9, 10, 20-22]. Differently from
5 mammals, *zebrafish* appears to have a decentralized circadian clock, once the
6 presence of photoreceptive mechanisms, in peripheral organs and tissues, have
7 been observed, exhibiting robust patterns of circadian expression of genes
8 known to be activators and repressors from the circadian system [23-25].

9 Many studies have shown the influence of the circadian clock mechanism
10 on hormones release pattern, such as melatonin [26-29], cortisol [30, 31] and
11 growth hormone [32-34] of fish along the LD cycle. Besides, the rhythm
12 observed in peripheral organs could also be adjusted by endogenous factors
13 such cortisol [35]. Considering the available data regarding the *zebrafish*
14 response to different *Zeitgebers*, by setting the circadian clock system and the
15 pattern of hormone release, the present study aimed to verify if genetically
16 modified *D. rerio* for growth hormone production are able to maintain the
17 response to light, the main environmental *Zeitgeber* in the species. For that
18 goal, an internationally recognized (F0104) [36], a recently developed (MYO-
19 GHR) [37] lineage of transgenic *zebrafish* and the resulting brood from the
20 crossing between both were used in the present study. These animals have
21 been widely used by our research group (36-42] and, along almost a decade,
22 different locomotor activity behavior along the LD cycle has been noticed during
23 the maintenance of GH (F0104), GHR (MYO-GHR) and GH/GHR-transgenic
24 (crossing between GH and GHR lineages) animals (unpublished data).

1 Therefore, the aim of the present work was to verify the effects of growth
2 hormone (GH), growth hormone receptor (GHR) and both (GH/GHR)
3 overexpression on the locomotor activity of *zebrafish* (*Danio rerio*).

1 **2. Material and Methods**

2 *2.1. Animals*

3 The fish used in the present study were provided by the transgenic
4 fish vivarium from Universidade Federal do Rio Grande (FURG – RS, Brazil)
5 and were cultured within a water recirculation system according to Westerfield
6 [43] under room temperature of 28°C, with a 12 hours light: 12 hours dark
7 (12:12 LD) photoperiod (lights on 08:00 hours; lights off 20:00 hours; ZT0 =
8 08:00) and fed with commercial flake food twice a day at any time during the
9 light phase until satiety. Transgenic *zebrafish* were all from the same brood and
10 were obtained by mating of GH-transgenic (F0104 lineage) females and GHR-
11 transgenic (MYO-GHR lineage) males. Therefore, the brood consisted of four
12 genotypes comprising non-transgenic (NT), GH, GHR and GH/GHR transgenic
13 animals. Males and females with age of 9-10 months were used in the
14 procedures.

15 All experiments were conducted in compliance with the Ethics Committee
16 of Animal Use (Comitê de Ética em Uso Animal – CEUA – process number:
17 23116.005683/2013-12) from Universidade Federal do Rio Grande – FURG,
18 RS, Brazil.

19 *2.2. Recording Apparatus and conditions*

20 Twelve hours before starting the recording of locomotor activity, the
21 animals were transferred from the colony to the recording room. The room
22 temperature was fixed at 28°C with photoperiod 12L: 12D (Lights on 08:00).
23 The light source was white light bulbs directed to the walls, aiming to avoid

1 shadows in the arenas, and the illuminance during the light period, measured
2 right above the water inside the arenas, was approximately 460 lx. Animals
3 were individually placed into opaque plastic arenas with diameter of 14 cm. The
4 arenas were riddled, to allow water flow, and placed into a bath under constant
5 aeration and temperature of 26-28°C with water from the colony system up to 4
6 cm height, intending to avoid dislocation of animals in the water column. Four
7 animals from each lineage, one by arena, were recorded at a time. Animals
8 were not fed during the experiment.

9 A digital video camera recorder (Sony DCR-TRV8) was set on a tripod
10 and placed above the arenas. The camera was coupled to a computer to store
11 the video recording data. Each trial consisted of a 24-hour recording along the
12 LD cycle and, in a second experiment, a light pulse of 600 lx during one hour, in
13 the middle of the dark cycle (03:00), was applied in the assays intending to
14 verify the response of the animals when challenge by light pulses during the
15 dark phase. No disturbance to fish was noticed when changing the camera
16 settings to record in the dark or light.

17 *2.3. Data analysis*

18 Data acquisition: Intending to collect data from the video recording
19 experiments, a software capable of capturing the bi-dimensional positioning
20 coordinates of the subjects along the time was developed. The software,
21 developed in language C, analyses the recording data frame by frame. The
22 positioning coordinates are captured at each frame analyzed. The analysis
23 interactively applied to the video frames is realized according to the type of
24 environment light (including night vision resources). Before analysis, the frame

1 is treated with a low-pass spatial filter to improve its quality in the analysis
2 process. Subsequently, if the frame is from a diurnal video, it is segmented by
3 threshold method. Each pixel is labeled either as background or the body of the
4 animal. The same is applied in the nocturnal video recording data but, in this
5 case, the pixels labeling is applied based on the result of the subtraction of the
6 frame by a background image. After the pixels labeling by segmentation, the
7 pixels identified as part of the fish's body are re-evaluated. Those united by
8 connectivity-of-8, in consistent portions with the size of the animal body, are
9 considered as a representation of the subject body. This re-evaluation avoids
10 the dispersed residuals, generated by the fish, or artifacts originated from the
11 recording process, which are considered in the identification of the position
12 coordinates. The process of data collection using this software can be applied in
13 experiments involving controlled environments, with uniform background and
14 illumination, providing contrast and visibility of the fish. By the end of the
15 analysis, an archive with the position coordinates of the fish along time is
16 generated. These data are treated in MatLab software, aiming to eliminate the
17 noise by hysteresis. Also, the dislocation of the each fish in each time point is
18 calculated, allowing measuring the traveled distance in pixels along each 5
19 minutes.

20 The following variables, according to [44], were obtained using the data
21 extracted from the video recordings: 10 most active hours (M10), 5 least active
22 hours (L5), moment of M10 beginning (F10), moment of L5 beginning (F5),
23 relative amplitude (RA), responsiveness to light on (RL), relative activity (Act)
24 and relative rest (RR). The variable M10 was calculated by summing the
25 distance covered by each animal each five minutes along the LD cycle using a

1 fix window of 10 hours to find the highest value. The variable L5 was calculated
2 by summing the distance covered by each animal each five minutes along the
3 LD cycle using a fix window of 5 hours to find the lower value. The variable RA
4 was calculated by the equation $(M10-L5/M10+L5)$. The variable RL was
5 calculated by normalizing the sum of the distance covered by each animal, each
6 five minutes, from 08:35 to 08:45 (10 minutes of interval after 35 min from lights
7 on), by the total time of recording (1440min). The variable Act was calculated by
8 normalizing the sum of the distance covered by each animal, each five minutes,
9 from 00:10 am to 04:20 (middle period of night phase) by the total minutes of
10 recording (1440 min). The variable RR was calculated by normalizing the sum
11 of the distance covered by each animal, each five minutes, from 12:40 to 16:50
12 (middle period of light phase), by the total minutes of recording (1440 min). The
13 values obtained for these variables in the experiments involving normal LD
14 cycle were used as a parameter for the experiments applying a light pulse
15 during the dark phase.

16 Each of the mentioned variables calculated for locomotor activity was
17 submitted to Kolmogorov-Smirnov and Levene's tests confirming that 95% of
18 the data followed the assumptions of normality and homogeneity of variance.
19 Consecutively, one-way ANOVA was performed followed by Neuman-Keuls
20 *post-hoc* test and mathematical transformations were applied when necessary.

1 **3. Results**

2 *3.1. Light-Dark cycle experiments*

3 Regarding the animals submitted to one LD cycle, all fish (NT, GH, GHR
4 and GH/GHR-transgenic animals) presented a higher activity during the dark
5 phase (Figure 1). However, the activity level during the period of 10 hour of
6 higher activity (M10) was different among transgenic lineage. Although a slight
7 difference was shown for GHR animals, only GH and GH/GHR-transgenic
8 animals presented M10 values significantly higher when compared with control
9 group (Figure 2a). Similarly, the activity during the period of 5 hours of lower
10 activity (L5) was also different among transgenic lineages, but only GH/GHR-
11 transgenic animals evinced significantly increased activity during the resting
12 period (light phase) (Figure 2b). Regarding the relative activity (Act), the only
13 significant difference among transgenic groups was the lower Act found in
14 GH/GHR group (Figure 2c). Differently, GH/GHR group presented significant
15 higher levels in the relative rest (RR) (Figure 2d). These results point to a less
16 solid period of activity and rest, which is corroborated by significant lower
17 relative amplitude (RA) to GH/GHR group (figure 2e).

18 No significant differences were observed for F10 and F5 values, evincing
19 that the most and less active period of locomotor activity, respectively, started
20 near the same time for all animals in each group (data not shown). Besides, no
21 statistical differences were observed among the groups concerning the period
22 right after lights were turned on (RL), evincing that the animals were not
23 differently affected by this factor (data not shown).

1 3.2. *Light pulse experiments*

2 Once the most evident differences were observed between NT and
3 GH/GHR-transgenic animals in the previous experiments using 12L:12D
4 photoperiod, only these two groups were used in experiments applying a light
5 pulse during the dark phase.

6 When comparing the variables of animals kept under 12L:12D
7 photoperiod and those receiving a light pulse during the dark phase, significant
8 differences were observed in the locomotor activity pattern of both, NT and
9 GH/GHR-transgenic animals (Figure 3 a, b). Non-transgenic animals submitted
10 to a light pulse during the dark phase evinced increased activity during final
11 period of the light phase and, consequently, the values of L5 and RR were
12 significantly increased when compared with animals under 12L:12D regimen
13 (Figure 4 a, b).

14 GH/GHR-transgenic animals submitted to the same procedure presented
15 significantly lower value of L5 when compared with those under 12L:12D
16 photoperiod (Figure 4 c). Values of L5 reflects only the differences observed for
17 the period that each variable evaluates (5 less active consecutive hours), but
18 this variable disregards total activity along the day, once it is not normalized by
19 the total 24 hours analyzed. Therefore, the similar pattern observed for this
20 lineage observed in both experiments, with and without the light pulse during
21 the dark phase, is not considered in these analyses. No significant difference
22 was observed for RR values between GH/GHR-transgenic animals under
23 normal photoperiod and those submitted to the light pulse during the dark phase
24 (Figure 4d), evincing that these animals present the same activity level during

- 1 the resting period of the day (light phase) independently of the light pulse
- 2 applied in the night period.

1 4. Discussion

2 Locomotor activity behavior has been frequently used as a circadian
3 clock output in several studies. Considering fish species, different patterns of
4 locomotor activity have been documented aiming to understand the responses
5 to diverse *Zeitgebers* such as temperature, feeding time and light [8-11, 16, 45-
6 47]. Although marked rhythms of locomotor activity are observed in fish, these
7 animals can present dual behavior along their lives, once shifting from diurnal to
8 nocturnal behavioral patterns are displayed, sometimes, even by the same
9 individual [48, 49] and such dual pattern has been widely reported in many
10 species [50]. This dual behavior has been implied to be an adaptation
11 mechanism to quick environmental changes [16, 51].

12 *Zebrafish* exhibit typical diurnal locomotor activity rhythm. Since the
13 pioneer experiments of Hurd and co-workers [10], involving locomotor activity
14 rhythm response to light and temperature, many other researchers have
15 presented the same locomotor activity pattern while trying to elucidate the
16 strength and mechanisms underlying the response to other *Zeitgebers* [16, 18,
17 22, 46, 47, 52]. Interestingly, in the present work the opposite situation was
18 observed. All animals from transgenic (GH, GHR and GH/GHR) and non-
19 transgenic (NT) groups demonstrated a pattern of higher locomotor activity
20 during the dark phase of the LD cycle (Figure 1). Such difference can be
21 attributed to the plasticity described in recent studies for *zebrafish*, which could
22 be considered a dual species and not strictly diurnal [16, 46, 47].

23 Although the opposite pattern of locomotor activity along the LD cycle
24 observed in the present study for all experimental groups, differences were

1 observed between the dark and light phases for all groups (Figure 1). Control
2 group (NT) evinced differences between light and dark phase (Figure 1 a) as
3 confirmed by M10, L5 and RA values (Figure 2 a, b, e). These data
4 characterized the dark phase as the activity period and the light phase as the
5 resting period (Figure 2 c, d). Such differences in the amplitude of locomotor
6 activity along the LD cycle are commonly observed in animals undergoing
7 normal LD cycles [16, 18, 22, 46, 47, 52].

