



LEANDRO SANTOS COSTA

**RITMO DIÁRIO DE GENES RELACIONADOS
COM O EIXO SOMATOTRÓPICO E RESPOSTA
GÊNICA CAUSADA PELA APLICAÇÃO ÚNICA
DE GH EM TILÁPIA**

LAVRAS – MG

2015

LEANDRO SANTOS COSTA

**RITMO DIÁRIO DE GENES RELACIONADOS COM O EIXO
SOMATOTRÓPICO E RESPOSTA GÊNICA CAUSADA PELA
APLICAÇÃO ÚNICA DE GH EM TILÁPIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Priscila Vieira e Rosa

Coorientadores

Dr. Rodrigo Fortes da Silva

Dr. Francisco Javier Sanchez Vazquez

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Costa, Leandro Santos.

Ritmo diário de genes relacionados com o eixo somatotrópico e
resposta gênica causada pela aplicação única de GH em Tilápia /
Leandro Santos Costa. – Lavras : UFLA, 2015.

97 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientadora: Priscila Vieira e Rosa.

Bibliografia.

1. Fator de crescimento semelhante a insulina. 2. Fisiologia. 3.
Peixe. 4. Polipeptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

LEANDRO SANTOS COSTA

**RITMO DIÁRIO DE GENES RELACIONADOS COM O EIXO
SOMATOTRÓPICO E RESPOSTA GÊNICA CAUSADA PELA
APLICAÇÃO ÚNICA DE GH EM TILÁPIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 29 de abril de 2015.

Dr. Francisco Javier Sanchez Vazquez	UM
Dr. José Fernando Lopez Olmeda	UM
Dr. Rodrigo Fortes da Silva	UFRB
Dr. Luciano José Pereira	UFLA

Dra. Priscila Vieira e Rosa
Orientadora

LAVRAS – MG

2015

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelas oportunidades concedidas e apoio financeiro no Brasil e no exterior.

Em especial à Prof^a. Dra. Priscila Vieira e Rosa, pela amizade, orientação, apoio e confiança, presentes em todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Fortes da Silva, pela amizade e incentivo aos meus estudos no exterior.

Ao Professor Dr. Luciano José Pereira, pela dedicação nas disciplinas ministradas e pelos ensinamentos de metabolismo e fisiologia.

À Faculdade de Biologia da Universidade de Murcia - Espanha, pelo apoio concedido para a realização do experimento, em especial ao Departamento de Fisiologia Animal e ao Laboratório de Biologia Molecular do C.A.I.D (Centro de Apoyo a la Investigación y Desarrollo), na pessoa de César Flores Flores, pela atenção e auxílio nas análises.

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Sánchez Vazques, da Universidade de Murcia, Espanha, pela oportunidade de estudo e coorientação no projeto.

Ao PhD. José Fernando Lopez Olmeda, pela grande ajuda e dedicação nos experimentos e nas análises laboratoriais.

Aos funcionários da Estação de Piscicultura da UFLA, Elici Pereira e José Roberto, pela grande amizade e aos bons momentos de alegria e descontração. As festas da piscicultura ficarão gravadas para sempre na memória.

Aos grandes amigos e irmãos de pesquisa Renan Rosa Paulino e sua futura esposa Mayara, a Raquel Tatiane Pereira e Marinez Moraes de Oliveira, companheiros de trabalho e de farras.

Ao Amigo Lucas Ferreira Guerra, grande companheiro de república nesses sete anos de UFLA.

A todos os amigos de pós-graduação, em especial ao Diego Costa, Tamira Orlando, Daniel Okamura e Felipe Guedes de Araújo.

Aos alunos de graduação e integrantes do NAQUA (Núcleo de Estudos em Aquicultura), pela dedicação, principalmente aos estagiários de piscicultura Edgar, Murilo, Felipe, Vinícius, Nayara e Natan.

Aos colegas da Universidade de Murcia, Espanha, Juan Fernado, Carolina Bello, Viviana di Rosa e Oli Oliver, pela ajuda na condução do experimento, amizade e solidariedade nesta etapa no exterior.

Aos meus pais, João Gualberto Costa e Cleuza Fátima Santos Costa, aos irmãos Natália Cristina Santos Costa e Lucas Gualberto Santos Costa e demais familiares, por acreditarem e me apoiarem incondicionalmente em todas as minhas decisões.

A minha queria namorada, mulher, futura noiva e esposa Paula Adriane Perez Ribeiro, que sempre me apoiou em todas as decisões, nos momentos difíceis e de alegria. A tão esperada filha, Gabriela Ribeiro Costa, que ainda não está no meio de nós, porém já desperta um grande amor de Pai e Protetor.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, por tudo!

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a presença de ritmos biológicos e os efeitos da administração de hormônio do crescimento (GH) sobre o eixo somatotrópico de tilápias (*Oreochromis niloticus*), alimentadas em ML (alimentação no meio do dia) ou MD (alimentação no meio da noite), foram executados dois experimentos no Laboratório de cronobiologia da Universidad de Murcia, Espanha, utilizando-se 96 animais (48 em cada experimento), com peso médio de $88,97 \pm 36,8$ g. Em ambos os experimentos foram avaliadas as expressões de mRNA de *gh* na hipófise; *pacap-1a* e *pacap-1b* no hipotálamo; *ghr-1*, *ghr-2*, *igf-1*, *igf2a* e *igf-2r* no fígado e *ghr-1*, *ghr-2*, *igf-1ra* e *igf-2r* no músculo, por qPCR e o GH plasmático foi analisado pelo método de ELISA. No primeiro experimento, os animais foram divididos em oito grupos (seis animais por grupo), sendo quatro alimentados em ML e quatro em MD. Os tecidos da hipófise, hipotálamo, fígado, músculo e o sangue foram coletados a cada seis horas (ZT3, ZT9, ZT15 e ZT21) e em cada ponto foram utilizados todos os animais de um grupo comendo em ML e MD. Os dados de expressão gênica e GH plasmático foram analisados pelo teste de COSINOR ($p < 0,05$) para detectar a presença de ritmos diários. Somente os *ghr-1* e *ghr-2* em animais comendo em ML apresentaram ritmos no fígado, registrando a mesma acrofase (2 h 59 min). No músculo, somente o *ghr-1* apresentou ritmo, com acrofase às 4 h 10 min e às 9 h 01min, para animais comendo em ML e MD, respectivamente. No segundo experimento, os animais foram divididos em oito grupos (seis animais por grupo), sendo quatro com alimentação em ML e quatro em MD. Dos grupos alimentados em ML, um recebeu injeção de GH e o outro de solução salina (controle), às ZT3, enquanto os outros dois grupos receberam às ZT15. O mesmo procedimento foi feito com os peixes que recebiam alimentação em MD. Os dados foram submetidos à ANAVA, com teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$) para avaliar a diferença entre os grupos, e ao teste F para detectar diferenças entre os animais injetados e seu controle. A administração de GH não provocou nenhum efeito sobre a expressão dos genes avaliados no hipotálamo e hipófise. A expressão gênica de *igf-2a* no fígado e o *igf-2r* no músculo, em animais alimentados em ML, foi estimulada, de forma simultânea, pela administração de GH às ZT15. O *ghr2* foi estimulado, no fígado e no músculo, pela administração de GH às ZT15, porém, sua resposta no músculo foi mais intensa em animais alimentados em ML, do que em MD. Os dois experimentos apresentados mostram que os juvenis de tilápia apresentam ritmos de expressão de alguns dos genes do eixo somatotrópico e que a hora de administração do hormônio de crescimento afeta a resposta fisiológica do animal.

Palavras-chave: Fator de crescimento semelhante a insulina. Fisiologia. Peixe. polipeptídeo hipofisário ativador de adenilato ciclase. Receptor do hormônio do crescimento.

ABSTRACT

With the aim of assess the existence of biological rhythms and the effects of exogenous GH administration on the somatotrophic axis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed either at ML or at MD, two experiments were performed at the University of Murcia-ES, using 96 animals (48 fish per experiment) with an average body weight of 88.97 ± 36.8 g (mean \pm S.D.). In both experiments, we evaluated the mRNA expression, by means of qPCR, of *gh* in the pituitary; *pacap-1a* and *pacap-1b* in the hypothalamus; *ghr-1*, *ghr-2*, *igf-1*, *igf-2a* and *igf-2r* in the liver; and *ghr-1*, *ghr-2*, *igf-1ra* e *igf-2r* in the muscle. In addition, plasma GH was evaluated by means of ELISA. In the first experiment, the animals were divided into 8 groups (n=6), 4 of them were fed at ML and 4 were fed at MD. Samples from pituitary, hypothalamus, liver, muscle and plasma were collected every 6 hours (ZT3, ZT9, ZT15 and ZT21). In each time point, all animals from one of the groups fed at ML and one of the groups fed at MD were collected. Data from gene expression and plasma GH were subjected to Cosinor test ($p < 0.05$) to detect the presence of daily rhythms. Only *ghr-1* and *ghr-2* in ML-fed animals displayed significant rhythms in liver, located at a similar acrophase (2:59 hrs). In muscle, only *ghr-1* showed a significant rhythm, with an acrophase at 4:10 and 9:01 in fish fed at ML and MD, respectively. In the second experiment, fish were divided into 8 groups (n=6), with 4 groups being fed at ML and 4 fed at MD. In 2 groups fed at ML, one group was injected with GH and the other with saline solution (control), both at ZT3; for the other 2 groups, one was injected with GH and the other with saline solution, both at ZT15. The same procedure was performed with the fish fed at MD. Data were subjected to one-way ANOVA followed by a Tukey *post hoc* test ($p < 0.05$) to check for statistically significant differences between groups and an F-test to check for differences between each injected groups and its respective control. GH administration did not induce any effect on the genes studied in hypothalamus and pituitary. *igf-2a* gene expression in the liver and *igf-2r* expression in the muscle, in animals fed at ML, were stimulated by GH administration at ZT15. *ghr2* was stimulated, both in liver and muscle, by GH administration at ZT15, although the response was higher in animals fed at ML than in fish fed at MD.

Keywords: Insulin-like growth factor. Physiology. Fish. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. Growth hormone receptor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O diagrama representa uma ilustração simplificada dos componentes e efeitos do sistema de GH no crescimento muscular de peixes	24
Figura 2	Esquema simplificado do mecanismo de ação de GH-GHR	27
Figura 3	Fluxograma representativo do experimento 1, mostrando os 40 dias do período pré-experimental, necessário para a sincronização dos animais ao horário de fornecimento do alimento, o dia da execução do experimento com os horários de coleta de amostras e o horário de fornecimento do alimento dos dois tratamentos avaliados (ML ou MD) de tilápias	42
Figura 4	Fluxograma representativo do experimento 2	43
Figura 5	Actograma (A) e onda média (B) da atividade locomotora de tilápias alimentadas em ML, durante o período pré-experimental.....	49
Figura 6	Actograma (A) e onda média (B) da atividade locomotora de tilápias alimentadas em MD, durante o período pré-experimental.....	51
Figura 7	Expressão relativa dos genes de <i>ghr1</i> (A) e <i>ghr2</i> (B) no tecido hepático, <i>ghr1</i> (C e D) no tecido muscular	55
Figura 8	Expressão relativa dos genes de <i>igf-1</i> (A) no fígado e <i>igf-1ra</i> (B) e <i>ghr2</i> (C), no músculo de tilápias	57
Figura 9	Gráficos representativos das expressões relativas dos mRNA para GH na hipófise (gráfico A) e <i>pacap-1b</i> no hipotálamo (gráfico B).....	63
Figura 10	Gráficos representativos das expressões relativas do mRNA para <i>igf-2a</i> (gráfico A) e <i>ghr2</i> (gráfico B), no fígado de tilápias ...	65

Figura 11	Gráficos representativos das expressões dos mRNAs para <i>igf1ra</i> (A) e <i>igf2r</i> (B), no músculo de tilápias.....	67
Figura 12	Gráfico representativo das expressões relativas dos mRNA para <i>ghr1</i> (A) e <i>ghr2</i> (B) em músculo de tilápia	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos primers de tilápia utilizados na qPCR em tempo real.....	46
Tabela 2	Ritmo diário calculado pela análise de cosinor ($p < 0,05$,) para os genes de <i>gh</i> , <i>pacap1a</i> , <i>pacap1b</i> , <i>igf-1</i> , <i>igf-2a</i> , <i>igf-1ra</i> , <i>igf-2r</i> , <i>ghr1</i> , <i>ghr2</i> na hipófise, hipotálamo, fígado e músculo de tilápias alimentadas em ML ou MD	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Ritmos biológicos em peixes	14
2.2	Controle endógeno dos ritmos biológicos	16
2.3	Ritmos de alimentação em peixes	19
2.4	Cronofarmacologia	22
2.5	Eixo somatotrópico em peixes	23
2.5.1	Hormônio do crescimento (GH)	23
2.5.2	Receptores do hormônio do crescimento (GHR)	26
2.5.3	Polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP) e hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH)	29
2.5.4	Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)	31
2.5.5	Receptores do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFRs)	34
2.6	Tilápia	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Animais e instalações	40
3.2	Experimento 1: Ritmos diários de genes do eixo somatotrópico	41
3.3	Experimento 2: Resposta gênica de aplicação do hormônio do crescimento (GH)	42
3.4	Concentração de GH plasmático	43
3.5	Transcrição reversa e análise de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR)	44
3.6	Análises estatísticas	46
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	48
4.1	Ritmos diários de genes do eixo somatotrópico	48
4.2	Resposta gênica de aplicação do hormônio do crescimento (GH)	62
5	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

Os avanços na pesquisa animal foram muito acentuados nas últimas décadas. Entretanto, ainda há muitas perguntas a serem respondidas sobre o comportamento fisiológico e metabólico dos animais. Pesquisas na área da biologia oferecem um grande desafio, pois o ambiente é um forte modulador das respostas biológicas, seja pelo fotoperíodo, alimentação, ciclos lunares, temperatura, períodos de chuvas e seca, entre outros, que podem induzir ou inibir eventos como a reprodução e o crescimento animal. O organismo é capaz de se adaptar a tais variações, que na maioria das vezes são cíclicas, e com a evolução surgem os ritmos biológicos, definidos como qualquer evento endógeno, que se repete de maneira regular num organismo e que são controlados, sobretudo, pelo cérebro. Quando os ritmos biológicos são interrompidos, muitos distúrbios sistêmicos são observados. Por exemplo, em caso de troca no período de fornecimento dos alimentos, de diurno para noturno, o sistema circadiano e seus osciladores não são ajustados imediatamente, resultando num estado transitório de dessincronização interna.

O hipotálamo e a hipófise controlam a síntese e a liberação de vários hormônios, como os que compõem os eixos da reprodução, do estresse ou do crescimento. Nos dois primeiros eixos já foram descritos ritmos biológicos para diversas espécies de peixes, porém, no eixo somatotrópico são escassos os trabalhos.

O peptídeo pituitário ativador da adenilato ciclase (PACAP) é classificado como principal estimulador da liberação do hormônio do crescimento (GH) que controla a hipertrofia, o crescimento somático do tecido muscular, entre outros, de forma direta ou indireta. O GH estimula a liberação dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs). Estes hormônios agem

na superfície das células do tecido alvo, por meio dos seus receptores, os IGF1R ou IGF2R.

A cronofarmacologia é um ramo da farmacologia que estuda os efeitos dos fármacos no organismo, em função dos ritmos biológicos. Em humanos, existem indicações para o tratamento de doenças como o nanismo, em que o GH tem mais efeito quando administrado durante a noite. Em peixes, há relatos da avaliação dos efeitos da aplicação crônica de GH sobre o crescimento, porém, o horário da aplicação não é avaliado e também não se sabe quais são os efeitos na expressão do mRNA dos genes que compõem o eixo somatotrópico.

A tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) é uma das principais espécies de peixe de água doce produzida mundialmente, já possuindo seu genoma completamente sequenciado na base de dados do Ensembl, o que facilita os estudos na área de expressão gênica e comportamento hormonal nesta espécie.

O presente trabalho teve como objetivos descrever a presença de ritmos biológicos no eixo somatotrópico em tilápias; avaliar se o horário de fornecimento do alimento modifica os ritmos biológicos desses animais; relatar os efeitos do horário de administração aguda do GH na expressão dos genes do eixo somatotrópico e avaliar se o horário de alimentação dos animais influencia a expressão gênica provocada pela administração exógena do GH.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ritmos biológicos em peixes

Desde o aparecimento da vida, o nosso planeta tem sido submetido ao ritmo diário de luz e escuridão, ritmos sazonais e mudanças climáticas que são causadas pela rotação e translação da terra. Por isso, o aparecimento de alternância entre dia e noite, deixou marcas na evolução dos organismos e apenas os animais que viviam nas profundidades dos oceanos ou em cavernas, não adquiriram essas marcas, que são chamadas de ritmos biológicos (KULCZYKOWSKA; POPEK; KAPOOR, 2010).

Os ritmos biológicos são definidos como qualquer evento endógeno, que se repete de maneira regular num organismo, e os mais estudados são aqueles relacionados às mudanças ambientais, sendo um evento cíclico caracterizado por um ambiente no qual o animal pode se adaptar. Porém, isso não significa que o período dos ritmos biológicos seja idêntico ao do ambiente, sendo possíveis pequenas variações. Por outro lado, as mudanças não periódicas são irregulares e afetam a expressão rítmica, apresentando também um significado ecológico (MORGAN, 2004). Os ciclos geofísicos criados pelos movimentos da terra são responsáveis por recorrentes ciclos periódicos vivenciados pelos organismos vivos. Sob tais ciclos, os animais têm desenvolvido comportamentos e mecanismos fisiológicos para antecipar previsíveis mudanças no ambiente, conseguindo, portanto, otimizar os processos biológicos (VERA et al., 2009). As mudanças ambientais atuam como um “Zeitgeber” (em alemão) ou “Timegiver” (em inglês), ou seja, sincronizadores que arrastam os ritmos biológicos em suas periodicidades, amplitudes e fases (RENSING; RUOFF, 2002; VERA et al., 2009). O sincronizador “Zeitgeber” mais importante é a alternância entre dia e noite, porém, existem outros relacionados aos ciclos sociais e à disponibilidade

de alimento, sendo este também considerado um importante sincronizador para vários grupos de vertebrados (SANCHEZ-VAZQUEZ; ZAMORA; MADRID, 1995; VERA et al., 2007). Desse modo, existem vários sincronizadores que têm a capacidade de atuar sobre os ritmos biológicos, assim como também são vários os ritmos no organismo sincronizado por ciclos ambientais.

As pequenas diferenças entre os ritmos biológicos e os ciclos geofísicos levaram à denominação “ritmo circadiano”, do latim *circa* (cerca de) e *diem* (dia). Sob estas condições, o termo tempo circadiano (do inglês circadian time ou CT) é comumente utilizado e refere-se ao tempo do relógio biológico interno. Portanto, o termo "circadiano" classifica os ritmos diários de aproximadamente 24 horas, e circannual como cerca de um ano, ou ritmos sazonais (KULCZYKOWSKA; POPEK; KAPOOR, 2010). Nos vertebrados, os ritmos biológicos têm sido classificados de acordo com sua periodicidade, podendo ser ultradiano, que são ciclos que se repetem em intervalos de até 20 horas; circadianos, ciclos que se repetem em intervalos de 20 a 28 horas e infradianos, que se repetem em intervalos maiores do que 28 horas (HERRERO; MADRID; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2009; SCHULZ; LEUCHTENBERGER, 2006). Dentro desses ritmos, o ciclo circadiano é considerado o fator ambiental sincronizador mais importante dos ritmos biológicos (VERA et al., 2007) e presente em diversos grupos de vertebrados e invertebrados, sendo, portanto, um dos mais estudados (VERA et al., 2009).

Quando os animais são mantidos num ciclo de 24 horas, sendo 12 horas de luz e 12 horas de escuro (LD 12:12), o tempo Zeitgeber ou ZT0 corresponde ao início do período de luz, e o ZT12 ao início do período de escuro. Assim, todos os pontos de tempo entre 0 e 12 se referem às horas durante o dia, enquanto que aqueles entre 12 e 24 se referem às horas durante a noite. Uma vez que a periodicidade do relógio interno seja diferente de 24 horas, o CT não é o mesmo que ZT (VERAS et al., 2013).

2.2 Controle endógeno dos ritmos biológicos

Até meados do século XX, já se havia acumulado um grande número de investigações sobre a ocorrência de ritmos biológicos circadianos e já se visualizava o conceito de um temporizador interno (LIMA; VARGAS, 2014). Porém, o termo “relógio biológico” foi utilizado pela primeira vez apenas no final da década de 1940, pelo cientista alemão Gustav Kramer em seus trabalhos com migração de aves. Ele argumentara que, para que as aves migrassem para o norte na primavera, tendo como referência um ponto em constante movimento (o sol), necessitariam de uma entidade fisiológica precisa na contagem do tempo, ou seja, um relógio biológico (KULCZYKOWSKA; POPEK; KAPOOR, 2010; LIMA; VARGAS, 2014).

Outros trabalhos que faziam alusão à entidade fisiológica do relógio, referenciada por Kramer, eram os de Curt P. Richter, de 1960. Segundo ele, os relógios biológicos seriam “instrumentos do corpo para manter a contagem do tempo, independentemente das pistas ambientais externas”. Essa conclusão surgiu por meio da observação de que pacientes hospitalizados apresentavam ritmos fisiológicos de moléstias com períodos diferentes de 24 horas, indicando a capacidade do organismo em contar o tempo em diversas unidades. Richter sugeriu também que os diferentes relógios internos podem envolver um ou mais órgãos do corpo, e que a localização desses relógios poderia ser periférica ou central. Dessa forma, Richter foi o primeiro pesquisador a vislumbrar uma identidade anatômica definida para o relógio biológico em mamíferos e, por isso, deu continuidade a estudos nesse campo nos anos seguintes (LIMA; VARGAS, 2014).

O reconhecimento de estruturas centrais do sistema de temporização de mamíferos começou com os experimentos originais de Curt Richter, nos anos seguintes (1965 a 1967), que consistiam na lesão progressiva do sistema nervoso

central e observação da permanência ou abolição dos ritmos diários em ratos. Desses experimentos ele concluiu que o centro responsável pela ritmicidade encontrava-se no hipotálamo. Partindo do princípio de que o sincronizador ambiental mais importante era o ciclo luz/escuro, o grupo de Robert Moore iniciou sua busca pelos olhos e descreveu, pela primeira vez, a via retino-hipotalâmica, a qual terminava em dois pequenos núcleos na base do cérebro: os núcleos supraquiasmáticos (NSQs) (MOORE; LENN, 1972).

Posteriormente, demonstrou-se que, tanto o ritmo circadiano de liberação da corticosterona, como os ritmos circadianos de atividade e de ingestão de água eram suprimidos pela lesão dos NSQs em ratos (MOORE; EICHLER, 1972; STEPHAN; ZUCKER, 1972). Nesta mesma linha de experimentos, destacam-se os trabalhos do grupo de Michael Menaker, que inicialmente demonstraram que a extirpação da glândula pineal causava arritmicidade em pardais (GASTON; MENAKER, 1968), indicando um importante papel desse órgão sobre os ritmos endógenos em aves.

Nos animais normalmente há um relógio dominante ou um relógio central, localizado no cérebro. Os relógios situados em outras partes do corpo são chamados de relógios periféricos ou osciladores periféricos (LIMA; VARGAS, 2014). O grau de autonomia de cada relógio depende muito da espécie. Nos mamíferos, o relógio central é sensível à luz e controla os relógios periféricos, que não são fotossensíveis, mas que podem ser arrastados por outros sinais originados dentro do organismo, como por exemplo, os hormônios, que por sua vez podem ser controlados pelo Sistema Nervoso Central (SNC) (KULCZYKOWSKA; POPEK; KAPOOR, 2010). Em outros organismos (por exemplo, insetos), os relógios periféricos podem ser fotossensíveis (fotorreceptores via extra-retinal) e independentes do relógio central. Nos vertebrados não mamíferos como o peixe-zebra, a maioria dos osciladores é autônoma e esses osciladores têm seus próprios fotorreceptores, embora com

algum grau de dependência a partir do relógio central. É evidente que dentro do organismo, existem muitas interações entre relógio central e periféricos (KULCZYKOWSKA; POPEK; KAPOOR, 2010; LIMA; VARGAS, 2014).

A sincronização do relógio central com os periféricos em mamíferos é feito da seguinte forma: a informação luminosa é percebida pela retina e transmitida aos núcleos supraquiasmáticos através do trato retino-hipotalâmico. As projeções dos NSQs, por sua vez, possuem, pelo menos, quatro alvos neuronais: neurônios endócrinos, neurônios autonômicos do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), outras estruturas hipotalâmicas e áreas externas ao hipotálamo (COLWELL, 2011). Estas vias eferentes são capazes de sincronizar os relógios periféricos, controlando diversas funções fisiológicas, tais como o momento de liberação hormonal, o comportamento alimentar e as flutuações de temperatura (BUIJS; KALSBECK, 2001).

A atividade metabólica dos órgãos periféricos é informada ao hipotálamo diretamente, pela ação de hormônios, de axônios do núcleo do trato solitário (NTS) ou indiretamente por meio de projeções dos núcleos parabraquiais (BUIJS; KALSBECK, 2001). Sabendo-se que o NTS e os núcleos parabraquiais possuem como alvos as mesmas estruturas hipotalâmicas inervadas pelos NSQs, acredita-se que o ritmo dos osciladores periféricos seja sincronizado tanto por eferências dos NSQs, quanto por alças de autorregulação, que reforçam a mensagem proveniente do relógio central, ambos atuando sobre o hipotálamo (BUIJS; KALSBECK, 2001; KALSBECK et al., 2011). Assim, essas conexões permitem que o organismo sincronize a informação ambiental externa à informação metabólica proveniente dos órgãos periféricos.

Quando os ritmos biológicos são interrompidos, sejam por fatores genéticos ou ambientais, muitos distúrbios sistêmicos são observados. Por exemplo, em caso de troca no período de fornecimento dos alimentos, de diurno

para noturno, o sistema circadiano e seus osciladores não são ajustados imediatamente, resultando num estado transitório de dessincronização interna.

Os animais são forçados a buscar alimentos num período em que deveriam estar inativos, e permanecerem inativos num período em que deveriam estar ativos. Estes sinais externos perturbadores induzem à perda de coerência entre o oscilador central e os periféricos, podendo acarretar distúrbios que caracterizam o quadro de dessincronização interna, como distúrbios cardiovasculares e gastrointestinais, obesidade, estresse, desregulação dos ritmos metabólicos e endócrinos e esterilidade (HAUS; SMOLENSKY, 2006; KNUTSSON, 2003; SALGADO-DELGADO et al., 2008; STOKKAN et al., 2001).

2.3 Ritmos de alimentação em peixes

Desde os primeiros estudos, os padrões diários de comportamento alimentar em peixes foram caracterizados em uma ampla variedade de espécies. A maioria dos animais está ativa durante o dia ou durante a noite, mas raramente durante um período de 24 horas. Eles adquirem esses padrões de atividade como resultado de longos períodos de evolução, sob forças seletivas estáveis, como a otimização pela busca do alimento, sucesso reprodutivo e a fuga de predadores. Na maioria das espécies, o comportamento alimentar diurno ou noturno sofreu uma evolução genética e está condicionado pela existência de requisitos sensoriais, tais como a dependência da visão para a captura de presas (MADRID; BOUJARD; SANCHEZ-VAZQUEZ, 2001).

De modo geral, os padrões de atividade em mamíferos e aves são fáceis de classificar, devido à estabilidade desse comportamento. No entanto, quando se trata de peixes teleósteos, esta tarefa se torna mais complexa, uma vez que indivíduos da mesma espécie podem exibir uma alta flexibilidade em seus

padrões de atividade alimentar e locomotora diária. Algumas espécies de peixes podem exibir comportamentos diurnos e noturnos, passando de uma fase para a outra ao longo do seu ciclo de vida. Esta capacidade é conhecida como dualismo e refere-se a uma característica comum entre os peixes. Os mecanismos que regulam o dualismo são desconhecidos, sendo frequentemente associados a um sistema circadiano altamente flexível, que permite uma adaptação rápida dos animais às alterações ambientais (LÓPEZ-OLMEDA; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2009; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 1996). Além disso, o comportamento de locomoção e de alimentação pode apresentar fases distintas, sendo que o mesmo indivíduo pode exibir atividade locomotora diurna e atividade alimentar noturna, vice-versa (SANCHEZ-VAZQUEZ; ZAMORA; MADRID, 1995; VERA; MADRID; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2006).

Pesquisas em ambiente controlado permitiram inverter a fase de comportamento alimentar de algumas espécies de peixes, restringindo o alimento na fase oposta à fase de alimentação, sendo esta última selecionada espontaneamente pelos animais, embora alguns peixes mantivessem suas demandas na fase em que o alimento foi restrito. Isto indica certa resistência destes animais a se adaptarem à alimentação fora de sua fase de preferência (SANCHEZ-VAZQUEZ; ZAMORA; MADRID, 1995).

O alimento pode agir como um sincronizador em animais e arrasta uma série de ritmos, quando disponível de forma constante. Quando o alimento é fornecido por alguns dias sempre no mesmo horário, é possível observar um aumento na atividade locomotora nos momentos que antecedem a hora de alimentação. Esse fenômeno é conhecido como atividade alimentar antecipatória (do inglês “food anticipatory activity” - FAA) (MISTLBERGER, 1994) e tem sido relatado em uma grande variedade de animais (STEPHAN, 2002). A FAA pode ser definida como o aumento da atividade, duas vezes ou mais, acima da

atividade média diária, que ocorre no intervalo inferior a 30 minutos da hora da alimentação (MISTLBERGER, 1994).

A sincronização do tempo de alimentação para os peixes envolve vantagens semelhantes às relacionadas com a sincronização luminosa. Quando a disponibilidade de alimentos é previsível, os animais podem usar esta informação para maximizar a utilização do alimento. Por exemplo, quando o alimento é distribuído aleatoriamente ao longo do dia, o animal deve permanecer num estado ativo contínuo e isso implica num grande gasto de energia (VERA et al., 2007). Em contraste, a antecipação de uma refeição prepara o animal e proporciona melhorias na digestão e utilização dos nutrientes (SANCHEZ-VAZQUEZ; MADRID, 2001).

A FAA também é influenciada pelo teor de energia e tamanho das partículas do alimento oferecido. Os peixes podem apresentar atividade antecipatória de até três alimentações diárias, embora a atividade seja maior quando se fornece uma única alimentação. Além disso, alimentos de pequeno tamanho induzem uma maior atividade antecipatória quando comparados aos de maior tamanho, sendo que os peixes são capazes de antecipar não só o tempo de alimentação, mas também o lugar onde o alimento é fornecido, alcançando uma integração entre espaço e tempo para otimizar o consumo de alimento (SANCHEZ-VAZQUEZ; MADRID, 2001).

Com o ritmo alimentar constante e cíclico, muitas variáveis metabólicas e comportamentais em mamíferos têm sido observadas, tais como: atividade locomotora, comportamento alimentar, ingestão de água, temperatura corporal e corticosterona plasmática. Este ritmo de alimentação em peixes não é tão conhecido como em mamíferos. Os ritmos de cortisol e glicose sanguíneos são as variáveis metabólicas mais estudadas até o momento em peixes. Os ritmos circadianos de enzimas envolvidas no metabolismo têm sido relatados em várias

espécies de peixes, sendo algumas dependentes da alimentação e outras não (VERAS et al., 2013).

Muitos hormônios apresentam ritmos circadianos e sugerem que o metabolismo também pode apresentar tais ritmos. O ritmo diário de vários compostos envolvidos no metabolismo de carboidratos vem sendo estudado, sendo a variação de glicose constatada em várias espécies. Recentemente, um ritmo diário de tolerância à dextrina em peixes foi detectado, sendo observadas diferenças significativas nos níveis de glicose pós-prandial, dependendo do horário da alimentação (LÓPEZ-OLMEDA; EGEA-ALVAREZ; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2009). Os mecanismos que conduzem estes ritmos diários de tolerância à glicose ainda não foram elucidados em peixes, enquanto que em mamíferos, parece estar relacionado ao ritmo da resistência periférica à insulina (CAUTER; POLONSKY; SCHEEN, 1997).

Poucos estudos foram feitos para avaliar a presença de ritmos nos hormônios e receptores que participam do processo de crescimento e desenvolvimento animal, como o hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF). Entretanto, a maioria dessas pesquisas está relacionada com o fotoperíodo, sendo pouquíssimas delas relacionadas ao horário de alimentação dos animais.

2.4 Cronofarmacologia

A cronofarmacologia é um ramo da farmacologia que estuda os efeitos dos fármacos no organismo em função dos ritmos biológicos. Seus conceitos são interessantes e estão sendo estudados em mamíferos, na terapia do combate ao câncer (DALLMANN; BROWN; GACHON, 2014). No caso de tratamentos com hormônio do crescimento (GH) em humanos, estudos iniciais mostram que o efeito da aplicação do GH exógeno varia conforme a hora do dia

(JANUKONYTÉ et al., 2013). Em peixes há estudos de toxicidade de anestésico como o MS 222 (tricaína) em seabream (*Sparus aurata*), com aplicação durante o dia e a noite, e nota-se que esta substância é mais efetiva e tóxica quando aplicada no período diurno (VERA; MONTOYA; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2013).

2.5 Eixo somatotrópico em peixes

O entendimento da fisiologia do crescimento em peixes é imprescindível quando o foco é a produção animal. O eixo somatotrópico é o principal estimulador para o desencadeamento da hipertrofia e hiperplasia muscular (CERDÁ-REVERTER; CANOSA, 2009), e o processo é complexo. Tudo se inicia no cérebro, mais precisamente no hipotálamo, que provoca uma cascata de comunicação celular que atinge a hipófise, fígado e músculo e envolve vários sinalizadores celulares como o GH, IGFs, peptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária (PACAP) e seus receptores (CHANG; WONG, 2009).

2.5.1 Hormônio do crescimento (GH)

O hormônio do crescimento ou somatotropina é da família das citocinas e em peixes teleósteos é classificado como uma proteína polipeptídica de cadeia simples, com 21 a 23 kDa. Estudos com clones de cDNA revelam a presença de uma única transcrição de GH em algumas espécies de peixes como a garoupa laranja (*Epinephelus coioides*), e em outros estudos mostram a presença de duas transcrições de GH, como por exemplo, em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Ao comparar os bancos de dados genômicos de peixes com os de outros vertebrados é comumente aceito que a duas duplicações do genoma podem ter ocorrido durante a evolução dos peixes ósseos. Durante o processo, a duplicação

genômica dos peixes pode dar origem a múltiplas cópias de transcritos de GH em algumas espécies de teleósteos, como nos salmonídeos (KAWAUCHI; SOWER, 2006).

O GH é liberado a partir da hipófise anterior e atua como um importante regulador metabólico e do crescimento corporal em várias espécies de peixes (Figura 1).

A primeira função identificada do GH foi sua capacidade de estimular o alongamento dos ossos longos em mamíferos.

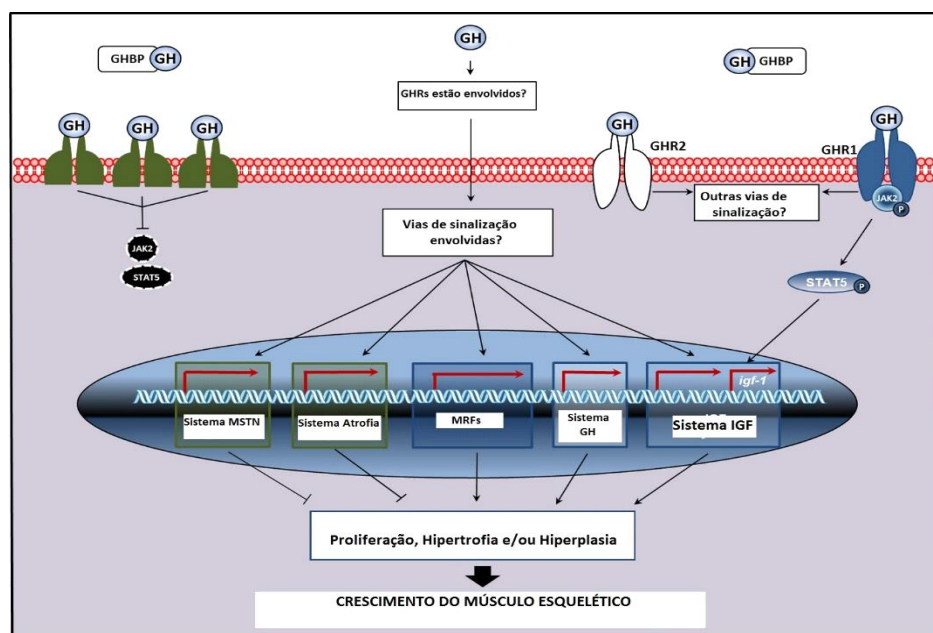


Figura 1 O diagrama representa uma ilustração simplificada dos componentes e efeitos do sistema de GH no crescimento muscular de peixes

Legenda: O GH estimula o crescimento muscular em peixes, induzindo a proliferação de células miogênicas e hiperplasia e/ou hipertrofia muscular. Os mecanismos moleculares envolvidos nestes processos incluem a regulação da transcrição de vários genes do sistema da MSTN, atrofia, GH e IGF, bem como genes que codificam para CAMs. O GH parece controlar a expressão de IGF-1 por meio da via de sinalização de JAK2/STAT5. No entanto, esta via é o estimulador mais potente do IGF1.

Fonte: Adaptado de Fuentes et al. (2013).

O tratamento com GH em peixes e mamíferos é efetivo para estimular o crescimento, tanto somático, como linear (HOLLOWAY; LEATHERLAND, 1998) Estes efeitos foram relatados em estudos utilizando GH transgênico de mamíferos em carpa comum (*Cyprinus carpio*) e GH transgênico de peixe em várias espécies de salmão e tilápias (ZBIKOWSKA, 2003). Uma queda no fator de condição (definido como peso corporal x 100/comprimento³) é comumente observada durante a intensificação do crescimento induzido pelo GH, indicando que os peixes se tornam relativamente mais magros e com ganho de massa corporal. Em espécies como a truta arco-íris, o tratamento com GH pode aumentar a síntese proteica em vários tecidos. Durante esse processo, a lipólise é ativada, pois se observa um rápido aumento nos níveis de ácido graxos e glicerol livre na corrente sanguínea e este efeito metabólico é provavelmente causado pela ação do GH sobre a quebra do triacilglicerol hepático e da acetil-coenzima A carboxilase (BJÖRNSSON, 1997).