8 Concerning the differences in locomotor activity pattern among groups
9 submitted to photoperiod 12L:12D, although a slight increase was observed in
10 GH and GHR-transgenic animals (Figure 1 b, c), when compared with NT, only
11 GH/GHR-transgenic animals presented significant higher activity during the light
12 phase (Figure 1 d, e). Although an increased M10 value was observed for GH
13 group when compared with NT (Figure 2 a), no significant differences were
14 observed among NT, GH and GHR-transgenic animals for all analyzed
15 parameters of locomotor activity. However, the apparent increase in L5, Act and
16 RR (Figure 2 b, c, d) and decrease in RA (Figure 2 e) values of GH and GHR
17 animals should be noticed. Except for M10 values, GH/GHR group presented
18 significant differences for all the remaining variables when compared with NT,
19 GH and GHR groups (Figure 2). The increased L5 and RR values (Figure 2 b,
20 d), points to a deficient resting state in these animals, also evinced by Act
21 values close to RR, leading to diminished relative amplitude (Figure 2 e).

22 Direct effect of GH on the signaling pathways controlling the expression
23 of genes involved in the circadian system could also be occurring in the
24 transgenic animals. More likely, the pronounced differences observed in

1 GH/GHR group could be attributed to a synergic effect of both, growth hormone
2 and growth hormone receptor overexpression in the same animal. However,
3 evidence of higher metabolic level have been already documented for GH-
4 transgenic animals, such as higher growth rate and gene expression levels of
5 GHR and IGF-I in liver [38], higher levels of oxygen consumption and reactive
6 species of oxygen production [39, 41], the energetic cost of a downregulation
7 mechanism in the somatotropic axis [42], early senility [39] and increased
8 hexokinase gene expression, besides higher food intake [53, 54]. Concerning
9 GHR-transgenic animals, hyperplasia has been shown for this lineage in the
10 skeletal muscle, which also suggests higher energy expenditure in the
11 production of new muscular cells. Therefore, the differences in the locomotor
12 activity behavior observed in GH/GHR-transgenic animals could have been
13 caused by alterations in the metabolism of these animals, triggered by the
14 excess of GH.

15 Once the response to light is slightly decreased in GH and GHR group
16 and strongly diminished in GH/GHR animals, it seems that the circadian system
17 of these animals might be entrained by another *Zeitgeber* different from light.
18 Non-transgenic animals submitted to a light pulse in the middle of the dark
19 phase presented increased activity during the final period of light phase (Figure
20 3a) compared with animals submitted to 12L:12D photoperiod. Although these
21 animals presented an opposite pattern of locomotor activity along the LD cycle,
22 they were responsive to switching on of lights, as observed by Blanco-Vives
23 and Sánchez-Vázquez [22] when studying the existence of circadian spawning
24 and activity rhythms *D. rerio* and their synchronization to different light and
25 feeding cycles. In the mentioned study, there were applied dark pulses of one

1 hour, but decreased locomotor activity was observed after lights were off and
2 increased after lights were switched on. The values of L5 and RR show
3 significant differences between animals submitted to the light pulse and those
4 undergoing 12L:12D photoperiod, confirming the responsiveness of the control
5 group to light (Figure 4 a, b). Although significant decreased value of L5 (Figure
6 4c) was found for the animals submitted to the light pulse experiment, total
7 activity along the day is not considered, therefore masking the similar pattern
8 observed for both GH/GHR-transgenic animals under 12L:12D photoperiod and
9 light pulse regimen. The similar pattern of locomotor activity between these
10 groups can be verified by similar relative rest (RR) found (Figure 4d). These
11 results suggest that GH/GHR-transgenic animals are less responsive to the
12 strongest *Zeitgeber* known so far to *zebrafish*, the light.

13 However, despite all the altered responses of transgenic animals to the
14 LD cycle observed in the present study, it should be considered that *zebrafish*
15 present physiological changes caused by aging, such as diminished sleep-like
16 state, probably related to the decrease in melatonin production [19, 55].
17 Besides, many studies have reported that *zebrafish* circadian system can be
18 influenced by other factors, such as temperature [17], feeding time [8] and age
19 [19]. Therefore, the altered responses to light of GH/GHR-transgenic animals
20 shown in this work could be associated with early senility as observed in GH-
21 transgenic animals, probably caused by the decrease of antioxidant defenses,
22 previously reported for these last [40].

23 The present work shows evidence that somatotropic axis transgenesis in
24 *zebrafish* causes altered response to the LD cycle, suggesting that GH could be

- 1 an endogenous factor involved the regulation of the circadian system, once GH
- 2 and GHR overexpression leads to a diminished response to light, the main
- 3 *Zeitgeber* in *zebrafish*.

1 **Acknowledgements**

2 The authors would like to thank Glaucio Magalhães Sequeira and
3 Guilherme Granada, who kindly conceded the recording equipment. This work
4 was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
5 Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
6 Nível Superior). L. F. Marins is a research fellow from CNPq (Proc. No.
7 304675/2011-3).

1 **Figure Captions**

2 **Figure 1:** Locomotor activity profile of non-transgenic (a), GH-transgenic (b),
3 GHR-transgenic (c) and GH/GHR-transgenic animals (d) kept under a 12L:12D
4 LD cycle (460 lx) along one day. Each line represents one animal. Locomotor
5 activity values are given by the sum of the number of pixels in which the image
6 of each animal was captured each 30 minutes. The comparison of the
7 locomotor activity profile among all groups is shown in (e) by the mean of
8 locomotor activity values of all animals each 30 minutes in each group. Black
9 bars represent the dark phase and white bars represent the light phase of the
10 LD cycle. ZT means *Zeitgeber* Time and DT means Day Time.

11 **Figure 2:** Comparison among groups of animals kept under a 12L:12D LD cycle
12 using the calculated variables extracted from the video recording data. Data
13 with no significant differences were not plotted. (a) 10 most active hours. (b) 5
14 least active hours. (c) Relative Activity. (d) Relative Rest. (e) Relative
15 Amplitude. NT = non-transgenic animals (n = 6), GH = GH-transgenic animals
16 (n = 8), GHR = GHR-transgenic animals (n = 9) and GH/GHR = GH/GHR-
17 transgenic animals (n = 8). Values are means \pm SE. Different letters evince
18 statistical differences ($p < 0.05$).

19 **Figure 3:** Locomotor activity profile of non-transgenic (a) and GH/GHR-
20 transgenic animals (b) kept under a 12L:12D LD cycle (460 lx), and receiving a
21 light pulse during one hour in the middle of the dark phase (600 lx) along one
22 day. Each line represents the mean locomotor activity values of all animals in
23 each group each 30 minutes. Locomotor activity values are given by the sum of
24 the number of pixels in which the image of each animal was captured each 30

1 minutes. Horizontal black bars represent the dark phase and horizontal white
2 bars represent the light phase of the LD cycle. Vertical white bars represent the
3 period of the light-pulse. ZT means *Zeitgeber* Time and DT means Day Time.

4 **Figure 4:** Comparison between animals under 12L:12D photoperiod (grey bars
5 for NT animals and black bars for GH/GHR-transgenic animals) and those
6 receiving a light pulse in the middle of the dark phase (white bars in each group)
7 using the calculated variables extracted from the video recording data. NT =
8 non-transgenic animals (n = 4) and GH/GHR = GH/GHR-transgenic animals (n
9 = 7). Data with no significant differences were not plotted. L5 = 5 least active
10 hours, RR = Relative Rest, M10 = 10 most active hours and RA = Relative
11 Amplitude. Values are means \pm SE. Asterisks evince statistical differences ($p <$
12 0.05).