Em alguns peixes, o GH também é conhecido por alterar o padrão de comportamento durante a busca por alimentos. Em salmonídeos, o tratamento com GH pode aumentar o apetite e a dominância no comportamento alimentar, com uma diminuição da resposta de prevenção contra predadores. Comportamento semelhante também é observado em peixes transgênicos com alta expressão de GH, sugerindo que a elevada demanda metabólica para o crescimento pode afetar o comportamento, aumentando o risco durante a busca por alimentos (SUNDSTROM et al., 2004). Acredita-se que estas alterações comportamentais sejam o resultado da ação do GH na modulação das atividades dopaminérgicas/circuito neuronal no sistema nervoso central (BJÖRNSSON et al., 2002).

Em mamíferos e peixes, o GH tem sido proposto como um “cogonadotrópico”, pois interage com o eixo gonadotrópico e contribui para a maturação sexual, gametogênese e esteroidogênese em várias espécies. As

funções reprodutivas são mediadas pelos receptores de GH expressos nas gônadas. As gônadas também apresentam produção local de GH e este tem função na esteroidogênese, por meio de ações diretas no local (REINDL; SHERIDAN, 2012).

O GH também é essencial na adaptação de peixes anádromos à água salgada. É comum encontrar aumento do GH plasmático em salmões, quando ocorre a migração do rio para o mar. O GH aumenta a tolerância e a sobrevivência dos peixes frente ao estresse hiperosmótico, atuando no aumento e proliferação das células de cloreto (MAKINO et al., 2007; SAKAMOTO; MCCORMICK, 2006). Em peixes eurialinos, o GH também se eleva durante o estresse hiperosmótico, ocorrendo também ativação simultânea das funções imunitárias (YADA, 2007).

2.5.2 Receptores do hormônio do crescimento (GHR)

As ações induzidas pelo GH são controladas pelos seus receptores, que se apresentam numa quantidade muito superior à do hormônio presente na corrente sanguínea. Em mamíferos e peixes, os receptores de GH (GHRs) pertencem à família dos receptores de citocinas do tipo 1, e são proteínas transmembrana simples que possuem entre 500 a 650 aminoácidos, dependendo da espécie (KOPCHICK; ANDRY, 2000). Todos os receptores desta família têm características em comum: domínio extracelular simples com vários pares de cisteínas conservados; domínio de ligação do GH característico F/YGEFS e domínio intracelular com caixas conservadas (1 e 2) e vários resíduos de tirosina, responsáveis pela tradução do sinal via cascata de fosforilação, como mostrado na Figura 2 (ROWLAND et al., 2004; ZHU et al., 2001).

Das caixas de sinalização conservadas, a caixa tipo 1 está envolvida na união das tirosinas quinase da família Janus (JAK) de forma majoritária, e a

caixa tipo 2 está envolvida na internalização do receptor (LICHANSKA; WATERS, 2008).

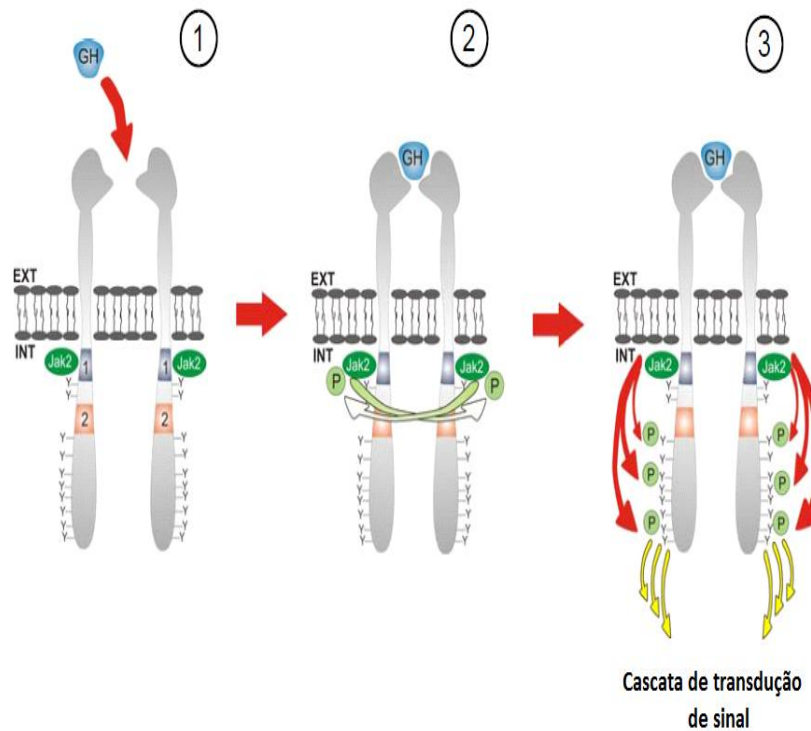


Figura 2 Esquema simplificado do mecanismo de ação de GH-GHR

Legenda: Os números de 1 a 3 indicam a sequência em que ocorrem os eventos de transdução de sinal. Na figura estão indicadas as caixas de sinalização, as quinases da família JAK e os dímeros do GHR assim como os eventos de transfosforilação e fosforilação. A letra P simboliza os grupos fosfatos durante o processo de fosforilação.

Fonte: Adaptado de Lanning e Carter-Su (2007).

Dois subtipos de GHR foram relatados em teleósteos, o GHR1 e GHR2, como resultado da duplicação de genes. O GHR1 é estruturalmente mais parecido com o de tetrápodes e contém entre seis e sete resíduos de cisteínas

extracelulares, enquanto o GHR2 é exclusivo de teleósteos e contém apenas quatro ou cinco cisteínas extracelulares (FUENTES et al., 2013).

Os dois subtipos de receptores de GH podem ter sistemas de transdução de sinais diferentes. Estudos com dourada (*Sparus aurata*) indicaram que o GHR1 desencadeia atividades do promotor c-fos em sistemas de expressão, e isso não foi observado no GHR2. A distribuição de GHR1 e GHR2, assim como a expressão do mRNA nos tecidos também são diferentes (JIAO et al., 2006). Além disso, os esteroides gonadais, os corticosteroides e a mudança na salinidade podem modular a expressão de mRNA de GHR1 e GHR2 (PIERCE et al., 2007). A presença de dois subtipos de GHR pode fazer parte dos mecanismos que modulam os múltiplos efeitos do GH num determinado tecido, assim como seus diferentes sinais de regulação.

Em mamíferos, quando o GH se liga ao receptor desencadeia uma série de eventos de sinalização pós-receptores, que incluem o recrutamento e a ativação via fosforilação da JAK2. Este por sua vez, ativa outras moléculas de sinalização, incluindo os transdutores e ativadores de transcrição da família STAT, fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), proteína quinase B (AKT) e as quinases reguladas pelo sinal extracelular (ERK) (PIWIEN-PILIPUK; HUO; SCHWARTZ, 2002). Estas vias de sinalização modulam a transcrição de vários genes, incluindo IGF1 (DAVEY et al., 2001; PIWIEN-PILIPUK; HUO; SCHWARTZ, 2002). O GH também pode ativar outras moléculas sinalizadoras como JAK1, STAT2 e STAT3, entre outras (PIWIEN-PILIPUK; HUO; SCHWARTZ, 2002), tornando, assim, a rede de sinalização de GH particularmente complexa. Muitos dos componentes do sistema controlados pelo GH e descritos em mamíferos foram isolados, caracterizados e avaliados em peixes. Porém, notou-se um quadro mais complexo, devido ao fato dos peixes teleósteos possuírem duas ou mais cópias de genes que compõem o sistema do GH (CHANG; WONG, 2009).

As funções de cada receptor de GH ainda não estão totalmente definidas. Trabalhos com peixe-zebra transgênico revelaram novas informações sobre as funções do GHR1, que estaria relacionado com o crescimento desses animais, porém, não foi constatado o crescimento somático, mas sim um aumento no número e tamanho das fibras musculares (FIGUEIREDO et al., 2012). As funções biológicas do GHR2 não estão definidas, e em vários trabalhos nota-se uma maior expressão de GHR2, quando comparado com GHR1. Acredita-se que o GHR2 esteja envolvido na modulação de sinal do GH, porém, sua eficácia ainda não foi comprovada (SAERA-VILA; CALDUCH-GINER; PÉREZ-SÁNCHEZ, 2005).

É importante ressaltar que os níveis de GH circulantes não dependem somente do ritmo de secreção pela hipófise, mas também da velocidade e forma de eliminação. Isto está relacionado, em grande parte, com as proteínas de ligação do GH (GHBps), que são capazes de transportar, regular a biodisponibilidade e meia-vida do GH na circulação. Em peixes, os mecanismos de produção das GHBPs ainda são desconhecidos (BJÖRNSSON et al., 2002).

2.5.3 Polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP) e hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH)

O polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária ou hipofisária (PACAP) e o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) são peptídeos da família do glucagon e possuem uma série de semelhanças estruturais e funcionais. O PACAP é uma molécula muito conservada e mostra uma identidade de sequência de aminoácidos que varia de 88 a 97% entre os vertebrados, enquanto o GHRH tem apenas 32 a 45% de identidade entre os humanos e os vertebrados não mamíferos (SHERWOOD; KRUECKL; MCRORY, 2000).

Estudos imuno-histoquímicos sugerem que as fibras do GHRH originárias da área pré-óptica inervam o par distal em peixes. PACAP tem uma distribuição semelhante ao GHRH, sendo encontrado nas regiões pré-óptica e hipotalâmica, e também está presente em alguns neurônios no cérebro posterior (MATSUDA et al., 2005).

O GHRH sintético de carpa comum (*Cyprinus carpio*) estimula a liberação de GH *in vivo* e *in vitro* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), kinguio (*Carassius auratus*) e tilápia (*Oreochromis* sp.) (SCHLUETER et al., 2007). A capacidade do GHRH de estimular a liberação de GH, a partir de fragmentos de hipófise e preparações celulares, indica que este hormônio atua diretamente sobre os somatotropos hipofisários. No entanto, a eficácia do GHRH em estimular a liberação do GH é relativamente baixa e sua capacidade de aumentar a liberação de GH não é consistentemente demonstrada. Assim, acredita-se que, ao contrário do que ocorre em mamíferos, o GHRH não deve ser o principal estimulador neuroendócrino da liberação do GH em peixes (MONTERO et al., 2000).

Em mamíferos, os genes que codificam cada peptídeo são diferentes (HOSOYA et al., 1992). Acreditava-se que em peixes teleósteos, anfíbios e aves, uma parte do gene do PACAP codificava o GHRH (SHERWOOD; KRUECKL; MCRORY, 2000), no entanto, foi comprovada a existência de um conjunto diferente de genes que codificam o GHRH e seus receptores específicos (LEE et al., 2007). Com esta descoberta, os peptídeos anteriormente classificados como de GHRH era na verdade o homólogo do peptídeo relacionado com o PACAP (PRP) de mamíferos, ao invés do GHRH. Isso também explica a baixa potência desses peptídeos na estimulação do GH, quando comparado ao PACAP (CANOSA; CHANG; PETER, 2007).

O PACAP foi isolado e/ou clonado em inúmeros teleósteos. Em alguns peixes, como a carpa capim (*Ctenopharyngodon Idella*), o gene de PACAP

codifica apenas uma cópia e em outros, como peixes-zebra, codificam duas cópias (CHANG; WONG, 2009).

O PACAP estimula a liberação de GH em dourado (*Coryphaena hippurus*), salmão (*Salmo salar*), enguia europeia (*Anguilla anguilla*), carpa comum (*Cyprinus carpio*) e carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). Em kinguio (*Carassius auratus*), a eficácia do PACAP na estimulação da liberação de GH é observada em todas as fases do ciclo reprodutivo, mas existe uma variação na sua eficácia, sendo mais potente quando as gônadas estão completamente desenvolvidas, no período pré-desova. Os resultados das pesquisas sugerem que o PACAP é um regulador fisiológico de liberação do GH em peixes, porém, são necessários maiores estudos sobre sua função, para reforçar esta conclusão (CANOSA; CHANG; PETER, 2007).

2.5.4 Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são os principais mediadores dos efeitos da promoção do crescimento induzida pelo GH em peixes e outros vertebrados, e podem agir de forma autócrina, parácrina ou endócrina (LE ROITH et al., 2001). Os IGFs afetam muitos processos como a estimulação da síntese proteica, a inibição da proteólise e a proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular (DUAN; REN; GAO, 2010; WOOD; DUAN; BERN, 2005). A correlação entre crescimento do organismo e concentração de IGF-1 plasmático é alta. Picha et al. (2008) classificam o IGF-1 plasmático como um biomarcador de crescimento em peixes.

O fígado é o principal local para transcrição de IGF em peixes e outros vertebrados; no entanto, a expressão de IGF foi constatada em quase todos os tecidos extra-hepáticos do feto, juvenis e adultos dos vertebrados (WOOD; DUAN; BERN, 2005). Em peixes juvenis, a expressão de mRNA de IGF-1 tem

sido encontrada em músculo, baço, tecido adiposo, intestino, fígado, coração, testículos, ovários, rins, hipófise e cérebro (BIGA et al., 2004; SHAMBLOTT; CHEN, 1993). Em peixes adultos, uma distribuição ubíqua de mRNA de IGF-1 no tecido é observada (AEGERTER; JALABERT; BOBE, 2004; CAELERS et al., 2004). Porém, acredita-se que o *pool* plasmático de IGF-1 seja derivado, principalmente, do fígado, mas é possível que haja contribuição de locais extra-hepáticos (REINDL et al., 2011). Há evidências de que o IGF-1 é armazenado nas ilhotas pancreáticas, em mamíferos (JEVDJOVIC et al., 2005).

O primeiro gene de IGF-2 caracterizado em peixes foi em salmão (PALAMARCHUK et al., 1997). Desde então, outros IGFs-2 foram caracterizados, incluindo o da truta arco-íris (SHAMBLOTT et al., 1998). O peixe-zebra apresenta duas isoformas de IGF-2, a IGF-2a e a IGF-2b, que exibem diferentes padrões de expressão durante o desenvolvimento dos peixes e sugere que estas isoformas tenham funções distintas (WHITE; KYLE; WOOD, 2009).

Tratamentos com GH *in vivo* e *in vitro* estimulam a síntese de mRNA de IGF-1 e IGF-2, em diversos tecidos. *In vivo*, os estudos mostram que a injeção de GH aumenta a expressão de mRNA de IGF-1 e/ou IGF-2 hepático, em *redbanded seabream* (*Pagrus auriga*) (PONCE et al., 2008), carpa comum (TSE et al., 2002; VONG; CHAN; CHENG, 2003), truta arco-íris (SHAMBLOTT et al., 1995), e bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (PETERSON; SMALL, 2005). A injeção de GH também aumentou os níveis de mRNA de IGF em tecidos extra-hepáticos, tais como brânquias, intestino e rins de várias espécies de peixes (TSE et al., 2002; VONG; CHAN; CHENG, 2003), mas não teve efeito sobre a expressão de IGF no músculo do bagre do canal (PETERSON; SMALL, 2005) e rins de tilápia de Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) (KAJIMURA et al., 2001).

Estudos *in vitro* mostraram que o tratamento com GH em hepatócitos isolados resultou em elevados níveis de IGF para truta arco-íris (REINDL et al., 2011), tilápia e salmão (PIERCE et al., 2005, 2009) e carpa comum (TSE et al., 2002). Estes resultados sugerem que a síntese de IGF ocorre em muitos tecidos e a expressão de mRNA de IGF é regulada parcialmente pelo GH.

O mecanismo pelo qual o GH estimula a expressão de IGF em peixes e em outros vertebrados parece estar relacionado à ativação da via JAK/STATs. O GH se liga ao seu receptor GHR e interage com a JAK2, levando à fosforilação de inúmeros fatores de transcrição (STAs), que alteram a expressão do gene de IGF e induzem o crescimento do tecido (TEGLUND et al., 1998). O STAT-3, STAT-5 e o fator nuclear de hepatócito (HNF) são os fatores envolvidos na expressão do gene de IGF (FROST; NYSTROM; LANG, 2002). Tem-se demonstrado que HNF-3 β , juntamente com os fatores de transcrição Sp1 e C/EBP β , ativam o promotor do gene IGF-2, em hepatócitos de salmão (PALAMARCHUK et al., 1999, 2001). Em outros vertebrados, foi demonstrado que a transcrição de IGF-1 foi mediada pelo GH, por meio da via de ativação da AMPc dependente de proteína quinase A (PKA) (ROTWEIN; BILLIARD; WOELFLE, 2002). A síntese e secreção de IGF-1 pode ser GH-dependente ou GH-independente, em vários estágios da vida e em diferentes tecidos. No início do desenvolvimento, a síntese e secreção de IGF parecem ser, em grande parte, GH-independente (BUTLER; LEROITH, 2001).

Além do GH, vários outros hormônios como a insulina, somatostatina, cortisol e hormônios da tireoide, podem influenciar na expressão de IGF-1 e IGF-2 no fígado e em tecidos extra-hepáticos (REINDL; SHERIDAN, 2012).

Os esteroides também influenciam o sistema GH/IGF, porém, as respostas são muito variáveis e essas variações são atribuídas à diferença entre as espécies ou tecidos e ações do ambiente como fotoperíodo, temperatura, estado nutricional e estresse (REINDL; SHERIDAN, 2012).

Além dos vários hormônios, a disponibilidade de alimento e o estado nutricional do organismo podem influenciar a expressão e atividade do sistema GH/IGF. Os peixes são frequentemente expostos a longos períodos de privação de alimento, e o jejum reduz os níveis de IGF-1, tanto no soro, quanto na expressão do mRNA. O jejum prolongado resulta em redução hepática do mRNA de IGF-1 em várias espécies, tais como bagre do canal (PETERSON; WALDBIESER, 2009), salmão real (*Oncorhynchus tshawytscha*) (PIERCE et al., 2005), garoupa (*Epinephelus* sp.) (PEDROSO et al., 2006), rabbitfish (*Siganus* sp.) (AYSON; JESUS-AYSON; TAKEMURA, 2007), truta arco-íris (NORBECK; KITTLSON; SHERIDAN, 2007) e tilápia (FOX et al., 2006; UCHIDA et al., 2003). O jejum provocou uma redução nos níveis de IGF-1 no músculo e fígado de bagres do canal, mas nenhuma alteração foi observada nos níveis de expressão de IGF-2, sugerindo que o IGF-1 e o IGF-2 são regulados de formas diferentes pelo estado nutricional dos animais (CHAUVIGNÉ et al., 2003; PETERSON; WALDBIESER, 2009). Estudos com animais em jejum fornecem evidências adicionais de que o GH apresenta outras funções além da indução do crescimento e sugerem que o estado nutricional desempenha um papel fundamental na regulação da função e expressão dos componentes GH/IGF. Fatores ambientais como temperatura e fotoperíodo podem influenciar a expressão e a atividade do sistema GH/IGF. Temperaturas mais altas podem aumentar o crescimento dos peixes e o fotoperíodo pode modular a produção e secreção dos componentes do sistema GH/IGF (GABILLARD et al., 2003).