Figures

Figure 1

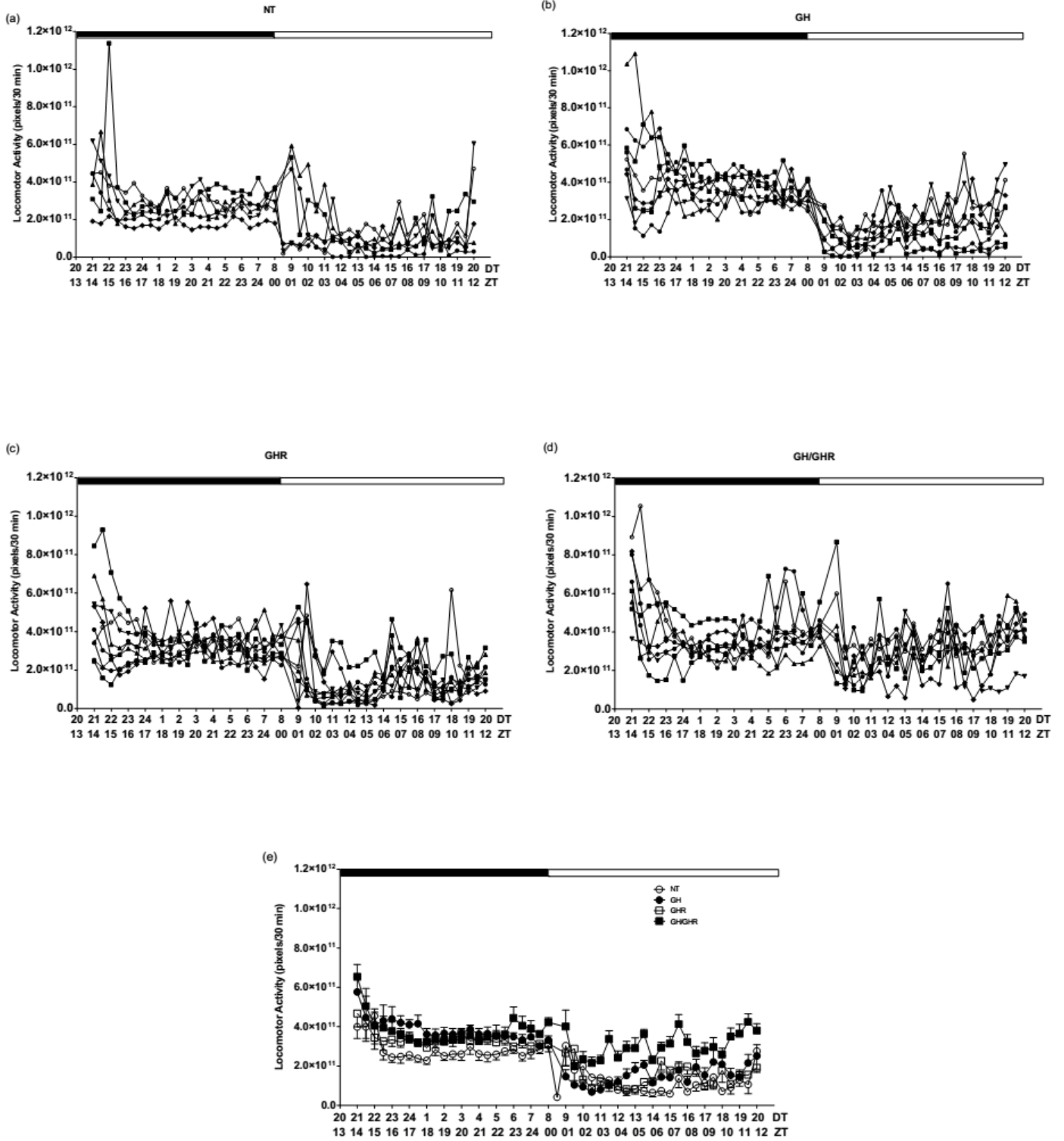


Figure 2

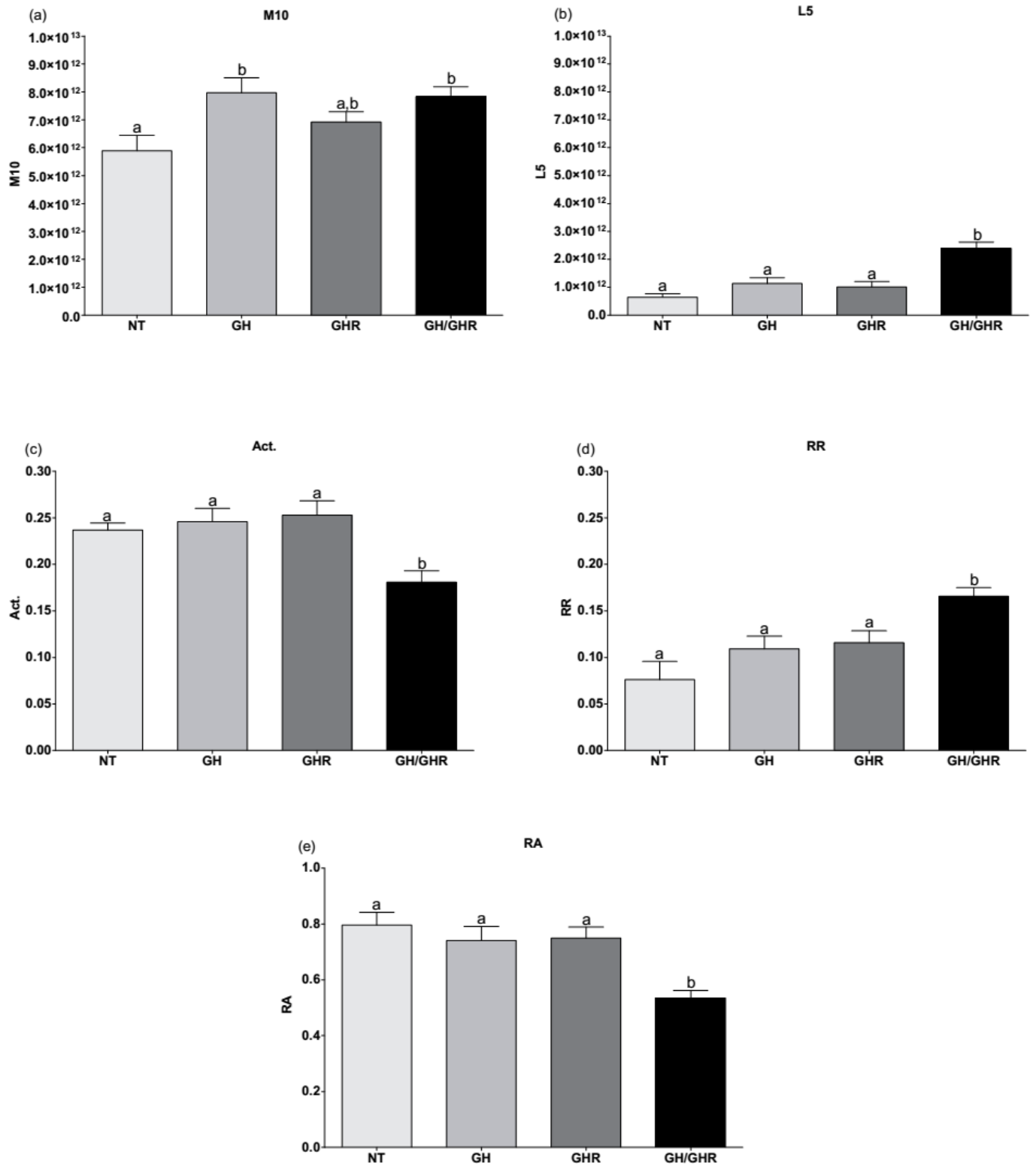


Figure 3

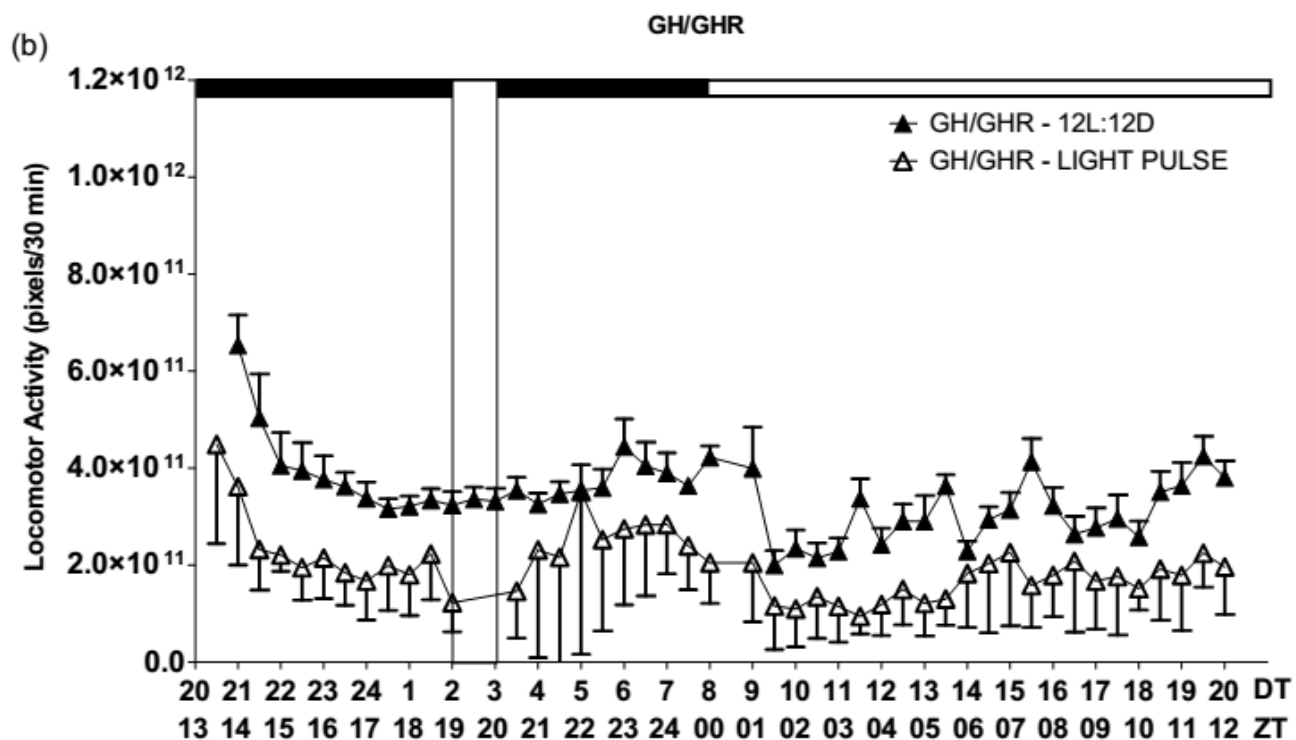
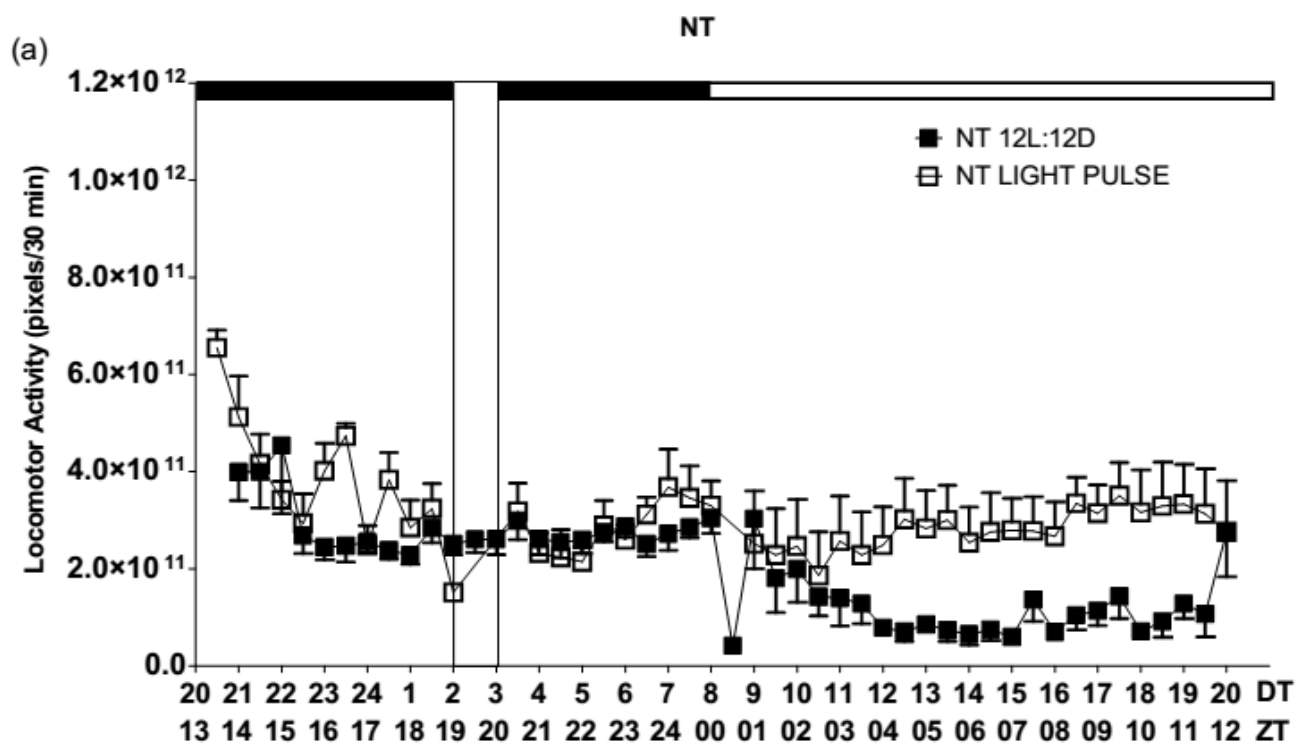
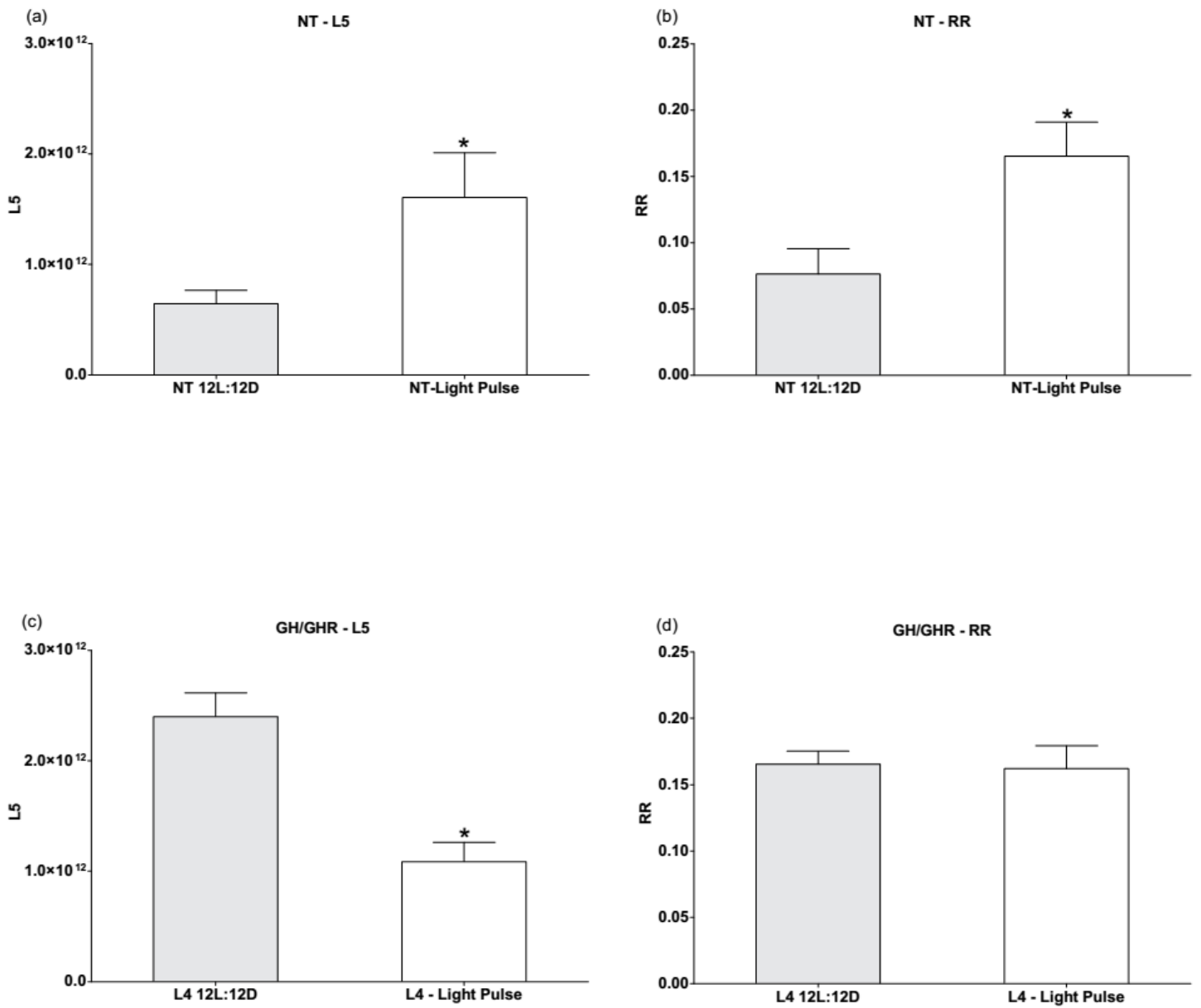


Figure 4



References

- 1 [1] Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. Chronobiology: biological timekeeping.
2 Sinauer Associates: Sunderland, MA, 2004.
- 3 [2] DeCoursey PJ. The behavioral ecology and evolution of biological timing
4 systems. In: Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ (eds.). Chronobiology.
5 Biological timekeeping. Sinauer Associates, Sunderland, 2004, pp. 27–65.
- 6 [3] Pittendrigh CS, Daan S. A functional analysis of circadian pacemakers in
7 nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. J.
8 Comp. Physiol., A, 1976, 106: 333–355.
- 9 [4] Takahashi JS, Menaker M. Physiology of avian circadian pacemakers. Fed.
10 Proc., 1979, 38: 2583–2588.
- 11 [5] Underwood H. Circadian organization in the lizard *Anolis carolinensis*: A
12 multioscillator system. J. Comp. Physiol., 1983, 152: 265–274.
- 13 [6] Ramteke AK, Poddar P, Pati AK. Circadian rhythms of locomotor activity in
14 Indian walking catfish, *Clarias batrachus*. Biological Rhythm Research,
15 2008, 40(3): 201–209.
- 16 [7] Martin AM, Elliott JA, Duffy P, Blake CM, Ben Attia S, Katz LM, Browne JA,
17 Gath V, McGivney BA, Hill EW, Murphy BA. Circadian regulation of
18 locomotor activity and skeletal muscle gene expression in the horse. J.
19 Appl. Physiol., 2010, 109: 1328–1336.
- 20 [8] López-Olmeda JF, López-García I, Sánchez-Muros MJ, Blanco-Vives B,

- 1 Aparicio R, Sánchez-Vázquez FJ. Daily rhythms of digestive physiology,
2 metabolism and behaviour in the European eel (*Anguilla anguilla*).
3 Aquacult. Int., 2012, 20: 1085–1096.
- 4 [9] Cahill GM, Hurd MW, Batchelor MM. Circadian rhythmicity in the locomotor
5 activity of larval zebrafish. Neuroreport, 1998, 9: 3445–3449.
- 6 [10] Hurd MW, Debruyne J, Straume M, Cahill GM. Circadian rhythms of
7 locomotor activity in zebrafish. Physiol. Behav., 1998, 65: 465–472.
- 8 [11] Oliveira CCV, Aparicio R, Blanco-Vives B, Chereguini O, Martín I,
9 Sánchez-Vázquez FJ. Endocrine (plasma cortisol and glucose) and
10 behavioral (locomotor and self-feeding activity) circadian rhythms in
11 Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) exposed to light/dark
12 cycles or constant light. Fish Physiol. Biochem., 2013, 39: 479–487.
- 13 [12] Aschoff, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms.
14 Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1960, 25: 11-28.
- 15 [13] Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE et al.,
16 Circadian rhythms from multiple oscillators: Lessons from diverse
17 organisms. Nat. Rev. Genet., 2005, 6(7): 544–556.
- 18 [14] López-Olmeda JF, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ. Light and temperature
19 cycles as zeitgebers of zebrafish (*Danio rerio*) circadian activity rhythms.
20 Chronobiol. Int., 2006, 23: 537–550.
- 21 [15] Lahiri K, Vallone D, Gondi SB, Santoriello C, Dickmeis T, Foulkes NS.
22 Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock. PLoS

- 1 Biol., 2005, 3: e351.
- 2 [16] López-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ. Zebrafish temperature selection
3 and synchronization of locomotor activity circadian rhythm to ahemeral
4 cycles of light and temperature. *Chronobiol. Int.*, 2009, 26(2): 200–218.
- 5 [17] Sanchez JA, Lopez-Olmeda JF, Blanco-Vives B, Sanchez-Vazquez FJ.
6 Effects of feeding schedule on locomotor activity rhythms and stress
7 response in sea bream. *Physiol. Behav.*, 2009, 98: 125–129.
- 8 [18] Sanchez JA, Sanchez-Vazquez FJ. Feeding entrainment of daily rhythms
9 of locomotor activity and clock gene expression in zebrafish brain.
10 *Chronobiol. Int.*, 2009, 26(6): 1120–1135.
- 11 [19] Zhdanova IV, Yu L, Lopez-Patino M, Shang E, Kishi S. Aging of the
12 circadian system in zebrafish and the effects of melatonin on sleep and
13 cognitive performance. *Brain Res. Bull.*, 2008, 75(2–4): 433–441.
- 14 [20] Li L, Dowling JE. Zebrafish visual sensitivity is regulated by a circadian
15 clock. *Vis. Neurosci.*, 1998, 15: 851–857.
- 16 [21] Emran F, Rihel J, Dowling JE. A Behavioral Assay to Measure
17 Responsiveness of Zebrafish to Changes in Light Intensities. *J. Vis. Exp.*,
18 2008, 20: e923.
- 19 [22] Blanco-Vives B, Sanchez-Vazquez FJ. Synchronisation to light and feeding
20 time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish.
21 *Physiol. Behav.*, 2009, 98: 268 –275.

- 1 [23] Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Light acts directly on organs
2 and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature*, 2000, 404:
3 87–91.
- 4 [24] Pando MP, Pinchak AB, Cermakian N, Sassone-Corsi P. A cell-based
5 system that recapitulates the dynamic light dependent regulation of the
6 vertebrate clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 10178–10183.
- 7 [25] Amaral IPG, Johnston IA. Circadian expression of clock and putative
8 zebrafish clock-controlled genes in skeletal muscle of the zebrafish. *Am. J.*
9 *Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2012, 302: R193–R206.
- 10 [26] Cahill GM, Besharse JC. Circadian rhythmicity in vertebrate retinas:
11 regulation by a photoreceptor oscillator. *Prog. Retinal Eye Res.*, 1995, 14:
12 267–291.
- 13 [27] Cahill GM. Circadian regulation of melatonin production in cultured
14 zebrafish pineal and retina. *Brain Res.*, 1996, 708: 177–181.
- 15 [28] Bégay V, Falcón J, Cahill GM, Klein DC, Coon SL. Transcripts encoding
16 two melatonin synthesis enzymes in the teleost pineal organ: circadian
17 regulation in pike and zebrafish, but not in trout. *Endocrinology*, 1998, 139:
18 905–912.
- 19 [29] Gamse JT, Shen YC, Thisse C, Thisse B, Raymond PA, Halpern ME, Liang
20 JO. *Otx5* regulates genes that show circadian expression in the zebrafish
21 pineal complex. *Nat. Genet.*, 2001, 30: 117–121.
- 22 [30] Kulczykowska E, Sánchez-Vázquez FJ. Neurohormonal regulation of feed

- 1 intake and response to nutrients in fish: aspects of feeding rhythm and
2 stress. *Aquac. Res.*, 2010, 41: 654–667.
- 3 [31] Montoya A, López-Olmeda JF, Garayzar ABS, Sánchez-Vázquez FJ.
4 Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose,
5 cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus*
6 *aurata*) under a light-dark cycle. *Physiol. Behav.*, 2010, 101: 101–107.
- 7 [32] Gomez JM, Boujard T, Fostier A, Le Bail PY. Characterization of growth
8 hormone nycthermal plasma profiles in catheterized rainbow trout,
9 *Oncorhynchus mukiss*. *J. Exp. Zool.*, 1996, 274: 171–180.
- 10 [33] Canosa LF, Peter RE. Pre-pro-somatostatin-III may have cortistatin like
11 function in fish. *AnnNY Acad. Sci.*, 2005, 1040: 253–256.
- 12 [34] Singh AK, Lal B, Pati AK. Variability in the characteristics of ultradian and
13 circadian rhythms in plasma levels of growth hormone in the Indian walking
14 catfish, *Clarias batrachus*. *Biological Rhythm Research*, 2009, 40(3): 211–
15 221
- 16 [35] Dickmeis T, Lahiri K, Nica G, Vallone D, Santoriello C, Neumann CJ,
17 Hammerschmidt M, Foulkes NS. Glucocorticoids play a key role in
18 circadian cell cycle rhythms. *PLoS Biology*, 2007, 5: e78.
- 19 [36] Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Marins LF. Improving the
20 production of transgenic fish germline: in vivo mosaicism evaluation
21 by GFP transgene co-injection strategy. *Genet. Mol. Biol.*, 2007, 30: 31-36.
- 22 [37] Figueiredo MA, Mareco EA, Silva MDP, Marins LF. Muscle-specific

- 1 growth hormone receptor (GHR) overexpression induces hyperplasia but
2 not hypertrophy in transgenic zebrafish. *Transgenic Research*, 2012,
3 21(3): 457-469.
- 4 [38] Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Proietti MC, Marins LF. The effect
5 of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different
6 genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part D
7 Genomics Proteomics*, 2007, 2: 228-233.
- 8 [39] Rosa CE, Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Monserrat JM, Marins
9 LF. Metabolic rate and reactive oxygen species production in different
10 genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. B.
11 Biochem. Mol. Biol.*, 2008, 149: 209-214.
- 12 [40] Rosa CE, Kuradomi RY, Almeida DV, Lanes CFC, Figueiredo MA, Dytz
13 AG, Fonseca DB, Marins LF. GH overexpression modifies muscle
14 expression of anti-oxidant enzymes and increases spinal curvature of
15 old zebrafish. *Exp. Gerontol.*, 2010, 45: 449-456.
- 16 [41] Rosa CE, Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Marins LF. Genotype-
17 dependent gene expression profile of the antioxidant defense system
18 (ADS) in the liver of a GH-transgenic zebrafish model. *Transgenic Res.*,
19 2011, 20: 85-89.
- 20 [42] Studzinski AL, Almeida DV, Lanes CF, Figueiredo MA, Marins LF. SOCS1
21 and SOCS3 are the main negative modulators of the somatotrophic axis in
22 liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Gen. Comp.
23 Endocrinol.*, 2009, 161: 67-72.

- 1 [43] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of
2 zebrafish *Danio rerio*, 3rd edn. University of Oregon Press, Eugene, 1995.
- 3 [44] Witting W, Kwa IH, Eikelenboom P, Mirmiran M, Swaab DF. Alterations in
4 the Circadian Rest-Activity Rhythm in Aging and Alzheimer's Disease. *Biol.*
5 *Psyc.*, 1990, 27: 563-572.
- 6 [45] López-Olmeda JF, Montoya A, Oliveira C, Sánchez-Vázquez FJ.
7 Synchronization to light and restricted-feeding schedules of behavioral and
8 humoral daily rhythms in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Chronobiol.*
9 *Int.*, 2009, 26: 1389–1408.
- 10 [46] López-Olmeda JF, Tartaglione EV, de la Iglesia HO, Sánchez-Vázquez FJ.
11 Feeding entrainment of food-anticipatory activity and *per1* expression in the
12 brain and liver of zebrafish under different lighting and feeding conditions.
13 *Chronobiol. Int.*, 2010, 27(7): 1380–1400.
- 14 [47] Del Pozo A, Sánchez-Férez JA, Sánchez-Vázquez FJ. Circadian Rhythms
15 of Self-feeding and Locomotor Activity in Zebrafish (*Danio rerio*).
16 *Chronobiol. Int.*, 2011, 28(1): 39–47.
- 17 [48] Sánchez-Vázquez, F.J., J.A. Madrid and S. Zamora. Circadian rhythms of
18 feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L: dual phasing capacity
19 of diel demand feeding pattern. *Journal of Biological Rhythms*, 1995, 10:
20 256–266.
- 21 [49] Vera, L.M., J.A. Madrid and F.J. Sánchez-Vázquez. Locomotor, feeding
22 and melatonin daily rhythms in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*).

- 1 Physiology and Behavior, 2006, 88: 167–172
- 2 [50] Eriksson, L.O., Nocturnalism versus diurnalism–dualism within fish
3 individuals. In: Thorpe, J.E. (Ed.), Rhythmic Activity of Fishes. Academic
4 Press, London,UK, 1978, pp. 69–90.
- 5 [51] Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Iigo M, Tabata M. Demand
6 feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*:
7 dual and independent phasing. *Physiol. Behav.*, 1996, 60: 665–674.
- 8 [52] Hurd MW, Cahill GM. Entraining signals initiate behavioral circadian
9 rhythmicity in larval zebrafish. *J. Biol. Rhythms*, 2002, 17: 307–31.
- 10 [53] Dalmolin C., Almeida D.V., Azevedo M.A., Marins L.F. Energy delivery to
11 the brain: effects of genotype and fasting in transgenic *zebrafish* model
12 overexpressing growth hormone. *Trans. Res.* (Unpublished results).
- 13 [54] Dalmolin C., Almeida D.V., Azevedo M.A., Marins L.F. GH-transgenesis
14 induces different mechanisms of appetite control in a sex-dependent
15 manner in *zebrafish*. *GCE*. (Unpublished results).
- 16 [55] Tsai SB, Tucci J, Uchiyama J, Fabian NJ, Lin MC, Zhdanova IV, Kishi S.
17 Differential effects of genotoxic effects on both concurrent body growth and
18 gradual senescence in adult zebrafish. *Aging Cell*, 2007, 6: 209–224.

5. DISCUSSÃO GERAL

1 Ritmos de atividade locomotora em *Danio rerio* podem ser arrastados por
2 uma ampla gama de *Zeitgebers* tais como luz, temperatura e disponibilidade de
3 alimento (Hurd *et al.*, 1998; Cahill *et al.*, 1998; López-Olmeda *et al.*, 2009;
4 López-Olmeda and Sánchez-Vázquez 2009; López-Olmeda *et al.*, 2010; Del
5 Pozo *et al.*, 2011; López-Olmeda *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013). Além disso,
6 diferentemente do que é observado em mamíferos, *zebrafish* parece ter um
7 relógio circadiano descentralizado, onde diversos tecidos periféricos são
8 responsivos diretamente à luz, o *Zeitgeber* com maior capacidade de ajustar o
9 mecanismo circadiano nesta espécie (Pando *et al.* 2001; Whitmore *et al.*, 2000;
10 Vallone *et al.*, 2004; Vatine *et al.*, 2009; Amaral e Johnston, 2012; Mracek *et al.*,
11 2012). A atividade locomotora tem sido usada freqüentemente como uma
12 resposta capaz de refletir a variação dos osciladores internos em resposta a
13 diferentes agentes arrastadores. Sendo assim, diferentes padrões de atividade
14 locomotora já foram descritos na tentativa de entender as respostas a
15 diferentes *Zeitgebers* (Hurd *et al.*, 1998; Cahill *et al.*, 1998; López-Olmeda *et*
16 *al.*, 2009; López-Olmeda e Sánchez-Vázquez 2009; López-Olmeda *et al.*, 2010;
17 Del Pozo *et al.*, 2011; López-Olmeda *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013).