2.5.5 Receptores do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFRs)

Os efeitos do IGF na célula são mediados por seus vários receptores. Os IGFs podem se ligar ao seu receptor (receptores do fator de crescimento semelhante à insulina – IGFRs) ou nos receptores de insulina. Quando o IGF-1

se liga ao receptor de insulina, ele media efeitos metabólicos, tais como a captura de glicose e aminoácidos e a síntese de glicogênio e lipídios (BINOUX, 1995). Quando se liga ao IGFR-1 induz os efeitos anabólicos, como proliferação celular, síntese de proteína e ácido nucleico e diminuição da proteólise (BOULWARE et al., 1992). A influência do IGF nos processos celulares se baseia na expressão dos receptores da superfície celular. Existem dois tipos de receptores de IGFRs em vertebrados, o tipo 1 (IGFR-1) e o tipo 2 (IGFR-2), que fazem parte de uma família bastante heterogênea, que inclui o receptor de insulina (IR), receptor de relaxina, bem como os IGFRs. Embora os dois tipos de IGFRs pareçam ter surgido a partir de um mesmo ancestral comum, eles são estruturalmente diferentes. O IGFR-1, assim como o IR, pertence à subfamília de receptores tirosina quinase, já os receptores IGFR-2 não possuem atividade de tirosina quinase e pertencem à família dos receptores de manose-6-fosfato (CARUSO; SHERIDAN, 2011). Os IGFR-1s têm sido caracterizados em várias espécies de peixes, sendo que duas isoformas (IGFR-1a e IGFR-1b) já foram descritas em salmonídeos (CHAN et al., 1997) e solha japonesa (*Paralichthys olivaceus*) (NAKAO et al., 2002). O IGFR-2 é bifuncional em mamíferos e tem função no tráfego da enzima lisossomal, controlando o nível de IGF-2 extracelular (WOOD; DUAN; BERN, 2005). O IGFR-2 está presente em várias espécies de peixes, sendo que em peixe-zebra foram encontrados dois subtipos diferentes de IGFR-2 (TSALAVOUTA et al., 2009).

Os IGFRs se ligam a vários tipos de moléculas como IGF-1, IGF-2 e insulina; no entanto, a afinidade para os IGFs é maior do que para a insulina, em todas as espécies animais (WOOD; DUAN; BERN, 2005). A afinidade do IGFR-1 é maior para a molécula do IGF-1, quando comparada ao IGF-2, e a afinidade do IGFR-2 é maior para IGF-2, do que para IGF-1 (HAWKES; KAR, 2004). No entanto, experimentos com peixe-zebra mostraram que IGF-1 e IGF-2 se ligam ao IGFR-1 com afinidade semelhante (POZIOS et al., 2001).

A ligação do IGF-1 ao IGFR-1 ativa uma série de eventos de fosforilação, que conduzem a diversos efeitos anabólicos, tais como aumento da síntese de proteínas e de ácidos nucleicos, diminuição da proteólise, aumento da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (WOOD; DUAN; BERN, 2005). A dependência da expressão de IGFR-1 para crescimento e sobrevivência do organismo foi evidenciada em estudos utilizando a subexpressão do IGFR-1 em camundongos, mostrando que estes animais apresentam crescimento reduzido (45% do tamanho normal) e não sobrevivem após o nascimento (LIU et al., 1993).

Em mamíferos, a ligação do IGF-2 ao IGFR-2 resulta em uma internalização e degradação do IGF-2, em vez de uma transdução de sinal. A função do IGFR-2 em peixes ainda não foi determinada (REINDL; SHERIDAN, 2012).

Os IGFRs são amplamente expressos nos tecidos dos vertebrados. A expressão de IGFR-1 tem sido demonstrada no músculo, baço, tecido adiposo, intestino, fígado, coração, testículos, ovários, rins, hipófise e cérebro de juvenis de salmão (BIGA et al., 2004; SHAMBLOTT; CHEN, 1993). O IGFR-1 foi encontrado nas brânquias, coração, pele e músculo lateral de shi drum (*Umbrina cirrosa*) (RADAELLI et al., 2003). O IGF-1 também está presente nestes mesmos tecidos e pode ter um efeito autócrino ou parácrino sobre o crescimento, não dependendo somente do IGF produzido no fígado. A expressão do IGFR-2 foi detectada em vários tecidos, como coração, timo e rins, durante o desenvolvimento embrionário dos mamíferos (FUNK et al., 1992; SENIOR et al., 1990), em oócitos, embrião e juvenis de truta marrom (*Salmo trutta*) (MÉNDEZ et al., 2001) e em embriões na fase inicial e na região cerebral de embriões na fase final de desenvolvimento de peixe-zebra.

Vários fatores internos e externos influenciam a expressão dos IGFRs. O GH, IGF, insulina, hormônios da tireoide e os esteroides afetam a expressão de

IGFR-1 em diferentes tecidos nos vertebrados. Tratamentos com insulina e IGF-1 diminuem a expressão de IGFR-1 em cardiomiócitos de trutas (MOON et al., 1996). A insulina aumentou o mRNA do IGFR-1a e IGFR-1b nas brânquias de truta arco-íris. Tratamentos com testosterona aumentaram a expressão de IGFR-1a e IGFR-1b nas brânquias de truta arco-íris, mas tratamentos com estradiol não produziram tal efeito (NORBECK; SHERIDAN, 2011). A somastostatina inibiu a expressão de IGFR-1a e IGFR-1b nos filamentos branquiais de truta arco-íris (HANSON et al., 2010).

Fatores como o estado nutricional e temperatura da água têm influência na expressão de IGFR em peixes. Trutas arco-íris em jejum de duas e seis semanas mostraram uma resposta específica dos tecidos na expressão de IGFR-1a e IGFR-1b. No músculo cardíaco, a expressão do mRNA do IGFR-1a foi elevada nos dois períodos de jejum, porém, o aumento do mRNA de IGFR-1b somente foi observado com seis semanas de jejum. Nenhuma alteração foi observada no músculo esquelético, sendo que os níveis de IGFR-1 diminuíram nas brânquias, nos dois períodos de jejum. Após a realimentação, os níveis de mRNA de IGFR dos peixes mantidos em jejum apresentaram os mesmos níveis dos animais que foram alimentados regularmente. Estes resultados demonstram que o estado nutricional de um organismo afeta a expressão de IGFRs de modo específico para cada tecido. Além disso, o jejum promove ações metabólicas do GH, ao invés das ações de crescimento (NORBECK; KITTELSON; SHERIDAN, 2007). A temperatura não afetou a expressão do mRNA de IGFR-1a e IGFR-1b; no entanto, a ligação com IGF-1 foi reduzida no músculo, sugerindo que a rotação, mas não a síntese do receptor, é influenciada pela temperatura (GABILLARD et al., 2003). Os mecanismos pelos quais os hormônios induzem e expressam de IGFR ainda não foram elucidados, porém, sabe-se que a cascata de sinalização parece estar relacionada à expressão destes genes. A abundância do mRNA do IGFR e a presença do receptor na superfície

da célula desempenham um papel importante na regulação da função do IGF (SCHAYEK et al., 2010).

A capacidade do IGF de se ligar aos seus receptores é regulada pelas suas proteínas de ligação. As proteínas de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP) são as principais intervenientes no sistema GH/IGF, em que modulam a distribuição e a biodisponibilidade do IGF (RODGERS; ROALSON; THOMPSON, 2008). Seis proteínas de ligação do IGF (IGFBP-1-6) foram identificadas em vertebrados, desde mamíferos a peixes, e sua origem e evolução foram recentemente revistas (DAZA et al., 2011). A maior porção de IGF circulante está ligada ao IGFBP, sendo que em mamíferos 75% do IGF-1 circulante está ligado ao IGFBP-3 e à unidade do ácido-lábil, uma glicoproteína conectada à proteína de ligação (JONES; CLEMMONS, 1995). Em peixes, existem normalmente três IGFBPs circulantes no plasma, porém, a identidade dessas proteínas não é clara. Em salmão, foram caracterizados três IGFBPs (IGFBP1a, IGFBP1b e IGFBP2b) (SHIMIZU et al., 2011). A produção local de IGFBPs pode servir como meio de regulação específica da ação do IGF em cada tecido. As IGFBPs, tais como IGFBP-5 e IGFBP-3, também têm funções biológicas independentes do IGF, que incluem mitogênese, regulação do gene e migração de células (RODGERS; ROALSON; THOMPSON, 2008). Os efeitos do IGF-independente de IGFBP aumentam a complexidade do sistema GH/IGF, proporcionando muitas funções em diferentes tecidos (REINDL; SHERIDAN, 2012).

2.6 Tilápia

A tilápia, segunda espécie de peixe de água doce mais cultivada no mundo, é um ciclídeo teleósteo africano, cuja capacidade de adaptação, potencial de crescimento em ambiente de criação, tanto em regimes intensivos

quanto extensivos, e a qualidade e aceitação da carne pelo mercado consumidor, são fatores determinantes para que se difunda por mais de 135 países e está presente em todos os continentes do mundo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2012). Por sua grande importância mundial, a tilápia é um peixe bastante pesquisado e tem seu genoma completamente descrito na base de dados do Ensembl (2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram executados de acordo com as orientações da União Europeia (2010/63 /UE) e da legislação espanhola (RD 1201/2005, da lei 32/2007) para uso de animais em laboratório (PORTALUPPI; SMOLENSKY; TOUITOU, 2010).

3.1 Animais e instalações

Foram executados dois experimentos, utilizando-se 48 tilápias em cada, sendo que o peso médio foi de $85,55 \pm 36,80$ g e $96,59 \pm 50,38$ g (média \pm S.D.) respectivamente, oriundos da Universidade de Madrid, Espanha e mantidos no laboratório de Cronobiologia da Universidade de Murcia, Espanha. Os peixes foram divididos em oito tanques, de forma que cada tanque fornecesse o número de peixes necessários para cada ponto de amostragem, evitando, assim, uma situação de estresse induzida por várias amostragens num mesmo tanque. Os tanques utilizados, com capacidade de 200 L cada, foram mantidos em sistema de recirculação de água, composto por filtro biológico e mecânico, com temperatura controlada em 28 °C. Os demais parâmetros de qualidade de água, como pH, oxigênio dissolvido, amônia, nitrato e nitrito foram monitorados diariamente.

O período experimental foi de 40 dias, para cada experimento, sendo este o tempo necessário para a sincronização dos animais ao período de alimentação. Ao longo de todo o período experimental a atividade alimentar foi registrada por meio de fotocélula infravermelha (Omron, modelo E3S-AD62, Kyoto, Japão), submersa em água e fixada na lateral do tanque. Os tanques experimentais apresentavam 75 cm de profundidade e a célula fotoelétrica foi colocada a 15 cm da superfície da água, ou seja, a 60 cm do fundo do tanque. A

célula fotoelétrica foi orientada numa posição horizontal, para que emitisse um feixe de luz infravermelha em direção oposta ao tanque. As células fotoelétricas foram conectadas a um computador e, a cada vez que um peixe atravessava o feixe de luz infravermelha, era provocada uma interrupção. O número total de interrupções, num intervalo de 10 minutos, foi contabilizado e armazenado no computador.

O fotoperíodo foi fixado em 12:12 horas, ciclo LD (light:dark), com início às 08h (*Zeitgeber* Time 0, ZT 0). Os peixes foram divididos em dois grupos, um grupo alimentado às ZT6 (meio do dia - ML) e outro às ZT 18 (meio da noite - MD), por meio de alimentadores automáticos (Eheim, Alemanha). Foi fornecida uma ração comercial com 36% de proteína bruta (Skretting AS, Spain) numa taxa de 1% do peso corporal.

3.2 Experimento 1: Ritmos diários de genes do eixo somatotrópico

Após o período experimental, os peixes foram amostrados a cada seis horas, durante um ciclo de 24 horas, com o primeiro ponto em ZT 9, e em seguida em ZT 15, ZT 21 e ZT 3. Os animais foram anestesiados com eugenol (Guinama, Valência, Espanha), numa concentração de 50 µL/L. O sangue foi coletado por punção da nadadeira caudal, utilizando-se seringas heparinizadas (Sigma, H6278, 25.000 unidades/3 mL, 0,6% de solução de NaCl) e armazenado em tubos tipo eppendorf, de 1,5 mL, contendo heparina. O material foi centrifugado a 3000 rpm, durante 15 minutos, a 4 °C, para separação do plasma, posteriormente armazenado a -80 °C, até a análise. Os peixes foram sacrificados por decapitação e os tecidos do hipotálamo, hipófise, fígado e músculo foram coletados e acondicionados em tubos tipo eppendorf, mantidos em gelo seco e armazenados em freezer a -80 °C, até a análise.

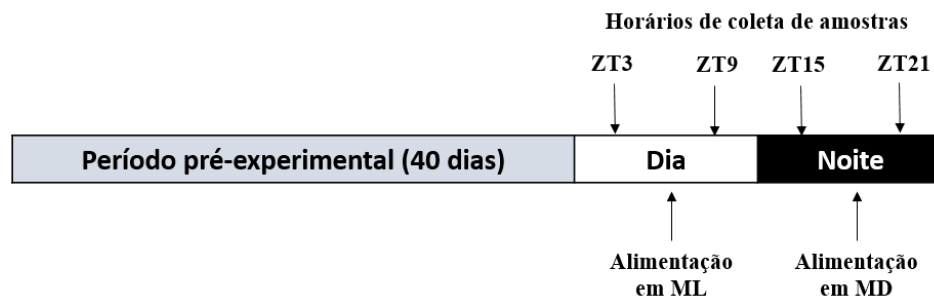


Figura 3 Fluxograma representativo do experimento 1, mostrando os 40 dias do período pré-experimental, necessário para a sincronização dos animais ao horário de fornecimento do alimento, o dia da execução do experimento com os horários de coleta de amostras e o horário de fornecimento do alimento dos dois tratamentos avaliados (ML ou MD) de tilápias

3.3 Experimento 2: Resposta gênica de aplicação do hormônio do crescimento (GH)

Após análise dos resultados do experimento 1, foi observado que a maior média de expressão do gene de GH ocorreu nas primeiras horas do dia. Por esse motivo, para este experimento, administrou-se o GH (Genotonorm Miniquick, 1 mg/0,5 mL, Pfizer, Madrid - Espanha) às ZT 3 e ZT 15, ou seja, no princípio do dia e no princípio da noite. Os 48 peixes utilizados no experimento 2, foram distribuídos e alimentados conforme descrito anteriormente. A primeira administração de GH ocorreu às ZT 3, e foram utilizados dois tanques, cada um com seis peixes de cada grupo de alimentação (ML e MD), sendo que em um tanque o GH foi administrado por via intramuscular, na concentração de 2 mg/Kg de peso vivo, e no outro tanque foi feito um controle, com peixes injetados com solução salina (0,1% de NaCl). O mesmo procedimento foi feito para os dois grupos de alimentação (ML e MD) e nos dois horários de administração (ZT 3 e ZT 15). A coleta de sangue e dos tecidos foi feita 10

horas após a administração e o procedimento foi o mesmo descrito no experimento 1.

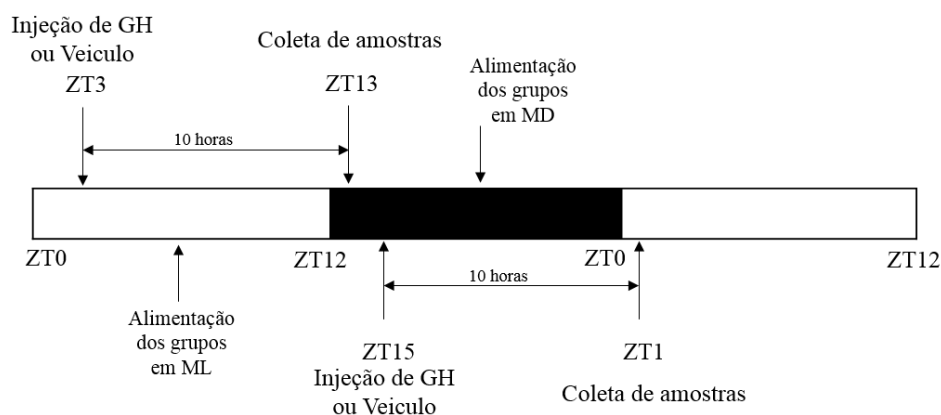


Figura 4 Fluxograma representativo do experimento 2

Legenda: A barra central de cor branca representa o período de luz e a negra o período noturno. Na parte superior à barra central, representa a metodologia usada nos animais injetados com GH ou veiculo no período diurno ou às ZT3 e a coleta de amostra sendo realizada às ZT13, 10 horas após a injeção. Na parte de inferior a barra central representa a metodologia aplicada aos animais injetados no período noturno ou às ZT15, e a coleta de amostra realizada as ZT1, 10 horas após a injeção.

3.4 Concentração de GH plasmático

A concentração de GH plasmático foi mensurada com auxílio do kit comercial Salmon Somatotropin ELISA kit (Catálogo n° E0044s, EIAab WUHAM EIAAB SCIENCE CO., LTD., Wuhan, China).

3.5 Transcrição reversa e análise de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR)

As amostras de tecidos do hipotálamo, hipófise, fígado e músculo foram transferidas para tubos estéreis, contendo 0,5 mL de Trizol (Invitrogen, CA, EUA), homogeneizadas utilizando-se Polytron PT1200 E (CINEMATICA AG, EUA) e centrifugadas a 12.000 rpm, por 5 minutos, a 4 °C. Ao final desse processo, notou-se um pequeno pellet no fundo do tubo, correspondente às membranas celulares e DNA de alto peso molecular. O sobrenadante contendo o RNA foi coletado utilizando-se pipeta de 500 µL e transferido para um novo eppendorf estéril, onde foi adicionado 0,1 mL de clorofórmio (RNase). A mistura foi agitada por 30 segundos, incubada durante 15 minutos (temperatura ambiente) e centrifugada a 12.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. Ao término da centrifugação, notou-se um líquido dividido em duas fases, sendo que a que continha o RNA se encontrava na parte superior, sendo cuidadosamente coletada com auxílio de pipeta de 100 µL e transferida para um novo eppendorf estéril. A este material foi adicionado 0,250 mL de isopropanol (livre de RNase), homogeneizado durante 15 segundos, incubados por 10 minutos (temperatura ambiente) e centrifugado por 12.000 rpm, por 10 minutos. Ao final da centrifugação, um pequeno pellet contendo o RNA se formou no fundo do eppendorf. O líquido foi retirado cuidadosamente, para evitar o desprendimento do pellet, e descartado. Para lavagem do RNA, foi adicionado 0,5 mL de etanol 75% (RNase free), centrifugado a 12.000 rpm, por 5 minutos, a 4 °C, com posterior retirada do álcool. Este procedimento foi repetido. Após a retirada do álcool da segunda lavagem, o tubo foi mantido aberto por aproximadamente 10 minutos, à temperatura ambiente, para evaporação do líquido residual. Ao pellet de RNA já seco foi adicionado 50 µL de água DEPC (dietilpirocarbonato,

inibidor de RNase). O material foi agitado até a completa homogeneização e mantido a -80 °C, para posterior análise.

A concentração da solução de RNA foi medida com auxílio do NanoDrop 1.000 (Thermo Scientific). A retro-transcrição foi feita utilizando-se 1 µg de RNA e kit comercial de transcrição reversa (kit QuantiTect, Qiagen, Alemanha), que incluía a eliminação do DNA genômico. O cDNA foi submetido a análises de PCR quantitativo, utilizando um termociclador de luz (7500 Real-Time PCR sistema, Applied Biosystems, CA, EUA), seguindo o protocolo: incubação inicial a 95 °C, durante 15 minutos, seguida por 40 ciclos que alternavam a temperatura de 95 °C, durante 15 segundos e 60 °C, durante 1 minuto. As reações foram realizadas utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Todas as amostras foram feitas em triplicata. As sequências dos “primers” estão apresentadas na Tabela 1 e foram desenhadas com auxílio do *software* Primer 3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000).