18 Estudos prévios já demonstraram o padrão de expressão de genes das
19 alças do sistema circadiano em diferentes tecidos de *zebrafish*, tais como
20 cérebro, pineal, olhos, fígado, baço, rins, coração ao longo do ciclo claro-
21 escuro (Whitmore *et al.*, 1998; Cermakian *et al.*, 2000) e, recentemente, em
22 músculo esquelético (Amaral e Johnston, 2012). Nosso estudo demonstrou que
23 animais geneticamente modificados, superexpressando o hormônio de
24 crescimento (GH) e/ou o seu receptor (GHR), apresentam uma diminuição dos

1 níveis de expressão dos genes das alças positiva, principalmente das
2 paralogas de *clock*, e negativa, principalmente das paralogas de *per*, em
3 relação ao grupo controle (não-transgênicos – NT). A diminuição na expressão
4 destes genes ocorreu, em geral, quando deveriam estar ocorrendo os seus
5 picos de expressão em músculo esquelético, de acordo com Amaral e Johnston
6 (2012). As alterações encontradas na expressão dos genes do maquinário
7 circadiano nos grupos GH e GHR podem estar relacionadas às evidências
8 demonstradas de um nível metabólico alterado nestes animais, principalmente
9 na linhagem de animais GH-transgênicos, apresentando maiores taxa de
10 crescimento e níveis de expressão de GHR e IGF-I no fígado (Figueiredo *et al.*,
11 2007), maior consumo de oxigênio alta redução de espécies reativas de
12 oxigênio (ROS) (Rosa *et al.*, 2008, 2011), maior custo energético na via de
13 regulação negativa do eixo somatotrópico (Studzinski *et al.*, 2009) e senilidade
14 precoce (Rosa *et al.*, 2008) e aumento da expressão gênica de hexoquinases,
15 além de uma maior ingestão de alimento (Dalmolin *et al.*, 2014). Considerando
16 a linhagem de animais GHR-transgênicos, pode-se inferir que a hiperplasia
17 observada nestes animais (Figueiredo *et al.*, 2011) poderia estar levando à um
18 custo energético elevado e, portanto, à um estado metabólico alterado.
19 Diferentemente, as alterações na expressão dos genes do maquinário
20 circadiano poderiam estar sendo ocasionadas devido a um efeito direto do
21 excesso de GH sobre as vias de sinalização que controlam a expressão dos
22 genes envolvidos no sistema circadiano no músculo esquelético de *D. rerio*.

23 Portanto, uma diminuição na amplitude do padrão de expressão dos genes
24 mencionados provavelmente deve estar ocorrendo, ao longo do ciclo claro
25 escuro, possivelmente acarretando em uma diminuição na resposta destes

1 animais ao principal agente arrastador em *zebrafish*, a luz. Além disso, foi
2 levantada a hipótese de existir um efeito sinérgico do GH e do GHR quando
3 superexpressos no mesmo animal, no caso do cruzamento entre as duas
4 linhagens, acentuando os efeitos observados sobre a expressão do maquinário
5 de relógio de *zebrafish*.

6 Partindo da premissa de que os animais geneticamente modificados
7 seriam menos responsivos à luz, ensaios comportamentais de atividade
8 locomotora foram realizados visando verificar se as alterações no padrão de
9 expressão dos genes do sistema circadiano estariam causando alterações no
10 ritmo de atividade locomotora destes animais. Apesar de *D. rerio* ter sido
11 comumente descrito como um animal com hábito diurno de atividade
12 locomotora (Hurd *et al.*, 1998; Hurd and Cahill, 2002; Blanco-Vives and
13 Sánchez-Vázquez, 2009; López-Olmeda and Sánchez-Vázquez, 2009;
14 Sanchez and Sánchez-Vázquez; 2009; López-Olmeda *et al.*, 2010; Del Pozo *et*
15 *al.*, 2011), o presente estudo apresentou um padrão inverso para todos os
16 grupos de animais, transgênicos e não-transgênicos, ao normalmente
17 observado, ou seja, com um nível de atividade locomotora mais elevado
18 durante a fase escura do ciclo claro-escuro. De fato, esta plasticidade na
19 ritmicidade de *zebrafish* foi recente documentada, sendo considerada, portanto,
20 uma espécie dual (López-Olmeda and Sánchez-Vázquez, 2009; López-Olmeda
21 *et al.*, 2010; Del Pozo *et al.*, 2011).

22 Apesar de variações terem sido observadas no padrão de atividade
23 locomotora ao longo do ciclo claro-escuro nos grupos GH e GHR, apenas os
24 animais GH/GHR-transgênicos apresentaram aumento significativo de

1 atividade durante a fase clara quando comparados ao grupo NT. Nestes
2 animais, os maiores valores para L5 (5 horas de menor atividade,
3 correspondente à soma da distância percorrida por cada animal a cada 5 min
4 neste intervalo e calculada utilizando uma janela fixa de 5 horas para encontrar
5 o menor valor) e RR (descanso relativo, caculado através da normalização da
6 soma da distância percorrida por cada animal a cada 5 min, das 12h40min até
7 as 16h50min, pelo total de tempo de gravação, 1440 min), além dos valores de
8 Act. (atividade relativa, caculada através da normalização da soma da distância
9 percorrida por cada animal a cada 5 min, das 00h10min até as 04h20min, pelo
10 total de tempo de gravação, 1440 min) próximos aos de RR, indicam um estado
11 de descanso diminuído destes animais e, conseqüentemente, a uma
12 diminuição na amplitude do padrão de atividade locomotora do grupo GH/GHR.
13 Além disso, esta diferença apresentada pelos animais GH/GHR reforça a
14 hipótese levantada ao longo do estudo de existir um efeito sinérgico do
15 excesso de GH e de GHR em um mesmo animal. A responsividade do grupo
16 NT a luz foi confirmada em um ensaio comportamental aplicando um pulso de
17 luz no meio do período noturno, onde valores de RR e L5 mais elevados foram
18 observados quando comparados aos animais do mesmo grupo submetidos a
19 fotoperíodo 12C:12E. Em contrapartida, os animais GH/GHR submetidos ao
20 pulso de luz durante a fase escura não apresentaram diferenças nos valores de
21 RR quando comparados aos animais sob fotoperíodo 12C:12E, corroborando
22 com a idéia de que estes animais teriam uma resposta diminuída à luz.
23 Portanto, em conseqüência da superexpressão de GH e GHR, os animais
24 GH/GHR seriam mais responsivos a outro arrastador que não a luz.
25 Considerando que vários estudos já verificaram que o momento de alimentação

1 é um potente arrastador em *D. rerio* (Sanchez *et al.*, 2009; Sanchez and
2 Sanchez-Vazquez, 2009; López-Olmeda *et al.*, 2012)., esta pista ambiental
3 seria, provavelmente, um *Zeitgeber* mais forte que a luz em *zebrafish* GH/GHR-
4 transgênicos.

5 Apesar de todos os efeitos observados nos animais transgênicos do
6 presente estudo, deveria ser considerado que *D. rerio* apresenta respostas
7 fisiológicas diferentes em função da idade, tais como diminuição do estado de
8 descanso causado por uma possível diminuição nos níveis de melatonina (Tsai
9 *et al.*, 2007; Zhdanova *et al.*, 2008). Portanto, devido à responsividade de
10 *zebrafish* a diferentes arrastadores, como mencionado anteriormente, as
11 respostas de atividade locomotora observada nos animais GH/GHR-
12 transgênicos do presente estudo podem também estar sendo desencadeadas
13 devido ao envelhecimento precoce, como previamente documentado em
14 animais GH-transgênicos (Rosa *et al.*, 2010).

15 O presente estudo demonstrou que *paulistinhas* geneticamente
16 modificados, superexpressando o GH, o GHR, e ambos, no mesmo indivíduo,
17 estão sofrendo alterações no padrão de ritmicidade. Estas alterações ocorrem
18 tanto em nível molecular, através da alteração do padrão de expressão dos
19 genes das alças positiva e negativa do relógio circadiano em músculo
20 esquelético da espécie, quanto em nível comportamental de atividade
21 locomotora. Tais diferenças são evidenciadas devido à significativa redução do
22 estado de descanso e da amplitude relativa de atividade locomotora nos
23 animais GH/GHR-transgênicos, ao longo do ciclo claro-escuro, além da
24 diminuição da responsividade a luz como um arrastador do seu padrão de
25 atividade locomotora.

1 Futuramente, novos estudos podem ser conduzidos visando compreender
2 melhor qual *Zeitgeber* estaria, e se estaria, ajustando o relógio circadiano nos
3 animais GH/GHR-transgênicos. Além disso, avaliações de parâmetros
4 bioquímicos, tais como os níveis de cortisol e melatonina das linhagens de
5 transgênicos, poderiam elucidar se a senilidade precoce observada nestes
6 animais é um dos motivos da alteração dos padrões de ritmicidade observados
7 no presente estudo. Considerando o possível efeito sinérgico da
8 superexpressão de ambos, GH e GHR no mesmo indivíduo, observado nos
9 ensaios comportamentais deste trabalho, o perfil de expressão dos genes da
10 alça positiva e negativa do sistema circadiano poderia ser investigado nos
11 animais GH/GHR. Semelhantemente, os níveis de expressão dos genes
12 responsáveis pela alça de estabilização do relógio circadiano também
13 poderiam ser averiguados, visando verificar a existência de um efeito
14 compensatório em função das alterações observadas nos animais GH, GHR e
15 GH/GHR.

6. REFERÊNCIAS GERAIS

- 1 Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M,
2 Block GD. 2002. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J.*
3 *Neurosci.*,22: 350–356.
- 4 Aguilar-Roblero R, Morin LP, Moore RY. 1994. Morphological correlates of
5 circadian rhythm restoration induced by transplantation of the
6 suprachiasmatic nucleus in hamsters. *Exp Neurol.*, 130: 250–260
- 7 Albrecht U, Eichele G. 2003. The mammalian circadian clock. *Current Opinion*
8 *in Gen & Develop*, 13: 271–277.
- 9 Albrecht U. 2007. *Per2* has time on its side. *Nat Chem Biol* 3:139–140
- 10 Amaral IPG e Johnston IA. 2011. Circadian expression of clock and
11 putativezebrafishclock-controlled genes in skeletal muscle of thezebrafish.
12 *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 302: R193–R206.
- 13 Amir S, Lamont EW, Robinson B, Stewart J. 2004. A circadian rhythm in the
14 expression of *PERIOD2* protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in
15 the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Neurosci.*, 24:
16 781–790
- 17 Antle MC, Silver R. 2005. Orchestrating time: arrangements of the brain
18 circadian clock. *Trends Neurosci*, 28: 145–151
- 19 Aschoff, J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian
20 rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 25:11-28.

- 1 .Aschoff J. 1984. Circadian timing. *Annals of the New York Academy of*
2 *Sciences*, 423: 442–468.
- 3 Aton SJ, Colwell CS, Harmar AJ, Waschek J, Herzog ED. 2005.
4 Vasoactiveintestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and
5 synchrony in mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.*, 8: 476–483
- 6 Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. 1998. A serum shock induces circadian
7 gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93: 929–937.
- 8 Balsalobre A. 2002. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue*
9 *Res.*, 309: 193–199.
- 10 Bechtold DA, Brown TM, Luckman SM and Piggins HD. 2008. Metabolic rhythm
11 abnormalities in mice lacking VIP-VPAC2 signaling. *Am J Physiol Regul*
12 *Integr Comp. Physiol.*, 294: R344– 351.
- 13 Bégay V, Falcón J, Cahill GM, Klein DC, Coon SL. 1998. Transcripts encoding
14 two melatonin synthesis enzymes in the teleost pineal organ: circadian
15 regulation in pike and zebrafish, but not in trout. *Endocrinology*, 139:905–
16 912.
- 17 Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE. 2005.
18 Circadian rhythms from multiple oscillators: Lessons from diverse
19 organisms. *Nat. Rev. Genet.*, 6(7): 544–556.
- 20 Blaise O, Le Bail PY, Weil C. 1995. Lack of gonadotropin action on in vitro and in
21 vivo growth hormone release in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp*
22 *Biochem Physiol.* 110C:133–141.

- 1 Blanco-Vives B, Sanchez-Vazquez FJ. 2009. Synchronisation to light
2 and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity
3 in zebrafish. *Physiol. Behav.*, 98: 268 –275.
- 4 Bolliet V, Ali MA, Lapointe FJ, Falcón J. 1996. Rhythmic melatonin secretion in
5 different teleost species: an in vitro study. *J Comp Physiol [B]* 165:677–683
- 6 Boulos Z, Frim DM, Dewey LK, Moore-Ede MC. 1989. Effects of restricted
7 feeding schedules on circadian organization in squirrel monkeys. *Physiol.*
8 *Behav.*, 45: 507–515.
- 9 Brown JS. 1999. Vigilance, patch use and habitat selection: foraging under
10 predation risk. *Evol. Ecol. Res.* 1, 49 –71.
- 11 Buijs RM & Kalsbeek A. 2001. Hypothalamic integration of central and peripheral
12 clocks. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2: 521–526.
- 13 Burrill JD, Easter SS Jr. 1994. Development of the retinofugal projections in
14 the embryonic and larval zebrafish (*Brachydanio rerio*). *J. Comp. Neurol.*,
15 346: 583–600.
- 16 Busino L, Bassermann F, Maiolica A, Lee C, Nolan PM, Godinho SI, Draetta
17 GF, Pagano M. 2007. SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian
18 clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science*, 316:
19 900–904.
- 20 Cahill GM. 2002. Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.*, 309: 27–34,
- 21 Cahill GM. 1996. Circadian regulation of melatonin production in cultured

- 1 zebrafish pineal and retina. *Brain Res.*, 708:177–181.
- 2 Cahill GM, Besharse JC. 1995. Circadian rhythmicity in vertebrate retinas:
3 regulation by a photoreceptor oscillator. *Prog.Retinal Eye Res.* 14:267–
4 291.
- 5 Cahill GM, Hurd MW, Batchelor MM. 1998. Circadian rhythmicity in the
6 locomotor activity of larval zebrafish. *Neuroreport.*9:3445–3449.
- 7 Canosa LF, Peter RE. 2005. Pre-pro-somatostatin-III may have cortistatin like
8 function in fish. *AnnNY Acad. Sci.*, 1040:253–256.
- 9 Cermakian N, Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. 2000. Asynchronous
10 oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control
11 and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4339–4344.
- 12 Cermakian N, Pando MP, Thompson CL, Pinchak AB, Selby CP, Gutierrez
13 L, Wells DE, Cahill GM, Sancar A, Sassone-Corsi P. 2002. Light induction
14 of a vertebrate clock gene involves signaling through blue-light receptors
15 and MAP kinases. *Curr. Biol.* 12, 844–848.
- 16 Challet, E., Jacob, N., Vuillez, P., Pévet, P., Malan, A. 1997. Fos-like
17 immunoreactivity in the circadian timing system of calorie-restricted rats fed
18 at dawn: daily rhythms and light pulse-induced changes. *Brain Res.* 770,
19 228–236.
- 20 Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver
21 DR, Leslie FM, Zhou QY. 2002. Prokineticin 2 transmits the behavioural
22 circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 417: 405–410.

- 1 Cook RF, Eales JG. 1987. Effect of feeding and photocyclus on diel changes in
2 plasma thyroid hormone levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Exp.
3 Zool., 242:161–169.
- 4 Czeisler CA and Klerman EB. 1999. Circadian and sleep-dependent regulation
5 of hormone release in humans. Recent Progress in Hormone Research,
6 54:97–130.
- 7 Dalmolin C., Almeida D.V., Azevedo M.A., Marins L.F. 2014. Energy delivery to
8 the brain: effects of genotype and fasting in transgenic *zebrafish* model
9 overexpressing growth hormone. Trans. Res. (Submetido).
- 10 Dalmolin C., Almeida D.V., Azevedo M.A., Marins L.F. 2014. GH-transgenesis
11 induces different mechanisms of appetite control in a sex-dependent
12 manner in *zebrafish*. GCE (Submetido).
- 13 Daly M, Behrends PR, Wilson MI, Jacobs LF. 1992. Behavioral modulation of
14 predation risk — moonlight avoidance and crepuscular compensation in a
15 nocturnal desert rodent, *Dipodomys-Merriami*. Anim. Behav. 44, 1 –9.
- 16 Dardente H, Menet JS, Challet E, Tournier BB, Pévet P, Masson-Pévet M.
17 2004. Daily and circadian expression of neuropeptides in the
18 suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. Brain Res.
19 Mol., 124: 143–151.
- 20 Del Pozo A., Sánchez-Férez J. A., Sánchez-Vázquez F. J., (2011). Circadian
21 Rhythms of Self-feeding and Locomotor Activity in Zebrafish (*Danio Rerio*).
22 Chron. Int., 28(1): 39–47.

- 1 de Vlaming VL, Vodcnik MJ. 1977. Diurnal variation in pituitary gonadotropin
2 content and ingonadal response to exogenous gonadotropin and prolactin
3 in *Notomigonous crysoleucas*. J. Fish. Biol., 10:371–383.
- 4 DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM. 2007. CLOCK and NPAS2 have
5 overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. Nat. Neurosci.,
6 10:543–545.
- 7 Dickmeis, T, Lahiri K, Nica G, Vallone D, Santoriello C, Neumann CJ,
8 Hammerschmidt M, Foulkes NS. 2007. Glucocorticoids play a key role in
9 circadian cell cycle rhythms. PLoS Biology, 5: e78.
- 10 Dickmeis T. 2009. Glucocorticoids and the circadian clock. J. Endocrinol.
11 200:3–22
- 12 Dixit AS, Sougrakpam R. 2013. Photoperiodic regulation of seasonal
13 reproduction, molt and body weight in the migratory male yellow-
14 breasted bunting (*Emberiza aureola*). An. Rep. Sci. 141: 98–108.
- 15 Dolatshad H, Campbell EA, O'Hara L, Maywood ES, Hastings MH, Johnson
16 MH. 2006. Developmental and reproductive performance in circadian
17 mutant mice. Human Reproduction, 21: 68–79.
- 18 Dudley CA, Erbel-Sieler C, Estill SJ, Reick M, Franken P, Pitts S, McKnight SL.
19 2003. Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-
20 deficient mice. Science, 301: 379 – 383.
- 21 Dunlap, Loros, DeCoursey. 2004. Chronobiology: biological timekeeping.
22 Sinauer Associates: Sunderland, MA.

- 1 Emran F, Rihel J, Dowling JE. 2008. A Behavioral Assay to Measure
2 Responsiveness of Zebrafish to Changes in Light Intensities. *J. Vis. Exp.*,
3 20: e923.
- 4 Falcón J, Marmillon JB, Claustrat B, Collin JP. 1989. Regulation of melatonin
5 secretion in a photoreceptive pineal organ: an *in vitro* study in the pike. *J.*
6 *Neurosci.*, 9:1943–1950.
- 7 Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Proietti MC, Marins LF. 2007a. The
8 effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different
9 genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part D*
10 *Genomics Proteomics*, 2:228-233.
- 11 Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Marins LF. 2007b. Improving the
12 production of transgenic fish germline: *in vivo* mosaicism evaluation
13 by GFP transgene co-injection strategy. *Genet. Mol. Biol.*, 30:31-36.
- 14 Figueiredo MA, Mareco EA, Silva MDP, Marins LF. 2012. Muscle-specific
15 growth hormone receptor (GHR) overexpression induces hyperplasia but
16 not hypertrophy in transgenic zebrafish. *Transgenic Research*, 21, 3: 457-
17 469.
- 18 Filippi A, Mahler J, Schweitzer J, Driever W. 2010. Expression of the
19 paralogous tyrosine hydroxylase encoding genes *th1* and *th2* reveals the
20 full complement of dopaminergic and noradrenergic neurons in zebrafish
21 larval and juvenile brain. *J. Comp. Neurol.*, 518: 423–438.
- 22 Gamse JT, Shen YC, Thisse C, Thisse B, Raymond PA, Halpern ME, Liang JO.

- 1 2001. Otx5 regulates genes that show circadian expression in the zebrafish
2 pineal complex. *Nat. Genet.*, 30:117–121.
- 3 Ganguly S, Coon SL, Klein DC. 2002. Control of melatonin synthesis in the
4 mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell*
5 *Tissue Res.*, 309: 127-137.
- 6 Godinho SI, Maywood ES, Shaw L, Tucci V, Barnard AR, Busino L, Pagano M,
7 Kendall R, Quwillid MM, Romero MR. 2007. The after-hours mutant reveals
8 a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period. *Sci.*, 31:6897–
9 900.
- 10 Gomez JM, Boujard T, Fostier A, Le Bail PY. 1996. Characterization of growth
11 hormonelythermal plasma profiles in catheterized rainbow
12 trout, *Oncorhynchus mukiss*. *J. Exp. Zool.*, 274:171–180.
- 13 Granados-Fuentes D, Prolo LM, Abraham U, Herzog ED. 2004. The
14 suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian
15 rhythmicity in the olfactory bulb. *J. Neurosci.*, 24: 615–619.
- 16 Harikrishnan S, Lal B, Singh TP, Pati AK. 2002. Circadian and ultradian
17 variations in the plasma level of maturational gonadotropin (GtH II) in the
18 Indian catfish, *Clarias batrachus*. *Biol. Rhyt. Res.* 33:223–234.
- 19 Hastings MH. 1991. Neuroendocrine rhythms. *Pharmacology and Therapeutics*,
20 50: 35–71.
- 21 Hastings MH. 2000. Circadian clockwork: two loops are better than one. *Nature*
22 *Rev. Neurosci.*, 1: 143–146.

- 1 Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. 2003. A clockwork web: circadian
2 timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.*,4:
3 649–66.
- 4 Hastings MH, Herzog ED. 2004. Clock genes, oscillators, and cellular
5 networks in the suprachiasmatic nuclei. *J. Biol. Rhythms*,19: 400–413.
- 6 Haus E, Halberg F.1970. Circannual rhythm level and timing of
7 serumcorticosterone in standardized inbred mature C-mice, *Environ. Res.*,
8 3: 81–106.
- 9 Haus E, Lakatua DJ, Sackett-Lundeen L, White M.1984. Circannualvariation
10 and intestinal cell proliferation in BDF1 male mice on threelighting
11 regimens, *Chronobiol. Int.*, 1(3): 185–194.
- 12 Hirayama J, Fukuda I, Ishikawa T, Kobayashi Y, Todo T. 2003. Newrole of
13 zCRY and zPER2 as regulators of sub-cellular distributions of zCLOCKand
14 zBMAL proteins. *Nucleic Acids Res.*, 31: 935–943.
- 15 Hofman MA. 2004. The brain's calendar: neural mechanisms of seasonal timing.
16 *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*,79(1): 61-77.
- 17 Hofman MA, Swaab DF. 2006. Living by the clock: the circadian pacemaker
18 in older people. *Ageing Res. Rev.*,5: 33–51.
- 19 Hontela A, Peter RE. 1978. Daily cycles in gonadotropin level in goldfish: effects
20 of photoperiod, temperature and sexual condition. *Can. J. Zool.*, 56:2430–
21 2442.

- 1 Hurd MW, Debruyne J, Straume M, Cahill GM. 1998. Circadian rhythms of
2 locomotor activity in zebrafish. *Physiol. Behav.*, 65:465–472.
- 3 Hurd MW, Cahill GM. 2002. Entraining signals initiate behavioral circadian
4 rhythmicity in larval zebrafish. *J. Biol. Rhythms*, 17: 307–31.
- 5 Hut RA, van Oort BEH, Daan S. 1999. Natural entrainment without dawn and
6 dusk: The case of the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *J.*
7 *Biol. Rhythms*, 14: 290-299.
- 8 Inouye ST, Kawamura H. 1979. Persistence of circadian rhythmicity in a
9 mammalian hypothalamic ‘island’ containing the suprachiasmatic
10 nucleus. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5962–5966.
- 11 Ishida A, Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, Nakahara D, Tsujimoto
12 G, Okamura H. 2005. Light activates the adrenal gland: timing of gene
13 expression and glucocorticoid release. *Cell Metabolism*, 2: 297–307.
- 14 Ishikawa T, Hirayama J, Kobayashi Y, Todo T. 2002. Zebrafish CRY represses
15 transcription mediated by CLOCK-BMAL heterodimer without inhibiting its
16 binding to DNA. *Genes Cells*, 7: 1073–1086.
- 17 Jilge B. 1992. Restricted feeding: a nonphotic zeitgeber in the rabbit. *Physiol.*
18 *Behav.*, 51: 157–166.
- 19 Juárez C, Morgado E, Waliszewski SM, Martínez AJ, Meza E, Caba M. 2012.
20 Synchronization of PER1 protein in the parabrachial nucleus in a natural
21 model of food anticipatory activity. *Eur. J. Neurosci.*, 35: 1458–1465.