Os genes do *gh*, *ghr-1*, *ghr-2*, *pacap-1a*, *pacap-1b*, *igf-1*, *igf-2a*, *igf-1ra* e *igf-2r* (Tabela 1), foram amplificados por PCR, utilizando Taq DNA polimerase de alta afinidade (Invitrogen). A expressão de GH foi analisada na hipófise, a *pacap-1a* e *pacap-1b* no hipotálamo, o *ghr-1*, *ghr-2*, *igf-1*, *igf-2a* e *igf-2r* no fígado e *ghr-1*, *ghr-2*, *igf-1ra* e *igf-2r* no músculo. A eficiência relativa de amplificação de todos os genes foi analisada por meio das curvas de diluição do cDNA, sendo semelhante para todos os genes. O valor da expressão relativa de cada gene foi calculado pelo método do Delta-Delta-CT, utilizando-se como referência endógena o fator de alongação 1α (YANG et al., 2013). A reação de PCR foi realizada num volume final de 20 µL. Os primers de *ghr-2*, *igf-1*, *igf-2a* e *igf-2r* foram utilizados na concentração final de 200 nM, e os primers de *gh*, *ghr-1*, *pacap-1a*, *pacap-1b* e *igf-1ra* em uma concentração de 400 nM. Estas concentrações foram determinadas por meio de uma curva de diluição dos primers.

Tabela 1 Sequência dos primers de tilápia utilizados na qPCR em tempo real

Gene	Número no Ensembl	F/R	Sequência do primer (5' - 3')
<i>gh</i>	ENSONIG00000009191	F	GCAACGTCAGCTCAACAAAA
		R	ACAGCCTTGGTGAAATCTGG
<i>pacap1a</i>	ENSONIG00000006092	F	TACAGCCGCTACAGAAAGCA
		R	GTTTCAGCCATTCTCCCAA
<i>pacap1b</i>	ENSONIG00000009205	F	TAAACGACGACGCATACACC
		R	GTATTTCTGCACGGCCATCT
<i>igf-1</i>	ENSONIG00000017800	F	TCCTGTAGCCACACCCTCTC
		R	ACAGCTTTGGAAGCAGCACT
<i>igf-2^a</i>	ENSONIG00000014499	F	AGTGATGCCCCGACTAAAAC
		R	TCCGCGTGCCTCTTATACTT
<i>igf1ra</i>	ENSONIG00000015115	F	TTTTGCCCAACGGTAATCTC
		R	CTTGGTGGGCTTTGTGTTTT
<i>igf2r</i>	ENSONIG00000015757	F	CGGCATCCTCCAATAACAT
		R	AGCGGTGGAGAACTCAAAGA
<i>ghr1</i>	ENSONIG00000015182	F	TATCAAGGGACCAGGAGACG
		R	TTGTTTTGAGTGCGAAGCTG
<i>ghr2</i>	ENSONIG00000012787	F	CTAGCTGTGCTTCCCCAGAC
		R	GTCCAGATCGAGGTGTGGTT
<i>ef1-α</i>	ENSONIG00000017760	F	GCACGCTCTGCTGGCCTTT
		R	GCGCTCAATCTTCCATCCC

3.6 Análises estatísticas

Os dados de atividade foram analisados e representados na forma de actogramas e ondas médias, com auxílio do *software* de cronobiologia El Temps (versão 1.228, Prof. Díez-Noguera, Universidade de Barcelona).

Para o experimento 1, os dados de cada variável foram submetidos à análise de Cosinor, realizada no *software* El Temps. O Cosinor é baseado na aproximação por quadrado mínimo dos dados das séries temporais, com uma função de cosseno de período conhecida, do tipo:

$$Y = \text{mesor} + \text{Amplitude} * \cos(2\pi(t - \text{acrofase})/\text{período})$$

O Cosinor também apresenta a significância estatística para o ritmo por meio de teste F, em que a curva apresentada é contrastada contra uma linha reta de amplitude zero (hipótese nula). Os dados de cada variável também foram submetidos à ANOVA *one-way*, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey, com significância de 5%, para verificar se houve diferenças significativas entre os momentos do dia, utilizando-se o *software* Statistical Package for Social Sciences (SPSS).

No experimento 2, o teste F foi aplicado para detectar possíveis diferenças entre os grupos injetados com GH e seu controle. Para avaliar a influência da hora do dia e da alimentação, sobre o efeito do GH, os dados expressos por cada animal, com subtração da média de seu grupo controle, foram submetidos à ANAVA, com posterior teste de Tukey (5%), utilizando-se o *software* estatístico SPSS.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Ritmos diários de genes do eixo somatotrópico

Os parâmetros de qualidade de água mantiveram-se dentro dos níveis ideais para a espécie, com valores médios de oxigênio dissolvido de $3,75 \pm 1,34$ mg/L, amônia $0,03 \pm 0,02$ ppm/L, temperatura $27,1 \pm 0,8$ °C e pH $6,6 \pm 0,2$.

A atividade locomotora média dos grupos de animais alimentados em ML está apresentada na Figura 5.

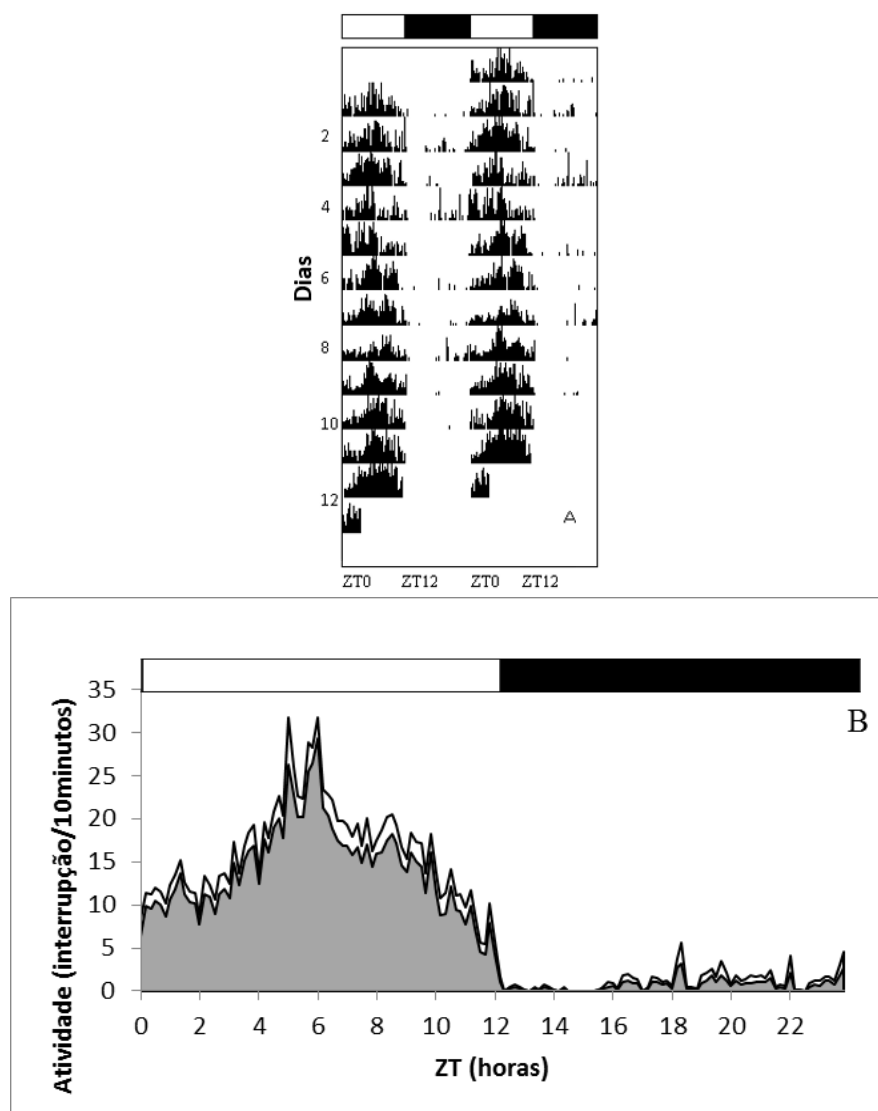


Figura 5 Actograma (A) e onda média (B) da atividade locomotora de tilápias alimentadas em ML, durante o período pré-experimental

Legenda: Os dados do actograma foram traçados duas vezes (48 h), com registro de atividades a cada 10 minutos; a altura de cada ponto representa o número de interrupções do feixe de luz infravermelha. Cada ponto na onda média foi calculado como média \pm desvio (S.E.M) dos dados acumulados a cada 10 minutos, em todos os dias do período pré-experimental (n=40) e em todos os tanques experimentais (n=4). A área cinza representa os valores médios da atividade e a linha contínua o S.E.M.

A atividade locomotora média dos grupos de animais alimentados em MD está apresentada na Figura 6.

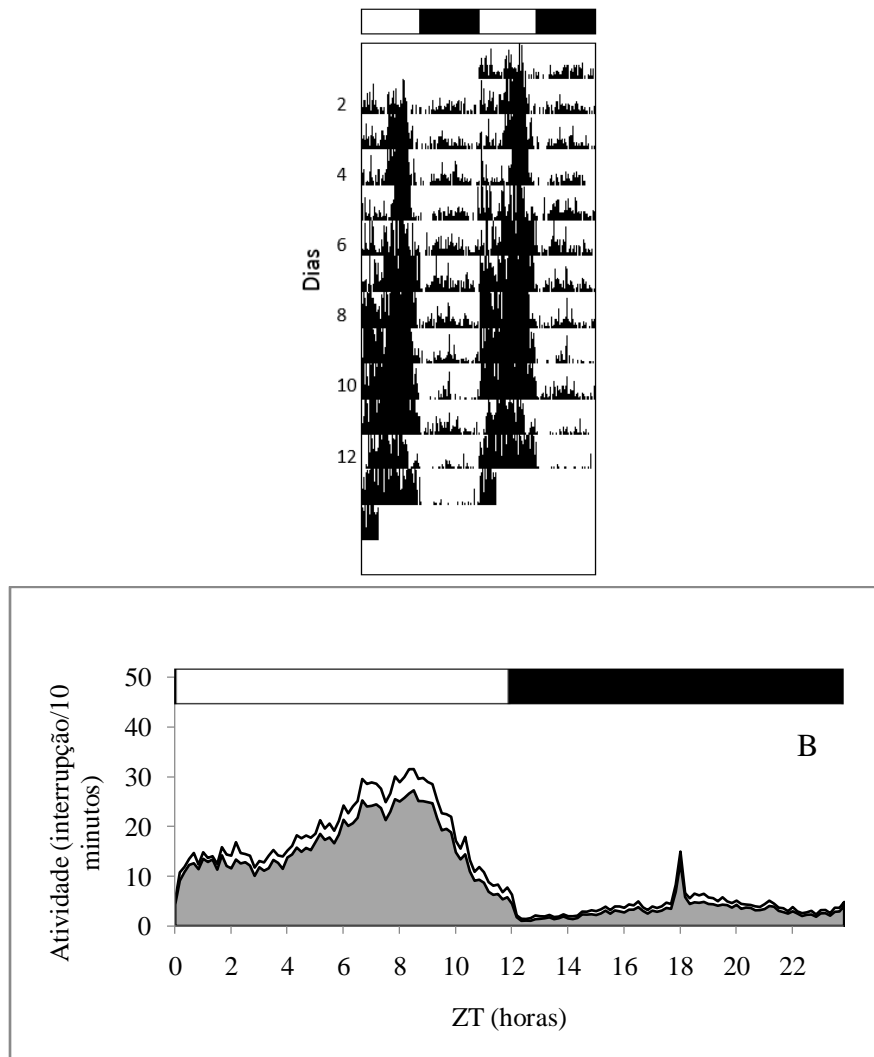


Figura 6 Actograma (A) e onda média (B) da atividade locomotora de tilápias alimentadas em MD, durante o período pré-experimental

Fonte: Os dados do actograma foram traçados duas vezes (48 h), com registro de atividades a cada 10 minutos; a altura de cada ponto representa o número de interrupções do feixe de luz infravermelha. Cada ponto na onda média foi calculado como média \pm desvio (S.E.M) dos dados acumulados a cada 10 minutos, em todos os dias do período pré-experimental (n=40) e em todos os tanques experimentais (n=4). A área cinza representa os valores médios da atividade e a linha contínua o S.E.M.

Ao analisar as Figuras 5 e 6, nota-se que a tilápia é um animal de comportamento diurno, independente do horário de alimentação. Os animais que foram alimentados em ML apresentaram 95% de sua atividade durante o período de luz e apenas 5% no período noturno. Já para os que receberam alimento durante a noite, a atividade diurna foi de 84% e a noturna de 16% (FORTES-SILVA et al., 2010) também avaliaram a atividade locomotora de tilápias, observando, também, comportamento diurno dos animais.

Na avaliação de GH plasmático, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos, pela análise de COSINOR e ANAVA ($p < 0,05$) e apresentou média geral de 38,45 ng/mL.

Na Tabela 2, encontram-se apresentados os dados obtidos pela análise de COSINOR ($p < 0,05$) para a expressão relativa de GH na hipófise, *pacap-1a* e *pacap-1b* no hipotálamo, *ghr-1*, *ghr-2*, *igf-1*, *igf-2a* e *igf-2r* no fígado e *ghr-1*, *ghr-2*, *igf-1ra* e *igf-2r* no músculo de peixes alimentados em ML ou MD.

A análise do COSINOR foi efetuada para observar uma possível presença de ritmos biológicos na expressão relativa dos genes. O gene de *igf-1ra* não foi expresso no fígado.

Tabela 2 Ritmo diário calculado pela análise de cosinor ($p < 0,05$.) para os genes de *gh*, *pacap1a*, *pacap1b*, *igf-1*, *igf-2a*, *igf-1ra*, *igf-2r*, *ghr1*, *ghr2* na hipófise, hipotálamo, fígado e músculo de tilápias alimentadas em ML ou MD

Tecido	Gene	Hora de alimentação	Signif.	Acrofase	Amplitude	Mesor
Hipófise	<i>gh</i>	ML	NS	-	-	-
		MD	NS	-	-	-
Hipotálamo	<i>pacap1a</i>	ML	NS	-	-	-
		MD	NS	-	-	-
	<i>pacap1b</i>	ML	NS	-	-	-
		MD	NS	-	-	-
Fígado	<i>igf-2r</i>	ML	NS	-	-	-
		MD	NS	-	-	-
	<i>igf-1</i>	ML	NS	-	-	-
		MD	NS	-	-	-
	<i>igf-2a</i>	ML	NS	-	-	-
		MD	NS	-	-	-
	<i>ghr1-201</i>	ML	*	2:59±3:38	2,40±1,96	2,7±1,09
		MD	NS	-	-	-
	<i>ghr2</i>	ML	**	2:59±2:58	1,3±0,91	2,15±0,51
		MD	NS	-	-	-
Músculo	<i>igf-1ra</i>	ML	NS	-	-	-
		MD	NS	-	-	-
	<i>igf-2r</i>	ML	NS	-	-	-
		MD	NS	-	-	-
	<i>ghr1</i>	ML	**	4:10±2:30	1,99±1,21	3,15±0,68
		MD	**	9:01±2,06	1,92±0,9	3,14±0,98
	<i>ghr2</i>	ML	NS	-	-	-
		MD	NS	-	-	-

Dados apresentados como média ± desvio padrão; análise não significativa (NS).

A análise dos dados da Tabela 2 mostra que os genes de *gh*, *pacap1a*, *pacap1b*, *igf-1*, *igf-2a*, *igf-1ra* e *igf-2ra* não apresentaram diferenças significativas na análise de COSINOR, a $p < 0,05$, nos tecidos avaliados. Os genes de *ghr1* e *ghr2*, ambos no fígado e para animais alimentados em ML, apresentaram diferenças significativas, com acrofase no mesmo momento, ZT 2:59 h. O *ghr1* também apresentou diferença significativa no músculo, para os dois períodos de alimentação, com acrofase às ZT 4:10 h e ZT 9:01 h, para animais alimentados em ML e MD, respectivamente. O *ghr1* não apresentou diferença significativa no tecido muscular.

As expressões dos genes apresentadas acima também foram avaliadas por ANAVA, seguidas pelo teste *post-Hoc* de Tukey ($p < 0,05$), para detectar possíveis diferenças entre as horas do dia, em animais alimentados em ML e MD. A expressão relativa dos genes de *gh* (hipófise), *pacap1a* e *pacap1b* (hipotálamo), *igf-2a*, *igf-2r*, *ghr1*, *ghr2* (fígado) e *igf-2r* (músculo) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. A Figura 7 representa a expressão relativa de *ghr1* e *ghr2* no tecido hepático e *ghr1* no tecido muscular dos animais que apresentaram ritmos biológicos pelo teste do cosinor, juntamente com a curva calculada que foi gerada pela equação do teste.

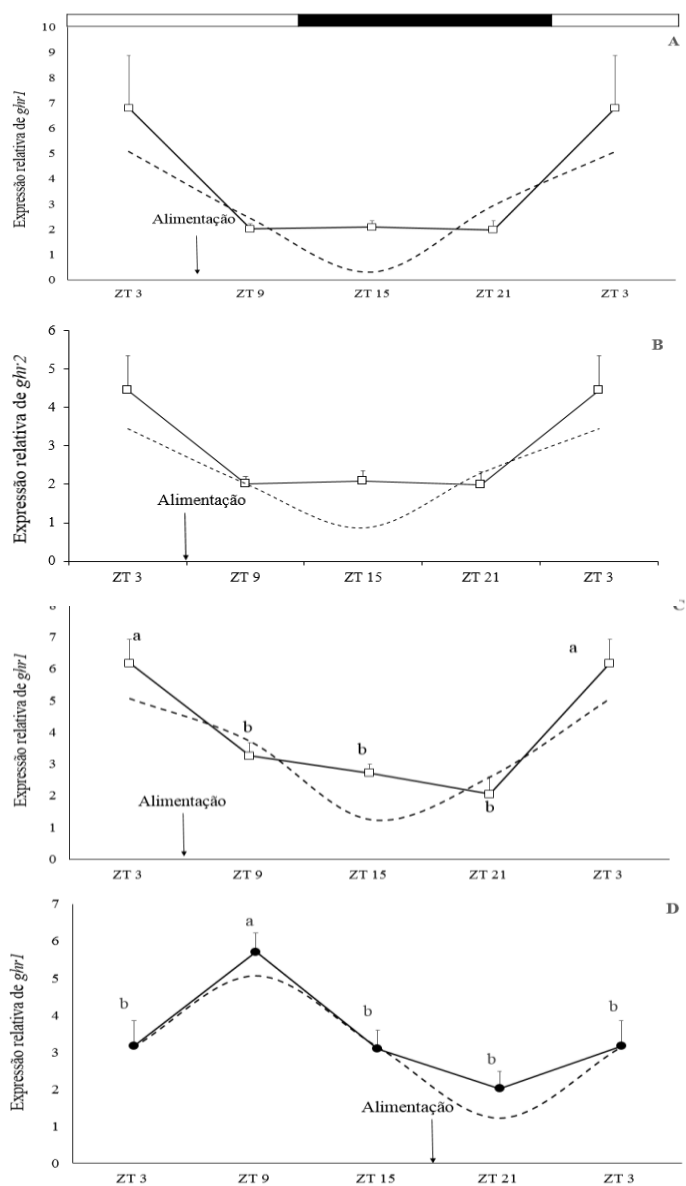


Figura 7 Expressão relativa dos genes de *ghr1* (A) e *ghr2* (B) no tecido hepático, *ghr1* (C e D) no tecido muscular

Legenda: A linha pontilhada refere-se a curva calculada pela equação do cosinor. Os marcadores em quadrado representam os grupos de animais alimentados em ML e os marcadores em círculos aos animais com alimentação em MD. As letras minúsculas apontam diferenças significativas entre os pontos pelo teste de tukey ($p < 0.05$).