- 1 Kalsbeek A, Palm IF, La Fleur SE, Scheer FA, Perreau-Lenz S, Ruiters M, Kreier
2 F, Cailotto C, Buijs RM. 2006. SCN outputs and the hypothalamic balance
3 of life. *J. Biol. Rhythms*, 21: 458–469.
- 4 Kaneko M, Hernandez-Borsetti N, Cahill GM. 2006. Diversity of
5 zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting, *Proc. Natl.
6 Acad. Sci. USA*, 103: 14614–14619.
- 7 Keller J, Layer P. 2002. Circadian pancreatic enzyme pattern and relationship
8 between secretory and motor activity in fasting humans. *J. Appl. Physiol.*,
9 93:592–600.
- 10 Kennedy GA, Coleman GJ, Armstrong SM. 1990. The effect of restricted feeding
11 on the wheel-running activity rhythms of the predatory marsupial
12 *Dasyurus viverrinus*. *J. Comp. Physiol., A* 166: 607–618.
- 13 Kezuka H, Aida K, Hanyu I. 1989. Melatonin secretion from goldfish pineal gland
14 in organ culture. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 75:217–221.
- 15 Khan I, Thomas P. 1994. Seasonal and daily variations in plasma gonadotropin.
16 II. Response to a LHRH analog and serotonin in the Atlantic
17 croaker, *Micropogonius undulates*: evidence for mediation by 5-HT₂
18 receptors. *J. Exp. Zool.*, 269:531–537.
- 19 Ko CH, Takahashi JS (2006) Molecular components of the mammalian
20 circadian clock. *Hum Mol Genet* 15(2): R271–R277
- 21 Kobayashi Y, Ishikawa T, Hirayama J, Daiyasu H, Kanai S, Toh H,
22 Fukuda I, Tsujimura T, Terada N, Kamei Y, Yuba S, Iwai S, Todo T

- 1 (2000). Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family:
2 two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells*, 5: 725–738.
- 3 Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, Davis FC, Weitz CJ.
4 2001. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic
5 EGF receptor signaling. *Science*, 294: 2511–2515.
- 6 Kraves S, Weitz CJ. 2006. A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian
7 control of mammalian locomotor activity. *Nat. Neurosci.*, 9:212–219.
- 8 Kulczykowska E, Sánchez-Vázquez FJ. 2010. Neurohormonal regulation of
9 feed intake and response tonutrients in fish: aspects of feeding rhythm and
10 stress. *Aquac. Res.*, 41:654–667.
- 11 Lamba VJ, Goswami SV, Sundararaj BI. 1983. Circannual and circadian
12 variation in plasma levelsof steroids (cortisol, estardiol-17b, estrone and
13 testosterone) correlated with annual gonadalcycle in the
14 catfish*Heteropneustes fossilis*(Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 50:205–
15 225.
- 16 Lamont EW, Robinson B, Stewart J, Amir S. 2005. The central and basolateral
17 nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the
18 clock protein Period2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 4180–4184.
- 19 Lavery DJ, Lopez-Molina L, Margueron R, Fleury-Olela F, Conquet F, Schibler
20 U, Bonfils C. 1999. Circadian expression of the steroid 15
21 alphahydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes
22 inmouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor

- 1 DBP. *Mol. Cell Biol.*,19: 6488–6499.
- 2 Le Minh, N., Damiola, F., Tronche, F., Schütz, G., Schibler, U. 2001.
3 Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral
4 circadian oscillators. *EMBO J.* 20, 7128–7136.
- 5 Li L, Dowling JE.1998. Zebrafish visual sensitivity is regulated by a circadian
6 clock. *Vis. Neurosci.*, 15:851–857.
- 7 Li L, Dowling JE. 2000a. Disruption of the olfactoretinal centrifugal pathway may
8 relate to the visual system defect in nightblindness b mutant zebrafish. *J.*
9 *Neurosci.*, 20:1883–1892.
- 10 Li L, Dowling JE. 2000b. Effects of dopamine depletion on visual sensitivity of
11 zebrafish. *J. Neurosci.*, 20:1893–1903.
- 12 Lincoln G.A. 2006. Melatonin entrainment of circannual rhythms. *Chronobiol.*
13 *Int.*, 23(1): 301-6
- 14 Litman T., Halberg F., Ellis S., Bittner J.J. 1958. Pituitary growth hormone and
15 mitoses in immature mouse liver, *Endocrinology* 62 (3) 361–364.
- 16 Liu C, Reppert SM. 2000. GABA synchronizes clock cells within the
17 suprachiasmatic circadian clock. *Neuron.*,25: 123–128.
- 18 Looby P, Loudon ASI. 2005. Gene duplication and complex circadian clocks in
19 mammals. *TRENDS in Genetics*, 21: 46-52.
- 20 Lopez-Molina L, Conquet F, Dubois-Dauphin M, Schibler U. 1997. The DBP
21 gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic

- 1 nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J.*, 16:6762–6771.
- 2 López-Olmeda JF, Montoya A, Oliveira C, Sánchez-Vázquez FJ.
3 2009. Synchronization to light and restricted-feeding schedules of behavioral
4 and humoral daily rhythms in gilthead sea bream (*Sparus aurata*).
5 *Chronobiol. Int.*, 26:1389–1408.
- 6 López-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ. 2009. Zebrafish temperature selection
7 and synchronization of locomotor activity circadian rhythm to
8 a hemeral cycle of light and temperature. *Chronobiol. Int.*, 26(2): 200–218.
- 9 López-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ. 2010. Feeding rhythms in fish: from
10 behavioral to molecular approach. In: Kulczykowska E, Popek W, Kapoor
11 BG (eds.) *Biological clock in fish*. Science Publishers, Enfield, pp. 155–184.
- 12 López-Olmeda JF, López-García I, Sánchez-Muros MJ, Blanco-Vives B,
13 Aparicio R, Sánchez-Vázquez FJ. 2012. Daily rhythms of digestive
14 physiology, metabolism and behaviour in the European eel (*Anguilla*
15 *anguilla*). *Aquacult. Int.*, 20:1085–1096.
- 16 Lumineau S, Guyomarc HC, Vivien-Roels B, Houdelier C. 2002. Cyclic
17 melatonin synchronises the circadian rhythm of feeding activity in
18 Japanese quail, *Coturnix c. japonica*. *C R Biologies*, 325: 205 - 212.
- 19 Lutterschmidt Di, Lutterschmidt Wi, Hutchison VH. 2003. Melatonin and
20 thermoregulation in ectothermic vertebrates: a review. *Can J Zool*, 81: 1
21 – 13.
- 22 Madrid JA, Boujard T, Sánchez-Vázquez F.J. 2001. Feeding rhythms. In:

- 1 Houlihan, D.F., Boujard, T., Jobling, M. (Eds.), Food Intake in Fish.
2 Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 189–215.
- 3 Marchant TA, Peter RE. 1986. Seasonal variation in body growth rates and
4 circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. J.
5 Exp. Zool., 237:231–239.
- 6 Marques MD, Marques N, Menna-Barreto L, Silva AAB, Cipolla-Neto J. 1989.
7 Ritmos da vida. Ciência Hoje, 10(58): 41 – 49.
- 8 Marques N, Mena-Barreto L. 1997. Cronobiologia: Princípios e Aplicações.
9 Editora da Universidade de São Paulo, 328pp.
- 10 Martin AM, Elliott JA, Duffy P, Blake CM, Ben Attia S, Katz LM, Browne JA, Gath
11 V, McGivney BA, Hill EW, Murphy BA. 2010. Circadian regulation of
12 locomotor activity and skeletal muscle gene expression in the horse. J. Appl.
13 Physiol., 109: 1328 –1336.
- 14 Mayer I, Bornestaf C, Borg B. 1997. Melatonin in non-mamalian vertebrates:
15 Physiological Role in Reproduction? Comp Biochem Physiol, 118A: 515 –
16 531
- 17 Maywood ES, Reddy AB, Wong GK, O'Neill JS, O'Brien JA, McMahon DG,
18 Harmar AJ, Okamura H & Hastings MH. 2006. Synchronization and
19 maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by
20 neuropeptidergic signaling. Current Biology 16:599–605.
- 21 Montoya A, López-Olmeda JF, Yúfera M, Sánchez-Muros MJ, Sánchez-
22 Vázquez FJ. 2010a. Feeding time synchronises daily rhythms of behaviour

- 1 and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*).
2 Aquaculture, 306:315–321.
- 3 Montoya A, López-Olmeda JF, Garayzar ABS, Sánchez-Vázquez FJ. 2010b.
4 Synchronization of daily rhythms of locomotor activity and plasma glucose,
5 cortisol and thyroid hormones to feeding in Gilthead seabream (*Sparus*
6 *aurata*) under a light-dark cycle. *Physiol. Behav.*, 101:101–107.
- 7 Moore RY, Eichler VB. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm
8 following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.*, 42: 201–206.
- 9 Moore RY, Speh JC, Leak RK. 2002. Suprachiasmatic nucleus
10 organization. *Cell Tissue Res.*, 309: 89–98.
- 11 Mracek P, Santoriello C, Idda ML, Pagano C, Ben-Moshe Z, et al. (2012)
12 Regulation of operant cry genes reveals a central role for the D-Box
13 Enhancer in light-dependent gene expression. *PLoS ONE* 7(12): e51278.
14 doi:10.1371/journal.pone.0051278
- 15 Mrosovsky N, Reeb SG, Honrado GI, Salmon PA.
16 1989. Behavioural entrainment of circadian rhythms. *Experientia*, 45:696–702.
- 17 Muhlbauer E, Wolgast S, Finckh U, Peschke D, Peschke E. 2004. Indication of
18 circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett*, 564: 91–96.
- 19 Noche RR, Lu PN, Goldstein-Kral L, Glasgow E, Liang JO. 2011. Circadian
20 rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral
21 brain. *BMC Neurosci.*, 12: 7

- 1 O'Reilly H, Armstrong SM, Coleman GJ. 1986. Restricted feeding and circadian
2 activity rhythms of a predatory marsupial, *Dasyuroides byrnei*. *Physiol.*
3 *Behav.*, 38: 471-476.
- 4 Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, Kikuno R, Nagase T, Atsumi G, Ohkura N,
5 Azama T, Mesaki M, Yukimasa S, Kobayashi H, Litaka C, Umehara T,
6 Horikoshi M, Kudo T, Shimizu Y, Yano M, Monden M, Machida K, Matsuda
7 J, Horie S, Todo T, Ishida N. 2003. Genome-wide expression analysis of
8 mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J. Biol.*
9 *Chem.*, 278: 41519–41527.
- 10 Oliveira CCV, AparícioR, Blanco-Vives B, ChereguiniO, Martín I, Sánchez-
11 Vazquez F J. 2013. Endocrine (plasma cortisol and glucose) and
12 behavioral (locomotor and self-feeding activity) circadian rhythms in
13 Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) exposed to light/dark
14 cycles or constant light. *Fish Physiol. Biochem.*, 39:479–487.
- 15 Oster H, Baeriswyl S, van der Horst GTJ, Albrecht U. 2003. Loss of circadian
16 rhythmicity in aging mPer1mCry2 mutant mice. *Genes Dev.*, 17:1366–1379.
- 17 Pando MP, Pinchak AB, Cermakian N, Sassone-Corsi P. 2001. A cell-based
18 system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the
19 vertebrate clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:10178–10183.
- 20 Piccione G, Costa A, Gianetto C, Caola G. 2007. Daily rhythms of activity
21 in horses housed in different stabling conditions. *Biol. Rhythm Res.*, 39: 79 –
22 84.

- 1 Pittendrigh CS, Daan S.1976. A functional analysis of circadianpacemakers in
2 nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: Aclock for all seasons. J.
3 Comp. Physiol., A 106:333–355.
- 4 Pittendrigh CS, 1993. Temporal organization: reflections of a Darwinian
5 clockwatcher. Annual Review of Physiology,55; 16–54.
- 6 Pohl H.1998. Temperature cycles as zeitgeber for the circadian clock of two
7 burrowing rodents, the normothermic antelope ground squirrel and the
8 heterothermic Syrian hamster. Biol. Rhythms Res., 29:311-325.
- 9 Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, Horne S, Amores A, Brownlie A, Donovan
10 A, Egan ES, Force A, Gong Z, Goutel C, Fritz A, Kelsh R, Knapik E, Liao
11 E, Paw B,Ransom D, Singer A, Thomson M, Abduljabbar TS, Yelick
12 P, Beier D, Joly JS, Larhammar D, Rosa F, Westerfield M, Zon LI, Johnson
13 SL, Talbot WS.1998. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene
14 map. Nat. Genet., 18: 345–349
- 15 Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht
16 U,Schibler U. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls
17 circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian
18 oscillator. Cell, 110: 251–260.
- 19 Rajaratnam SMW, Redman JR. 1998. Entrainment of activity rhythms to
20 temperature cycles in diurnal palm squirrels. Physiol. Behav., 63:271-277.
- 21 Ramteke AK, Poddar P, Pati AK. 2008. Circadian rhythms of locomotor activity
22 in Indian walking catfish, *Clarias batrachus*. Biol. Rhythm Res.,40(3): 201–

- 1 209.
- 2 Reebbs SG. 2002. Plasticity of diel and circadian activity rhythms in fishes. Rev.
3 Fish. Biol. Fish., 12:349–371.
- 4 Refinetti R. 2010. Entrainment of Circadian Rhythmby Ambient Temperature
5 Cycles in Mice. J. Biol. Rhythms, 25:247-256.
- 6 Rink E, Wullimann MF. 2004. Connections of the ventral
7 telencephalon(subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*).Brain Res., 1011:
8 206–220.
- 9 Rosa CE, Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Monserrat JM, Marins LF.
10 2008. Metabolic rate and reactive oxygen species production in
11 different genotypes of GH-transgenic zebrafish. Comp. Biochem.
12 Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., 149: 209-214.
- 13 Rosa CE, Kuradomi RY, Almeida DV, Lanes CFC, Figueiredo MA, Dytz AG,
14 Fonseca DB, Marins LF. 2010. GH overexpression modifies muscle
15 expression of anti-oxidant enzymes and increases spinal curvature of
16 old zebrafish. Exp. Gerontol., 45: 449-456.
- 17 Rosa CE, Figueiredo MA, Lanes CFC, Almeida DV, Marins LF. 2011.
18 Genotype-dependent gene expression profile of the antioxidant defense
19 system (ADS) in the liver of a GH-transgenic zebrafish model. Transgenic
20 Res., 20: 85-89.
- 21 Rutter J, Reick M, Wu LC, McKnight SL. 2001. Regulation of clock and NPAS2
22 DNA binding by the redox state of NAD cofactors.Science, 293: 510–514.

- 1 Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Iigo M, Tabata M. 1996. Demand
2 feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*:
3 dual and independent phasing. *Physiol Behav* 60:665–674
- 4 Sanchez JA, Sanchez-Vazquez FJ. 2009. Feeding entrainment of daily rhythms
5 of locomotor activity and clock gene expression in zebrafish
6 brain. *Chronobiol. Int.*, 26(6): 1120–1135.
- 7 Saper CB, Scammell TE, Lu J. 2005. Hypothalamic regulation of sleep
8 and circadian rhythms. *Nature*, 437: 1257–1263.
- 9 Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA,
10 FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB. 2004. A functional
11 genomics strategy reveals *Rora* as a component of the mammalian
12 circadian clock. *Neuron.*, 43: 527–537.
- 13 Schibler U, Ripperger J, Brown SA. 2003. Peripheral circadian oscillators in
14 mammals: time and food. *J. Biol. Rhythms*, 18: 250–260.
- 15 Shearman, L. P., Zylka, M. J., Reppert, S. M. & Weaver, D. R. 1999. Expression
16 of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic
17 nucleus. *Neurosci.* 89,387-397.
- 18 Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume
19 K, Lee CC, van der Horst GT, Hastings MH, Reppert SM. 2000. Interacting
20 molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 288: 1013–
21 1019.
- 22 Sheward WJ, Maywood ES, French KL, Horn JM, Hastings MH, Seckl

- 1 JR,Holmes MC, Harmar AJ. 2007. Entrainment to feeding but not to
2 light:circadian phenotype of VPAC2 receptor-null mice.Journal of
3 Neuroscience,27:4351–4358.
- 4 Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M and Wada T. 2005.
5 Brain and muscle arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of
6 themolecular clock, regulates adipogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci.
7 USA,102: 12071– 12076.
- 8 Siepka SM, Yoo SH, Park J, Song W, Kumar V, Hu Y, Lee C, Takahashi
9 JS.2007. Circadian mutant overtime reveals F-box protein FBXL3
10 regulationof cryptochrome and period gene expression.Cell, 129: 1011–
11 1023.
- 12 Singh AK, Lal B, Pati AK. 2009. Variability in the characteristics of ultradian and
13 circadian rhythms in plasma levels of growth hormone in the Indian walking
14 catfish, *Clarias batrachus*. Biol. Rhythm Res., 40(3): 211–221.
- 15 Singh S, Singh TP. 1987. Seasonal profile of sex steroids in blood plasma and
16 ovarian tissue of *Clarias batrachus*. Gen. Comp. Endocrinol., 65:216–224.
- 17 Sinha N, Lal B, Singh TP. 1992. Seasonal effects on the diel changes in
18 circulating thyroid hormone in the freshwater catfish, *Clarias batrachus*. J.
19 Interdis. Cycle Res., 23:277–286.
- 20 Soules MR, Steiner RA, Clifton DK, Cohen WL, Aksel S, Bremner WJ. 1984.
21 Progesterone Modulation of Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion in
22 Normal Women. J. Clin. End. Metab., 58:378-383.

- 1 Stacey NE, Mackenzie DS, Marchant TA, Kyle AL, Peter RE. 1984. Endocrine
2 changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus*
3 *commersoni*. I. Gonadotropin, growth hormone and thyroid hormones. *Gen*
4 *Comp Endocrinol.* 56:333–348.
- 5 Stephan FK. 2002. The “other” circadian system: food as a zeitgeber. *J.*
6 *Biol.Rhythms*, 17:284–292.
- 7 Studzinski AL, Almeida DV, Lanes CF, Figueiredo MA, Marins LF. 2009.
8 SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the
9 somatotrophic axis in liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio*
10 *rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 161: 67-72.
- 11 Takahashi JS, Menaker M. 1979. Physiology of avian circadian pacemakers.
12 *Fed. Proc.*, 38:2583–2588.
- 13 Tamai TK, Young LC, Whitmore D. 2007. Light signaling to the zebrafish
14 circadian clock by Cryptochrome 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:
15 14712–14717.
- 16 Tsai SB, Tucci J, Uchiyama J, Fabian NJ, Lin M.C, Zhdanova IV, Kishi S. 2007.
17 Differential effects of genotoxic effects on both concurrent body growth and
18 gradual senescence in adult zebrafish. *Aging Cell* 6: 209–224.
- 19 Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A.
20 2005. Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice.
21 *Science*, 308: 1043– 1045.
- 22 Underwood H. 1981. Circadian organization in the lizard *Sceloporus*

- 1 *occidentalis*: the effects of pinealectomy, blinding and melatonin. J
2 Comp Physiol, 141: 537-547.
- 3 Underwood H. 1983. Circadian organization in the lizard *Anolis carolinensis*: A
4 multioscillator system. J. Comp. Physiol., 152:265–274.
- 5 Vallone D, Gondi SB, Whitmore D, Foulkes NS (2004) E-box function in a
6 period gene repressed by light. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 4106–4111
- 7 Van Cauter E., Honinckx E. 1985. Pulsatility of pituitary hormones, Exp. Brain
8 Res. 12 (41) 41–60 (Suppl).
- 9 Van Cauter E., Refetoff S. 1985. Evidence for two subtypes of Cushing's
10 disease based on the analysis of episodic cortisol secretion, N. Engl. J.
11 Med. 312 (21) 1343–1349.
- 12 Van den Pol AN, Finkbeiner SM, Cornell-Bell AH. 1992. Calcium excitability and
13 oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia *in vitro*. J.
14 Neurosci., 12: 2648–2664.
- 15 Vatine G, Vallone D, Appelbaum L, Mracek P, Ben-Moshe Z, Lahiri K, Gothilf Y,
16 Foulkes NS. 2009. Light directs zebrafish period2 expression via conserved
17 D and E boxes. PLoS Biol. 7, e1000223
- 18 Velarde E, Haque R, Iuvone PM, Azpeleta C, Alonso-Gomez AL, Delgado MJ.
19 2009. Circadian clock genes of goldfish, *Carassius auratus*: cDNA cloning
20 and rhythmic expression of period and cryptochrome transcripts in retina,
21 liver, and gut, J. Biol. Rhythms, 24: 104–113.

- 1 Veldhuis JD, Roemmich JN, Richmond EJ, Bowers CY. 2006. Somatotropic and
2 gonadotropic axes linkages in infancy, childhood, and the puberty-adult
3 transition, *Endocr. Rev.* 27 (2) 101–140
- 4 Wang H. 2008. Comparative analysis of teleost fish genomes reveals
5 preservation of different ancient clock duplicates in different fishes. *Mar*
6 *Genomics.* 2008 Jun;1(2):69-78.
- 7 Wang H. 2009. Comparative genomic analysis of teleost fish *bmal* genes.
8 *Genetica* 136: 149–161.
- 9 Ware JV, Nelson OL, Robbins CT, Jansen HT. 2012. Temporal organization of
10 activity in the brown bear (*Ursus arctos*): Roles of circadian rhythms, light
11 and food entrainment. *Am. J. Physiol. Regul. Int. Comp. Physiol.*, 303: R890–
12 R902.
- 13 Watanabe N, Itoh K, Mogi M, Fujinami Y, Shimizu D, Hashimoto H, Uji S, Yokoi
14 H, Suzuki T. 2012. Circadian pacemaker in the suprachiasmatic nuclei of
15 teleost fish revealed by rhythmic *period2* expression. *General and*
16 *Comparative Endocrinology*, 178: 400–407.
- 17 Whitmore D, Foulkes NS, Strahle U, Sassone-Corsi P. 1998. Zebrafish clock
18 rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators.
19 *Nat. Neurosci.*, 1: 701–707.
- 20 Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. 2000. Light acts directly on organs
21 and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature*, 404:87–91.
- 22 Wyatt JK, Dijk DJ, Ritz-de Cecco A, Ronda JM & Czeisler CA 2006

- 1 Sleepfacilitating effect of exogenous melatonin in healthy young men and
2 women is circadian-phase dependent. *Sleep* 29:609–618
- 3 Yamamoto T, Nakahata Y, Soma H, Akashi M, Mamino T, Takumi T. 2004.
4 Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral
5 tissues. *BMC Mol. Biol.*, 5: 18.
- 6 Yamazaki S, Kerbeshian MC, Hocker CG, Block GD, Menaker M. 1998.
7 Rhythmic properties of the hamster suprachiasmatic nucleus in vivo. *J.*
8 *Neurosci.*, 18: 10709–10723.
- 9 Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD,
10 Sakaki Y, Menaker M, Tei H. 2000. Resetting central and peripheral
11 circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288: 682–685.
- 12 Yang S, Liu A, Weidenhammer A, Cooksey RC, McClain D, Kim MK and
13 Aguilera G. 2009. The role of mPer2 clock gene in glucocorticoid
14 and feeding rhythms. *Endocrinology*, 150: 2153 – 2160.
- 15 Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Burkh ED, Slepka SM,
16 Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. 2004. PERIOD2:
17 LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent
18 circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
19 *USA*, 101: 5339–5346.
- 20 Young MW, Kay S (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian
21 clocks. *Nat Rev Genet* 2:702–715
- 22 Zabielski R. 2004. Rhythms in experimental gastroenterology—cyclic activities of

- 1 the gastrointestinal tract. *J. Physiol. Pharmacol.*, 55:19–32.
- 2 Zachmann A, Falcón J, Knijff SCM, Bolliet V, Ali MA. 1992. Effects of
3 photoperiod and temperature on rhythmic melatonin secretion from the
4 pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*) in vitro. *Gen.
5 Comp. Endocrinol.*, 86:26–33.
- 6 Zhdanova I, Reeb SG. 2006. Circadian rhythms in fish. In: Sloman KA, Wilson
7 RW, Balshine S eds. *Fish Physiology, Vol 24: Behaviour and Physiology of
8 Fishes*. New York: Elsevier, 197–238.
- 9 Zhdanova IV, Yu L, Lopez-Patino M, Shang E, Kishi S. 2008. Aging of the
10 circadian system in zebrafish and the effects of melatonin on sleep and
11 cognitive performance. *Brain Res. Bull.*, 75(2–4): 433–441.
- 12 Zhdanova IV, Masuda K, Bozhokin SV, Rosene DL, González-Martínez J,
13 Schettler S. 2012. Familial circadian rhythm disorder in the diurnal primate,
14 *Macaca mulatta*. *PLoS ONE* 7:e33327. doi: 10.1371/journal.pone.0033327.
- 15 Zielinski WJ. 1986. Circadian rhythms of small carnivores and the effect of
16 restricted feeding on daily activity. *Physiol. Behav.*, 38: 613–620.
- 17 Ziv L, Levkovitz S, Toyama R, Falcon J, Gothilf Y. 2005. Functional
18 development of the zebrafish pineal gland: light-induced expression of
19 *period2* is required for onset of the circadian clock. *J. Neuroendocrinol.*, 17:
20 314–320.
- 21 Ziv L, Gothilf Y. 2006. Circadian time-keeping during early stages
22 of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 4146–4151.

1 Zvonic S, Ptitsyn AA, Conrad SA, Scott LK, Floyd ZE, Kilroy G, Wu X, Goh BC,
2 Mynatt RL, Gimble JM. 2006. Characterization of peripheral circadian
3 clocks in adipose tissues. *Diabetes*,55: 962–970.