A Figura 7A e B apresentam as curvas de expressão relativas e calculadas pela equação do cosinor nos receptores de *gh* no fígado e apesar de apresentarem ritmos biológicos, não foi observado diferenças significativas entre os pontos pelo teste de tukey ($p > 0,05$)

A expressão relativa de *ghr1*, juntamente com a curva calculada pela equação do teste do cosinor estão representadas na Figura 7C para animais alimentados em ML e 7D para os alimentados em MD. Os dados de expressão relativa encontrados nos diferentes pontos foram submetidos ao teste de Tukey, em que ambos os grupos apresentaram diferenças significativas sendo que para os animais alimentados em ML a máxima expressão ocorreu no início do dia, ou seja, às ZT 3, já para os animais que se alimentaram em MD, o pico de expressão ocorreu seis horas mais tarde, às ZT 9. Estes pontos estão próximos das acrofases apresentadas na análise do COSINOR, em que animais que receberam alimento em ML ou MD exibiram picos de expressão ajustados, às 4:10 e 9:01 horas, respectivamente.

Na Figura 8, estão representadas as expressões relativas de *igf1* no fígado, *igf-1ra* e *ghr2*, no músculo de tilápias.

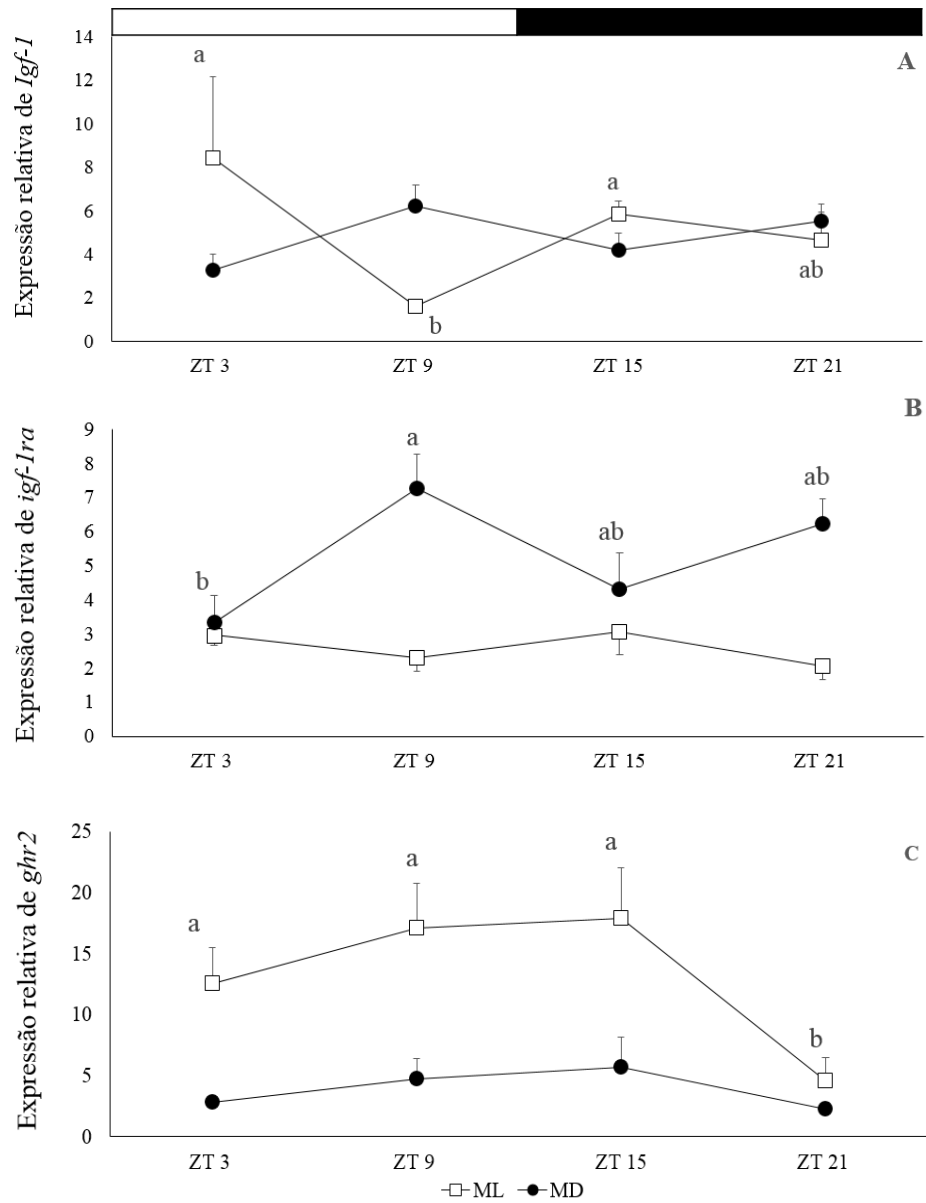


Figura 8 Expressão relativa dos genes de *igf-1*(A) no fígado e *igf-1ra* (B) e *ghr2* (C), no músculo de tilápias

Legenda: Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A expressão do mRNA de *igf-1* (Figura 8A) no fígado não apresentou ritmo biológico, porém, mostrou diferença nos seus níveis diários, em animais alimentados em ML, sendo a maior às ZT 3 e ZT 15, e menor às ZT 9.

Na Figura 8B, observa-se a expressão gênica do *igf-1ra* no músculo. Os animais alimentados em ML não apresentaram diferenças significativas, já animais comendo em MD mostraram um ponto de máxima e mínima às ZT 9 e ZT 3, respectivamente.

A Figura 8C mostra a expressão do gene de *ghr2* no músculo. Os animais que receberam alimento no período noturno (MD) não mostraram diferenças significativas nos pontos avaliados; já para animais alimentados em ML, a expressão desse gene foi significativamente menor às ZT 21.

O controle rítmico exercido pela hipófise e hipotálamo no metabolismo corporal é relatado em muitos trabalhos, sobretudo envolvendo a reprodução (ANDO et al., 2014; OKUZAWA; GEN, 2013; ZUCCHI; CASTIGLIONI; FENT, 2013) e o estresse (LÓPEZ-OLMEDA et al., 2013). Entretanto, são poucos os estudos de ritmos em peixes envolvendo os genes do eixo somatotrópico.

Os ritmos de liberação de GH vêm sendo estudados ultimamente. Um padrão circadiano da liberação de GH tem sido demonstrado em salmonídeos e em várias espécies de peixes ciprinídea (BJORNSSON et al., 2002; MARCHANT; PETER, 1986; ZHANG; LIN; PETER, 1994). Em geral, o padrão é caracterizado pela presença de um ou mais picos irregulares de GH sanguíneo durante o dia e com uma maior concentração no período noturno. A concentração sanguínea de GH, durante o período de 24 horas, também pode ser modificada pela temperatura, alimentação, fotoperíodo, salinidade e fase de desenvolvimento do animal. Um modelo diurno de expressão de mRNA de GH na hipófise tem sido relatado em juvenis de rabbitfish (*Siganus guttatus*), com

maior nível de mRNA no período diurno e menor no período noturno (AYSON; TAKEMURA, 2006).

Neste experimento não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica e nos níveis plasmáticos de GH, ao longo de 24 horas, nos juvenis de tilápia com peso médio de 85,55 g. Porém, esses peixes podem apresentar ritmos de GH em outras fases de vida (alevino, adulto ou na fase reprodutiva). Um estudo com juvenis de salmão mostrou que esses animais não apresentam ritmos diários de GH no início da fase de crescimento, quando criados em água doce; entretanto, na fase seguinte de criação, em água salgada, os animais apresentam ritmos de secreção de GH, sendo a maior concentração deste hormônio no período noturno (EBBESSON et al., 2008).

Em rabbitfish, assim como neste experimento com tilápias, a variação do momento de alimentação não teve efeito significativo sobre os níveis plasmáticos e expressão gênica do GH (AYSON; JESUS-AYSON; TAKEMURA, 2007).

As ações do GH são mediadas por receptores, os GHRs. Em peixes e outros vertebrados, a expressão de GHR é mais abundante no fígado, embora o mRNA seja expresso em outros tecidos como músculo, brânquias, rins, cérebro, dentre outros (BALLESTEROS et al., 2000; PIERCE et al., 2007; VERY; SHERIDAN, 2007).

Avaliações dos ritmos de expressão de receptores não têm sido exploradas pelas pesquisas até o momento, e este trabalho pode ser o primeiro relato do ritmo diário de receptores do hormônio do crescimento em tilápias. Neste estudo, os receptores de *gh* hepáticos apresentaram ritmos quando a alimentação foi fornecida aos animais em ML, e tanto o *ghr1*, quanto o *ghr2* apresentaram a mesma acrofase (2:59 horas). A restrição no fornecimento do alimento em MD parece ter suprimido a expressão rítmica dos GHRs. No músculo, somente o *ghr1* apresentou ritmos de expressão diária. A acrofase dos

animais alimentados em ML ocorreu às 4:10 horas e a mudança no período de fornecimento do alimento para MD provocou um deslocamento na acrofase, registrado às 9:01 horas, ou seja, seis horas após a alimentação dos animais em ML.

Em mamíferos há relatos de que o PACAP tem funções sobre os ritmos circadianos (HARMAR et al., 2012; LEE et al., 2013; WEBB; COOLEN; LEHMAN, 2013), porém, em peixes ainda não existem pesquisas nesta área. O PACAP vem sendo estudado como um forte estimulador da liberação de GH, pois apresenta mais efetividade e consistência que o GHRH, na regulação de secreção do GH em peixes (CHANG; WONG, 2009). Em kinguios (*Carassius auratus auratus*), observa-se a eficácia do PACAP no controle da secreção de GH durante todo o período reprodutivo sazonal, e nota-se que o máximo de eficácia do PACAP ocorre quando as gônadas já estão completamente desenvolvidas, ou seja, no período pré-desova (REINECKE, 2010).

O GH é o principal regulador da síntese do IGF, numa ampla variedade de tecidos de peixes e outros vertebrados (PIWIEN-PILIPUK; HUO; SCHWARTZ, 2002; WOOD; DUAN; BERN, 2005), e os IGFs são os principais mediadores dos efeitos do GH na indução do crescimento em peixes e outros vertebrados, podem ter ação autócrina, parácrina ou endócrina (WOOD; DUAN; BERN, 2005). Os IGFs afetam muitos processos, tais como a estimulação da síntese de proteína e a inibição de proteólise; proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular; e a manutenção dos tecidos (ALLARD; DUAN, 2011; WOOD; DUAN; BERN, 2005).

Neste experimento, foi avaliada a presença de ritmos diários na expressão do mRNA de *igf-1*, *igf-2a*, *igf-1ra* e *igf-2r*. No entanto, a análise do COSINOR não revelou diferenças significativas na expressão diária pelos animais. A avaliação da presença de ritmos diários de *igf-1* e *igf-2* foi feita

também em rabbitfish, alimentados em dois horários distintos (às ZT 9 e às ZT 15), e também não foram encontrados ritmos na expressão destes genes.

A ingestão de alimentos é um importante modulador de IGF-1 hepático e pode ser importante para funções anabólicas. Os níveis de expressão do mRNA deste gene elevaram-se, cinco a seis horas após a alimentação, em rabbitfish (AYSON; JESUS-AYSON; TAKEMURA, 2007), seguindo o mesmo padrão em douradas, em que foi observada uma maior expressão de mRNA de *igf-1* após a alimentação, embora a expressão desse gene tenha ocorrido dez horas mais tarde (METÓN et al., 2000).

Apesar de não terem apresentado ritmo diário, os níveis de *igf-1* no fígado foram significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$) (Figura 5A), para animais alimentados em ML, em comparação aos demais, porém, ao contrário do relatado acima, os níveis de *igf-1* diminuíram três horas após a alimentação (ZT 9), retornando ao máximo de expressão nove horas após o fornecimento do alimento.

É possível que a biossíntese e a liberação do IGF sejam reguladas de forma independente (REINDL; SHERIDAN, 2012).

A expressão de IGF-2 neste experimento não apresentou diferença entre os pontos avaliados. Resultado semelhante foi encontrado em rabbitfish, no qual também não foi observado ritmo de mRNA de *igf-2* durante um ciclo de 24 horas, entre grupos de animais alimentados às ZT 9, às ZT 15 ou em jejum de 24 horas (AYSON; JESUS-AYSON; TAKEMURA, 2007).

Assim como relatado para os receptores de GH, não existem estudos para avaliar os ritmos de expressão de IGFs. Neste trabalho não foram observados ritmos diários de expressão para *igf-1ra* e *igf-2r*, na análise de COSINOR. Entretanto, foi observado que no músculo, o *igf-1ra* apresenta diferença entre os pontos avaliados (Tukey, $p < 0,05$), sendo a menor expressão às ZT 3 e a maior às ZT 9. Ao se observar o comportamento ilustrado no Gráfico

5A, nota-se que a expressão de *igf-1* em animais alimentados em MD segue os padrões das médias apresentadas por este receptor, embora não seja possível afirmar, uma vez que não foi observada diferença significativa entre os pontos para *igf-1* hepático.

Estudos demonstram que fatores como o estado nutricional, a temperatura, alguns hormônios e os próprios IGFs atuam na síntese e expressão do IGFs (REINDL; SHERIDAN, 2012).

Os ritmos diários de expressão dos genes do eixo somatotrópico em juvenis de tilápia, avaliados neste estudo, parecem não estar relacionados com os hormônios, mas sim com os receptores.

4.2 Resposta gênica de aplicação do hormônio do crescimento (GH)

No segundo experimento, foi avaliada a resposta endócrina sobre a aplicação de GH intramuscular. Na análise da concentração do GH plasmático, não foi observada diferença significativa no teste de ANOVA ($p > 0,05$). Ao se avaliar a resposta gênica, nota-se que os genes de *pacap1a* no hipotálamo e *igf-1*, *igf2r* e *ghr1* no fígado, também não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$). A Figura 9 apresenta a expressão do mRNA de *gh* na hipófise e *pacap-1b* no hipotálamo. Em todas as figuras, cada barra representa um tratamento e estes estão nomeados pelas siglas Inj ZT 3 (injeção de GH às ZT 3) ou ZT 15 (injeção de GH em ZT 15), e ML (alimentação no meio do dia em ZT 6) ou MD (alimentação no meio da noite em ZT 18). A barra que contém um asterisco (*) na parte superior mostra que houve diferença significativa entre os animais injetados com GH e o controle (animais injetados com solução salina, 0,9% de NaCl).

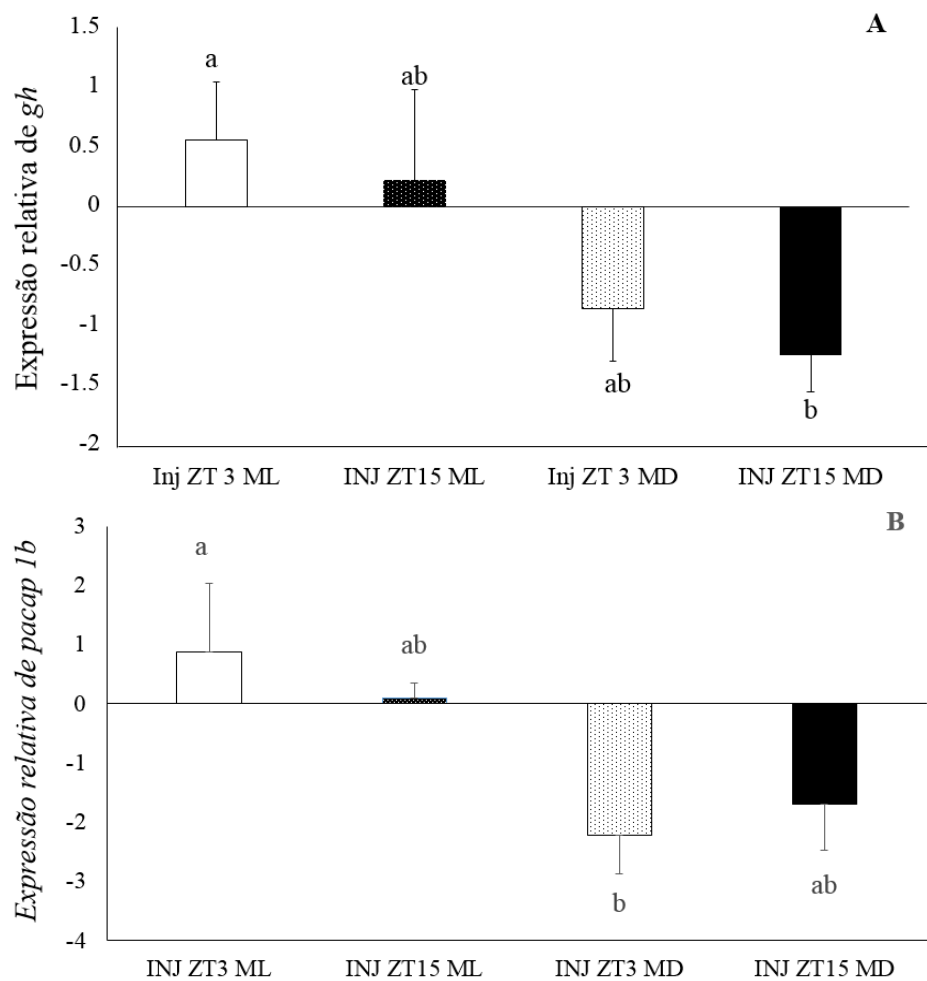


Figura 9 Gráficos representativos das expressões relativas dos mRNA para GH na hipófise (gráfico A) e *pacap-1b* no hipotálamo (gráfico B)

Legenda: (Letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

Analisando a Figura 9A, nota-se que a maior expressão de GH ocorreu para os animais do tratamento Inj ZT 3 ML, e a menor expressão de *gh* se deu para os animais referentes ao tratamento Inj ZT 15 MD. Para *pacap 1b*, assim como para *gh*, o grupo que apresentou maior expressão foi o Inj ZT 3 ML e a menor expressão foi Inj ZT 3 MD. Em ambos os mRNAs não foram observadas

diferenças estatísticas entre os animais do grupo injetado com GH e seu controle. Isso sugere que as diferenças encontradas entre os tratamentos são decorrentes do horário de alimentação e do período de coleta das amostras, e não do efeito da injeção do GH.

Na Figura 10, observa-se a expressão relativa no fígado dos mRNAs de *igf-2a* (Figura 10A) e de *ghr2* (Figura 10B).

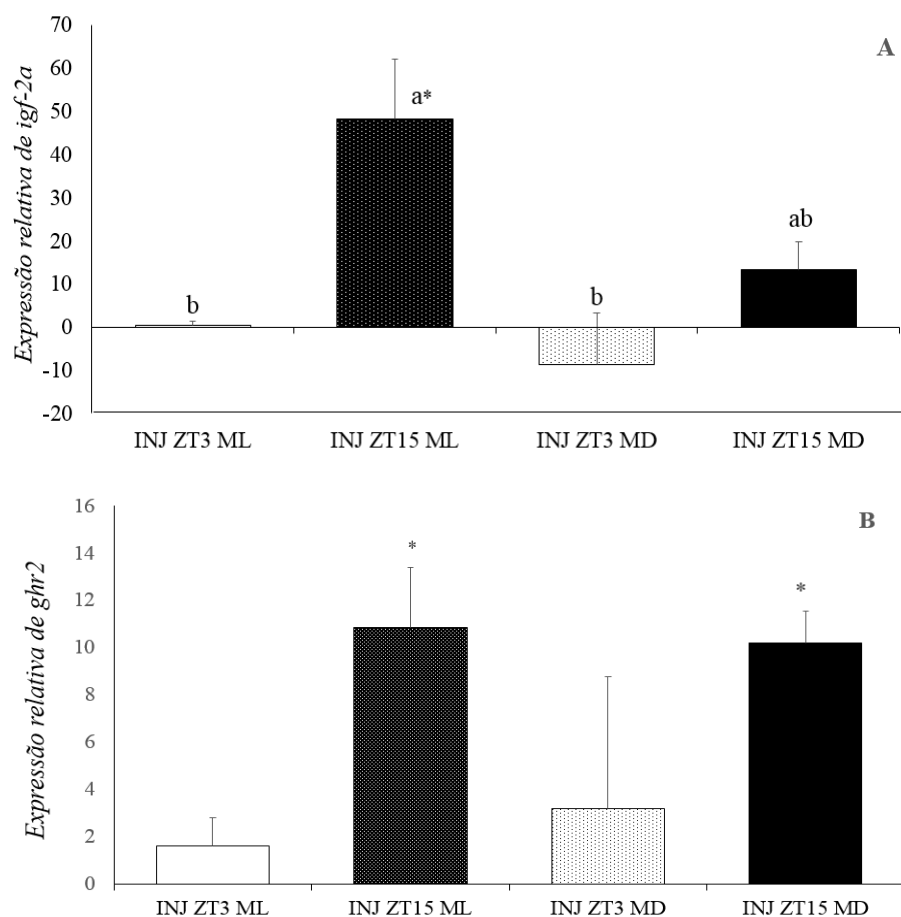


Figura 10 Gráficos representativos das expressões relativas do mRNA para *igf-2a* (gráfico A) e *ghr-2* (gráfico B), no fígado de tilápias

Legenda: (Letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey; o asterisco (*) representa diferença significativa entre o tratamento de animais injetados com GH e seu controle (injetado com veículo) pelo teste F ($p < 0,05$).

Na Figura 10A, quando a comparação é feita entre os tratamentos, nota-se que a menor expressão de mRNA de *igf-2a* se encontra para os animais injetados em ZT 3, tanto para animais alimentados em ML quanto em MD (Tukey, $p < 0,05$). A maior expressão de *igf-2a* foi registrada para os peixes do grupo Inj ZT 15 ML (Tukey, $p < 0,05$), que também apresentou diferenças entre

os animais injetados com GH e seu controle (teste F, $p < 0,05$). Isso mostra que para expressão de *igf-2a*, tanto o horário de alimentação, quanto o de injeção de GH influenciaram na expressão do mRNA correspondente. A Figura 10B mostra a expressão relativa de mRNA de *ghr2*, que não apresentou diferenças entre os grupos, porém, quando os animais foram injetados com GH em ZT 15 a expressão de *ghr2* foi estatisticamente maior, quando comparada a seus grupos controle (teste F, $p < 0,05$). A expressão de *ghr2* é independente do momento de alimentação, entretanto, sua expressão é influenciada pelo horário de injeção de GH nos animais.

A Figura 11 representa a expressão dos mRNAs de *igf1ra* e *igf2r* no músculo de tilápias.

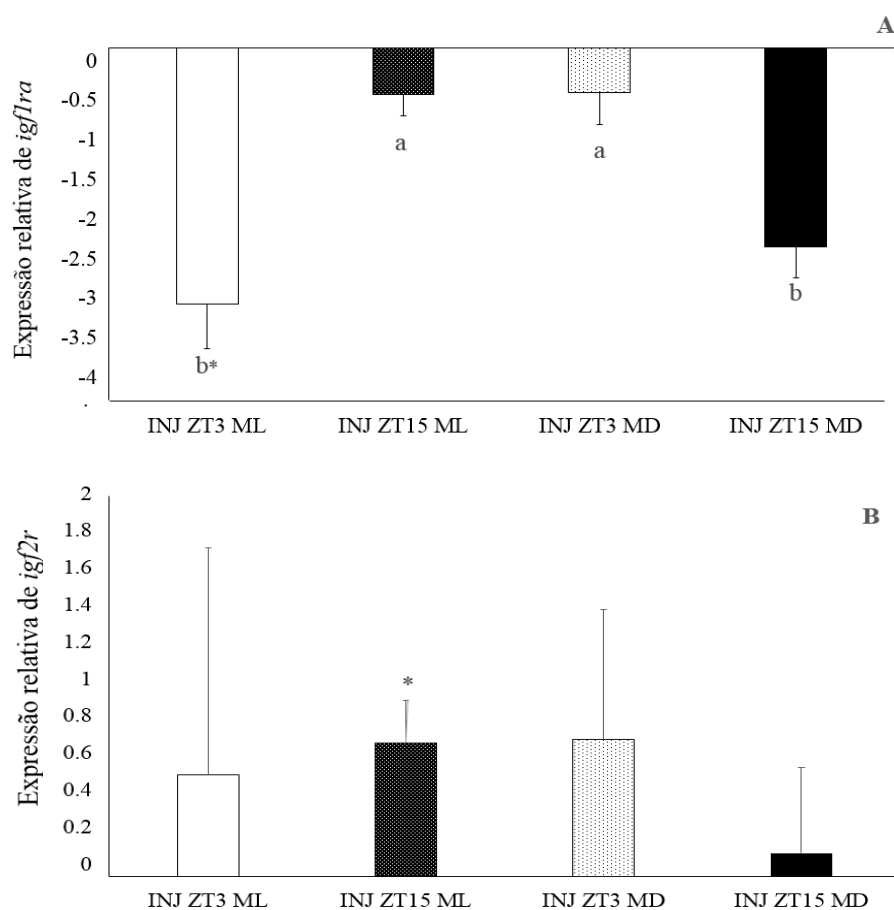


Figura 11 Gráficos representativos das expressões dos mRNAs para *igf1ra* (A) e *igf2r* (B), no músculo de tilápias

Legenda: (Letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey; o asterisco (*) representa diferença significativa entre o tratamento de animais injetados com GH e seu controle (injetado com veículo) pelo teste F ($p < 0,05$)).

Na Figura 11A, nota-se que a expressão do mRNA *igf1ra* no músculo foi inibida em todos os tratamentos avaliados, porém, essa foi maior para os animais dos grupos Inj ZT 3 ML e Inj ZT 15 MD, quando comparados aos dos grupos Inj ZT 15ML e Inj ZT 3 MD. Somente os animais do tratamento Inj ZT 3 ML apresentaram expressões estatisticamente diferentes do seu controle.

A Figura 12 mostra a expressão do mRNA de *ghr1* e *ghr2* no músculo das tilápias.

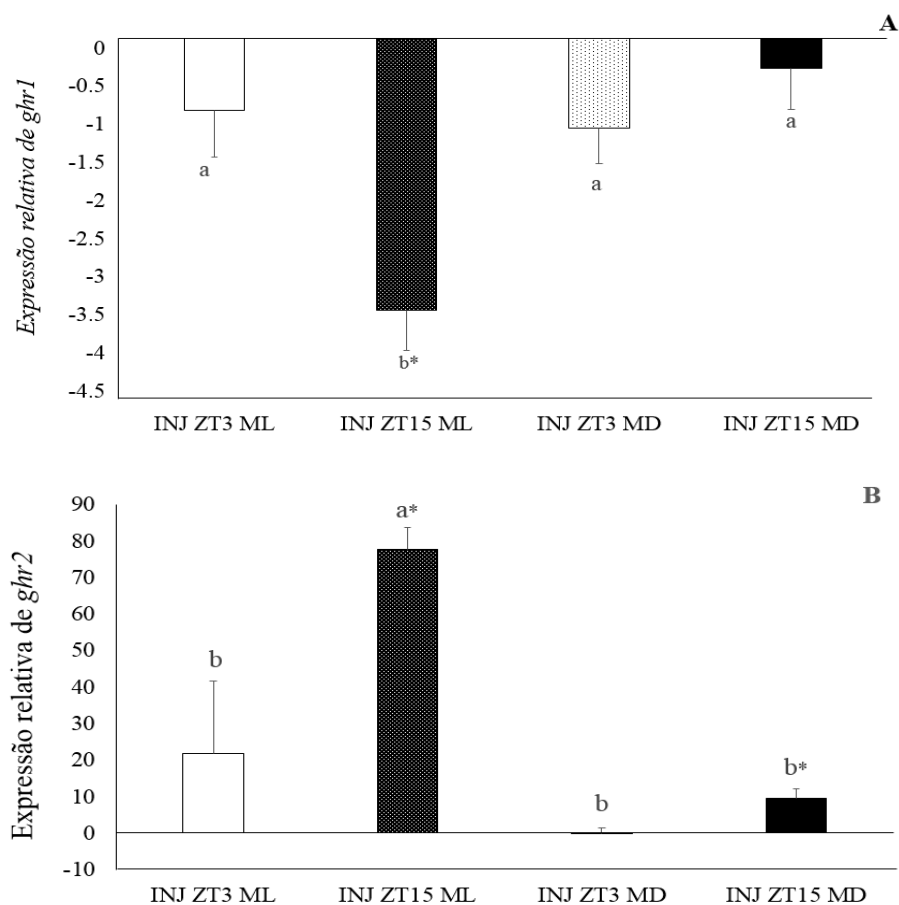


Figura 12 Gráfico representativo das expressões relativas dos mRNA para *ghr1* (A) e *ghr2* (B) em músculo de tilápia

Legenda: (As letras distintas são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey e o asterisco (*) representa diferença significativa entre o tratamento de animais injetados com GH e seu controle (injetado com veículo) pelo teste F ($p < 0,05$).

Na análise da Figura 12, é possível observar o comportamento distinto dos dois tipos de receptores de GH. Na Figura 12A, o *ghr1* foi inibido em todos

os tratamentos. Entretanto, esta inibição foi maior para os animais do grupo Inj ZT 15 ML, mostrando-se também diferente do seu controle. Já para o *ghr2* (Figura 12B), a maior expressão do mRNA foi apresentada pelos animais do grupo Inj ZT 15 ML, sendo que quando se compara o efeito da injeção de GH sobre a expressão deste gene, nota-se que os peixes dos grupos Inj ZT 15, alimentados ML e MD, apresentaram aumento significativo na expressão deste receptor, quando comparados às médias dos seus respectivos controles (teste F, $p < 0,05$).

Até o momento, o que está descrito sobre a cascata de sinalização do GH indica que ela se inicia no hipotálamo, com a liberação de *PACAP* (em peixes) e/ou GHRH (em mamíferos); estes, por sua vez, se ligam aos seus receptores, induzindo a liberação de GH pela hipófise na corrente sanguínea. O GH se liga a receptores que estão presentes em vários tecidos, incluindo fígado e músculo, induzindo, assim, vários processos metabólicos, entre eles a produção de IGF.

O IGF é produzido em diferentes tecidos, sendo o hepático o principal deles. Ao atingir a corrente sanguínea, esse hormônio se liga ao receptor específico no tecido alvo provocando, assim, seus efeitos na célula (CANOSA; CHANG; PETER, 2007).

Esta cascata de atuação do GH pode ser dividida em duas formas distintas. A primeira demonstra os efeitos causados no organismo pela sua ação, e a segunda, o controle da produção e liberação do próprio GH.

Em teoria, no momento em que o GH exógeno foi injetado nos animais, este atingiu a corrente sanguínea e provocou um *feedback* negativo no hipotálamo e hipófise, diminuindo, assim, sua expressão e, conseqüentemente, a produção de GH e *PACAP* endógenos. Porém, essa inibição não foi comprovada neste experimento, como mostrado nas Figuras 9A e 9B.

Em mamíferos, o principal inibidor da secreção de GH é a somatostatina, cuja secreção é estimulada pelo aumento dos níveis de GH

sanguíneos (LENGYEL, 2006). Em peixes, os resultados encontrados são contraditórios. Pesquisas mostram que a somatostatina pode atuar como inibidor em carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*) (XIAO; LIN, 2003), e há um grupo de pesquisadores que não acreditam que a somatostatina tenha um papel fisiológico no controle da secreção de GH (KLEIN; SHERIDAN, 2008; NELSON; SHERIDAN, 2005). No período de execução deste trabalho, não se encontrava disponível na base de dados do Ensembl o gene da somatostatina e por este motivo não foi possível avaliá-la.

O PACAP estimulou a liberação de GH em carpa (WONG et al., 2005) e kinguio (MITCHELL et al., 2008), e é tratado como o principal regulador fisiológico da liberação de GH em peixes. Esse polipeptídeo apresenta duas isoformas e até o momento não existe estudo que comprove uma diferença na funcionalidade entre elas (CHANG; WONG, 2009). Neste experimento, foram avaliadas as duas isoformas do PACAP, tipo 1a e 1b, entretanto, somente a *pacap 1b* apresentou diferença significativa (Figura 9B), sendo que os níveis de expressão foram bem próximos do encontrado para o gene do *gh* (Figura 9A), nos animais alimentados em ML. A mínima expressão de ambos ocorreu nos animais alimentados durante a noite, sendo a menor de GH no tratamento INJ ZT 15 MD e a de *pacap-1b*, no tratamento INJ ZT 3 MD. Podemos suspeitar que o *pacap 1b* pode ser mais efetivo na liberação de GH do que o *pacap 1a*, porém, estudos mais aprofundados deverão ser feitos para comprovar esse efeito.

O ritmo circadiano de liberação do GH já foi muito estudado em salmão (BJÖRNSSON et al., 2002) e em várias espécies de ciprinídeos (ZHANG; LIN; PETER, 1994) e foi observada a presença de um ou mais picos sanguíneos ao longo de 24 horas, sendo que para estas espécies, o período de maior concentração de GH foi registrado no início da noite. Estes resultados são similares ao encontrado neste experimento. A injeção com GH não afetou a expressão dos genes, mas o horário de alimentação sim. A coleta dos tecidos foi

feita dez horas após a administração de GH, ou seja, no tratamento INJ ZT 3 ML, que apresentou maior expressão de *gh* e *pacap 1b*, a coleta ocorreu às ZT 13, que representa o início do período noturno, uma hora após as luzes serem desligadas. Experimentos com kinguio (JOHNSON et al., 2002) e goraz (*Pagellus bogaraveo*) (CHAN et al., 2004) mostram a complexidade dos mecanismos envolvidos na regulação do GH.

Ao ser liberado na corrente sanguínea, o GH interage, no tecido alvo, com seu receptor, provocando uma cascata de sinalização pós-receptor que pode promover o crescimento somático (KOPCHICK; ANDRY, 2000), funções reprodutivas (NEE PATHAK et al., 2015), imunológicas (YADA, 2007) e osmorregulatórias (SAKAMOTO; MCCORMICK, 2006) em peixes.

Em peixes teleósteos, foi relatada a existência de dois tipos de receptores de *gh*, o *ghr1* e o *ghr2*. O *ghr1* é mais parecido com o receptor de animais tetrápodes e o *ghr2* é exclusivo de teleósteos (FUENTES et al., 2013). Em tilápia, a expressão de *ghr1* é mais elevada no tecido adiposo, fígado e músculo, enquanto a expressão de *ghr2* é mais elevada no músculo, coração, testículo e fígado, indicando possíveis funções destes receptores no metabolismo (PIERCE et al., 2007).

Em goraz, a expressão de *ghr2* é significativamente mais elevada do que a expressão de *ghr1*, em diversos tecidos, como no desenvolvimento das gônadas, rins, músculo, hipófise e baço (JIAO et al., 2006). É evidente que *ghr1* e *ghr2* têm padrões de expressão distintos nos tecidos dos peixes, mas ainda não está claro se os dois receptores têm funções celulares distintas ou sobrepostas.

Com base nas informações disponíveis, ainda não é possível determinar se diferentes isoformas de GHR de peixes podem ser responsáveis por desencadear um subconjunto específico de respostas biológicas.

Ao se analisar a expressão do mRNA dos GHRs no fígado (Figura 10B) e músculo (Figuras 12A e 12B), nota-se que houve respostas distintas dos

receptores. O *ghr1* no fígado não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, porém, no músculo (Figura 12B), o grupo de animais INJ ZT 15 ML mostrou uma inibição na expressão do gene, influenciada tanto pelo período de fornecimento do alimento, quanto pelo horário de injeção do GH. Entre os demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$). O GHR2 apresentou comportamento similar no fígado (Figura 10B) e músculo (Figura 12B). A hora de administração do GH foi fundamental para estimular a expressão desse receptor, sendo que os animais injetados no período noturno apresentaram uma expressão significativamente maior de *ghr2*, quando comparados aos injetados no período diurno (teste F, $p < 0,05$).

Sabe-se que o GH afeta a expressão do GHR em várias espécies de peixe, entretanto, os resultados que comprovam tal fato são contraditórios. Trabalhos com expressão de GH transgênico para diferentes espécies de peixes mostraram aumento do crescimento dos animais, para salmão (DEVLIN et al., 1994) e *Misgurnus mizolepis* (NAM et al., 2001), e diminuição no crescimento, para carpa (ZHANG et al., 1990) e tilápia (*Oreochromis mossambicus*) (HERNÁNDEZ et al., 1997). Em hepatócitos isolados de truta arco-íris, o tratamento com GH resultou em aumento de 2,5 a 3 vezes na taxa de transcrição de *ghr1* e *ghr2* (VERY; SHERIDAN, 2007). No entanto, o tratamento com GH, *in vivo*, para goraz preto (*Spondyliosoma cantharus*) e goraz (*Pagellus bogaraveo*), não alterou os níveis hepáticos do mRNA de *ghr1* e *ghr2* (JIAO et al., 2006). As alterações provocadas pela administração de GH também foram observadas em outros vertebrados. Trabalhos com diferentes terapias em ratos mostraram que uma administração crônica provoca aumento nos níveis de *ghr*, enquanto o tratamento agudo induz uma diminuição do *ghr* no fígado (BAXTER; ZALTSMAN, 1984; MAITER et al., 1988). Estes resultados sugerem que a regulação dos diferentes subtipos de GHR ocorre, em vários tecidos, em resposta ao próprio GH.

A maioria dos trabalhos com avaliação de GH em peixes é com animais transgênicos ou com administração do GH exógeno por longos períodos. Trabalhos com peixes avaliando a resposta aguda são escassos. As diferentes respostas do organismo ao tratamento com GH podem ser devido aos diferentes modos de fornecimento (crônico ou agudo), a diferenças entre os tipos de tecidos ou à espécie avaliada. Neste trabalho o receptor de *ghr2* aumentou sua expressão de mRNA com administração de GH, no início do período noturno. Esse receptor apresenta uma resposta mais rápida ao tratamento agudo com GH. O *ghr1* pode estar envolvido na resposta ao tratamento crônico, porém, há a necessidade de mais estudos nesta área.

O GH é o principal regulador da síntese de IGF, numa grande variedade de tecidos de animais vertebrados (PIWIEN-PILIPUK; HUO; SCHWARTZ, 2002; WOOD; DUAN; BERN, 2005). Tratamentos com GH *in vivo* estimulam a síntese de mRNA de IGF-1 e IGF-2, em alguns tecidos de peixes. Estudos *in vivo* mostram que injeções de GH aumentam a transcrição do mRNA de *igf-1* e/ou *igf-2*, no tecido hepático de goraz vermelho (*Pagrus auriga*) (PONCE et al., 2008) carpa comum (TSE et al., 2002; VONG; CHAN; CHENG, 2003), truta arco-íris (SHAMBLOTT et al., 1995) e bagre do canal (PETERSON; SMALL, 2005). Estudos *in vitro* também mostraram que o tratamento com GH em hepatócitos isolados resultou em elevados níveis de IGF em trutas arco-íris (HANSON et al., 2010; REINDL et al., 2011; SHAMBLOTT et al., 1995), tilápias (KAJIMURA et al., 2001), salmão (PIERCE et al., 2005, 2009), goraz prata (*Sparus sarba*) (LEUNG et al., 2008) e carpa comum (TSE et al., 2002).

Existem dois tipos de IGFRs em vertebrados, o IGFR1 e o IGFR2 (CARUSO; SHERIDAN, 2011). A expressão do mRNA de *igfr1* foi demonstrada em diversos tecidos de salmonídeos, incluindo músculo, baço, tecido adiposo, intestino, fígado, coração, testículos, ovários, rins, hipófise e cérebro (BIGA et al., 2004; DUAN; DUGUAY; PLISETSKAYA, 1993;

DUGUAY et al., 1992; SHAMBLOTT; CHEN, 1993). Já a expressão do mRNA de *igfr2* foi encontrada em tecidos como do coração, timo, rins e durante o desenvolvimento embrionário dos mamíferos (FUNK et al., 1992; SÉNIOR et al., 1990), em oócitos, embrião e músculo de juvenis de truta marrom (MENDEZ et al., 2001) e em embrião do peixe-zebra (*Danio rerio*) no estágio inicial e na região do cérebro de embriões em estágio final de desenvolvimento (NOLAN et al., 2006). O principal regulador da expressão de mRNA dos receptores são as moléculas de *igf-1* e *igf-2*, sendo que a presença do *igf-1* induz uma maior expressão de *igf-1r* e o *igf-2* induz a expressão de *igf-2r* (ROMANELLI et al., 2007). A produção de IGFs, juntamente com a expressão de seu receptor num mesmo tecido, indica que essa molécula pode ter efeitos parácrinos/autócrinos.

Pesquisas relataram que o fígado é o principal produtor de IGFs. Neste trabalho não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para a expressão do mRNA de *igf-1* neste tecido, que também não apresentou a transcrição do receptor de *igf-1ra*. Estes resultados nos indicam que o *igf-1* não apresenta nenhuma resposta ao tratamento agudo com GH e também não induz nenhum efeito neste tecido, pela falta de receptores. Já o *igf-2* foi estimulado pela administração de GH, nos animais do grupo INJ ZT 15 ML (Figura 10A), porém, nenhum efeito foi encontrado sobre seus receptores.

No músculo, a injeção de GH proporcionou diferentes efeitos na expressão do *igf-1ra* e *igf-2r*. Os animais do grupo INJ ZT 3 ML (Figura 11A) mostraram inibição da transcrição de IGF-1Ra. Já para os peixes referentes ao grupo INJ ZT 15 ML (Figura 11B) o GH exógeno induziu uma maior expressão de *igf-2r*. Como descrito acima, o principal estimulador da expressão do IGFR é o próprio IGF, portanto, o efeito da administração de GH na expressão de *igf-2r*, para os animais do grupo INJ ZT 15 ML, no músculo, pode ter sido de maneira indireta, pois o mesmo tratamento induziu uma maior transcrição de *igf-2* no

fígado. Assim, o aumento de transcrição muscular de IGF-2R pode ter sido estimulado pelo aumento na concentração de *igf-2* produzido no fígado, e não pelo efeito direto da injeção de GH.

Fatores ambientais como o estado nutricional de um organismo, têm um forte efeito sobre a expressão dos GHRs, IGFs e IGFRs, em alguns tecidos de algumas espécies de peixes. Porém, não há pesquisas avaliando os efeitos da hora de alimentação sobre a transcrição desses genes.

Robinson (1991) relata que no tratamento de algumas anomalias causadas pela falta de GH em humanos, a administração de GH exógeno no período noturno provoca resultados mais expressivos. Uma resposta semelhante foi encontrada neste experimento, uma vez que os animais injetados às ZT 15 responderam melhor ao tratamento com GH exógeno quando comparados aos demais.

A regulação do eixo somatotrópico é extremamente complexa e a alta variabilidade dos dados, encontrada entre os animais neste trabalho, dificulta uma conclusão mais precisa dos resultados.

Os dois experimentos apresentados mostram que os juvenis de tilápia apresentam ritmos de expressão de alguns dos genes do eixo somatotrópico e que a hora de administração do hormônio de crescimento afeta a resposta fisiológica do animal.

Ao se realizar estudos sobre o eixo somatotrópico em peixes, deve-se observar antes a presença de ritmos biológicos, uma vez que estes podem influenciar o resultado das pesquisas, em função da hora em que o material biológico for recolhido para análise. Outro fator relevante é a hora de administração de hormônios como o GH, já que este pode apresentar respostas fisiológicas distintas, dependendo do horário de alimentação dos animais e da administração exógena.

5 CONCLUSÕES

Para o Experimento 1, é possível concluir que:

- a) os hormônios do eixo somatotrópico e os receptores de IGF não apresentam ritmos diários de expressão gênica em juvenis de tilápia;
- b) os receptores de *gh* apresentam ritmos hepáticos em animais alimentados em ML, sendo que estes ritmos foram suprimidos com alimentação em MD;
- c) o *ghr1* foi o único receptor que apresentou ritmos no músculo, porém, houve deslocamento de seis horas na acrofase, em função do horário de alimentação dos animais.

Para o Experimento 2, é possível concluir que:

- a) os tecidos alvos do hormônio do crescimento (fígado e músculo) têm mais sensibilidade à administração no período noturno (ZT 15), quando comparado ao diurno (ZT 3);
- b) a expressão gênica de *igf-2a* no fígado e *igf-2r* no músculo, em animais alimentados em ML, é estimulada de forma simultânea pela administração de GH às ZT 15;
- c) os receptores de *ghr2* são estimulados, no fígado, pela administração de GH noturna, sendo que sua resposta independe do período de alimentação;
- d) no músculo, a administração de GH às ZT 15 induz a expressão gênica do *ghr2*, com resposta mais intensa para animais comendo em ML, em comparação àqueles alimentados em MD.

REFERÊNCIAS

AEGERTER, S.; JALABERT, B.; BOBE, J. Messenger RNA stockpile of cyclin B, insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor II, insulin-like growth factor receptor Ib, and p53 in the rainbow trout oocyte in relation with developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 67, n. 2, p. 127-135, Feb. 2004.

ALLARD, J. B.; DUAN, C. Comparative endocrinology of aging and longevity regulation. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 2, p. 75, Jan. 2011.

ANDO, H. et al. Diurnal and circadian oscillations in expression of kisspeptin, kisspeptin receptor and gonadotrophin-releasing hormone 2 genes in the grass puffer, a semilunar-synchronised spawner. **Journal of Neuroendocrinology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 459-467, July 2014.

AYSON, F. G.; JESUS-AYSON, E. G. T. de; TAKEMURA, A. mRNA expression patterns for GH, PRL, SL, IGF-I and IGF-II during altered feeding status in rabbitfish, *Siganus guttatus*. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 150, n. 2, p. 196-204, Jan. 2007.

AYSON, F. G.; TAKEMURA, A. Daily expression patterns for mRNAs of GH, PRL, SL, IGF-I and IGF-II in juvenile rabbitfish, *Siganus guttatus*, during 24-h light and dark cycles. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 149, n. 3, p. 261-268, Dec. 2006.

BALLESTEROS, M. et al. Distribution and abundance of messenger ribonucleic acid for growth hormone receptor isoforms in human tissues. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Stanford, v. 85, n. 8, p. 2865-2871, Aug. 2000.

BAXTER, R. C.; ZALTSMAN, Z. Induction of hepatic receptors for growth hormone (GH) and prolactin by GH infusion is sex independent. **Endocrinology**, Baltimore, v. 115, n. 5, p. 2009-2014, Nov. 1984.

BIGA, P. R. et al. The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-I, IGF-I receptor, and GH mRNA levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 135, n. 3, p. 324-333, Feb. 2004.

BINOUX, M. The IGF system in metabolism regulation. **Diabète & Métabolisme**, Paris, v. 21, n. 5, p. 330-337, Dec. 1995.

BJÖRNSSON, B. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 3/4, n. 12, p. 9-24, Dec. 1997.

BJÖRNSSON, B. T. et al. Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 27, n. 3/4, p. 227-242, 2002.

BOULWARE, S. D. et al. Diverse effects of insulin-like growth factor I on glucose, lipid, and amino acid metabolism. **The American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 262, n. 1 pt 1, p. E130-133, Jan. 1992.

BUIJS, R. M.; KALSBECK, A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. **Nature Reviews. Neuroscience**, London, v. 2, n. 7, p. 521-526, 2001.

BUTLER, A. A.; LEROITH, D. Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. **Endocrinology**, Baltimore, v. 142, n. 5, p. 1685-1688, May 2001.

CAELERS, A. et al. Establishment of a real-time RT-PCR for the determination of absolute amounts of IGF-I and IGF-II gene expression in liver and extrahepatic sites of the tilapia. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 137, n. 2, p. 196-204, June 2004.

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

CARUSO, M. A.; SHERIDAN, M. A. New insights into the signaling system and function of insulin in fish. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 173, n. 2, p. 227-247, Sept. 2011.

CAUTER, E. van; POLONSKY, K. S.; SCHEEN, A. J. Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 18, n. 5, p. 716-738, Oct. 1997.

CERDÁ-REVERTER, J. M.; CANOSA, L. F. Neuroendocrine systems of the fish brain. In: FARRELL, A. P. et al. (Ed.). **Fish neuroendocrinology**. New York: Elsevier, 2009. p. 3-74.

CHAN, C. B. et al. Signal transduction mechanism of the seabream growth hormone secretagogue receptor. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 577, n. 1/2, p. 147-153, Nov. 2004.

CHAN, S. J. et al. Expression of multiple insulin and insulin-like growth factor receptor genes in salmon gill cartilage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 23, p. 12446-12451, Nov. 1997.

CHANG, J. P.; WONG, A. O. L. Growth hormone regulation in fish: a multifactorial model with hypothalamic, peripheral and local autocrine/paracrine signals. In: FARRELL, A. P. et al. (Ed.). **Fish neuroendocrinology**. New York: Elsevier, 2009. p. 150-195.

CHAUVIGNÉ, F. et al. Effect of refeeding on IGFI, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 132, n. 2, p. 209-215, June 2003.

COLWELL, C. S. Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. **Nature Reviews. Neuroscience**, London, v. 12, n. 10, p. 553-569, 2011.

DALLMANN, R.; BROWN, S. A.; GACHON, F. Chronopharmacology: new insights and therapeutic implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 54, p. 339-361, 2014.

DAVEY, H. W. et al. STAT5b Is Required for GH-Induced Liver Igf -I gene expression. **Endocrinology**, Baltimore, v. 142, n. 9, p. 3836-3841, Sept. 2001.

DAZA, D. O. et al. Evolution of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) family. **Endocrinology**, Baltimore, v. 152, n. 6, p. 2278-2289, June 2011.

DEVLIN, R. H. et al. Extraordinary salmon growth. **Nature**, London, v. 371, n. 6494, p. 209-210, Sept. 1994.

DUAN, C.; DUGUAY, S. J.; PLISETSKAYA, E. M. Insulin-like growth factor I (IGF-I) mRNA expression in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*: tissue distribution and effects of growth hormone/prolactin family proteins. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 11, n. 1/6, p. 371-379, July 1993.

DUAN, C.; REN, H.; GAO, S. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 167, n. 3, p. 344-351, July 2010.

DUGUAY, S. J. et al. Nucleotide sequence and tissue distribution of three insulin-like growth factor I prohormones in salmon. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 6, n. 8, p. 1202-1210, Aug. 1992.

EBBESSON, L. O. E. et al. Daily endocrine profiles in parr and smolt Atlantic salmon. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, Oxford, v. 151, n. 4, p. 698-704, 2008.

ENSEMBLE. Disponível em: <<http://www.ensembl.org/index.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Muscle-specific growth hormone receptor (GHR) overexpression induces hyperplasia but not hypertrophy in transgenic zebrafish. **Transgenic Research**, London, v. 21, n. 3, p. 457-469, June 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of world fisheries and aquaculture**. Rome, 2012. 231 p.

FORTES-SILVA, R. et al. Daily rhythms of locomotor activity, feeding behavior and dietary selection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, Oxford, v. 156, n. 4, p. 445-450, Aug. 2010.

FOX, B. K. et al. Effects of fasting on growth hormone, growth hormone receptor, and insulin-like growth factor-I axis in seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 148, n. 3, p. 340-347, Sept. 2006.

FROST, R. A.; NYSTROM, G. J.; LANG, C. H. Regulation of IGF-I mRNA and signal transducers and activators of transcription-3 and -5 (Stat-3 and -5) by GH in C2C12 myoblasts. **Endocrinology**, Baltimore, v. 143, n. 2, p. 492-503, Feb. 2002.

FUENTES, E. N. et al. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone: insulin-like growth factor system. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 192, n. 4, p. 136-148, Oct. 2013.

FUNK, B. et al. Expression of the insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor in multiple human tissues during fetal life and early infancy. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Stanford, v. 75, n. 2, p. 424-31, Aug. 1992.

GABILLARD, J. C. et al. Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2, and IGF type I receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 133, n. 2, p. 233-242, Sept. 2003.

GASTON, S.; MENAKER, M. Pineal function: the biological clock in the sparrow? **Science**, New York, v. 160, n. 3832, p. 1125-1127, June 1968.

HANSON, A. et al. The ERK and PI3K signaling pathways mediate inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor mRNA expression by somatostatin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, New York, v. 315, n. 1/2, p. 57-62, Feb. 2010.

HARMAR, A. J. et al. Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 166, n. 1, p. 4-17, May 2012.

HAUS, E.; SMOLENSKY, M. Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. **Cancer Causes & Control**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 489-500, May 2006.

HAWKES, C.; KAR, S. The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 44, n. 2/3, p. 117-140, Mar. 2004.

HERNÁNDEZ, O. et al. Characterization of transgenic tilapia lines with different ectopic expression of tilapia growth hormone. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, New Jersey, v. 6, n. 4, p. 364-375, Dec. 1997.

HERRERO, M. J.; MADRID, J. A.; SANCHEZ-VAZQUEZ, F. J. Entrainment to light of circadian activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). **Chronobiology International**, New York, v. 20, n. 6, p. 1001-1017, Apr. 2003.

HOLLOWAY, A. C.; LEATHERLAND, J. F. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion in teleost fishes with emphasis on the involvement of gonadal sex steroids. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 8, n. 4, p. 409-429, 1998.

HOSOYA, M. et al. Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, Alberta, v. 1129, n. 2, p. 199-206, Jan. 1992.

JANUKONYTÉ, J. et al. Circadian variation in the pharmacokinetics of steady state continuous subcutaneous infusion of growth hormone in adult growth hormone deficient patients. **Growth Hormone & IGF Research**, New York, v. 23, n. 6, p. 256-260, Dec. 2013.

JEVDJOVIC, T. et al. The effect of hypophysectomy on pancreatic islet hormone and insulin-like growth factor I content and mRNA expression in rat. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 123, n. 2, p. 179-188, Feb. 2005.

JIAO, B. et al. The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 36, n. 1, p. 23-40, Feb. 2006.

JOHNSON, J. D. et al. Function-specific calcium stores selectively regulate growth hormone secretion, storage, and mRNA level. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, Baltimore, v. 282, n. 4, p. E810-E819, Apr. 2002.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 16, n. 1, p. 3-34, Feb. 1995.

KAJIMURA, S. et al. Stimulation of insulin-like growth factor-I production by recombinant bovine growth hormone in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 221-230, 2001.

KALSBECK, A. et al. Mammalian clock output mechanisms. **Essays in Biochemistry**, London, v. 49, n. 1, p. 137-151, June 2011.

KAWAUCHI, H.; SOWER, S. A. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 148, n. 1, p. 3-14, Aug. 2006.

KLEIN, S. E.; SHERIDAN, M. A. Somatostatin signaling and the regulation of growth and metabolism in fish. **Molecular and Cellular Endocrinology**, New York, v. 286, n. 1/2, p. 148-154, May 2008.

KNUTSSON, A. Health disorders of shift workers. **Occupational Medicine**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 103-108, 2003.

KOPCHICK, J. J.; ANDRY, J. M. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. **Molecular Genetics and Metabolism**, New York, v. 71, n. 1/2, p. 293-314, Jan. 2000.

KULCZYKOWSKA, E.; POPEK, W.; KAPOOR, B. G. **Biological clock in fish**. New Hampshire: Science, 2010. 264 p.

LANNING, N. J.; CARTER-SU, C. Recent advances in growth hormone signaling. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, New York, v. 7, n. 4, p. 225-235, Feb. 2007.

LE ROITH, D. et al. The somatomedin hypothesis. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 22, n. 1, p. 53-74, Feb. 2001.

LEE, L. T. O. et al. Discovery of growth hormone-releasing hormones and receptors in nonmammalian vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 7, p. 2133-2138, 2007.

LENGYEL, A. M. J. Novel mechanisms of growth hormone regulation: growth hormone-releasing peptides and ghrelin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 8, p. 1003-1011, Aug. 2006.

LEUNG, L. Y. et al. Direct actions of cortisol, thyroxine and growth hormone on IGF-I mRNA expression in sea bream hepatocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, Oxford, v. 151, n. 4, p. 705-710, Dec. 2008.

LICHANSKA, A. M.; WATERS, M. J. New insights into growth hormone receptor function and clinical implications. **Hormone Research**, Basel, v. 69, n. 3, p. 138-145, Jan. 2008.

LIMA, L.; VARGAS, N. O relógio biológico e os ritmos circadianos de mamíferos: uma contextualização histórica. **Revista de Biologia**, Aveiro, v. 12, n. 2, p. 1-7, 2014.

LIU, J. P. et al. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). **Cell**, Cambridge, v. 75, n. 1, p. 59-72, Oct. 1993.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; EGEA-ALVAREZ, M.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Glucose tolerance in fish: is the daily feeding time important? **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 96, n. 4/5, p. 631-636, Mar. 2009.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F. et al. Daily rhythms in the hypothalamus-pituitary-interrenal axis and acute stress responses in a teleost flatfish, *Solea senegalensis*. **Chronobiology International**, London, v. 30, n. 4, p. 530-539, May 2013.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Zebrafish temperature selection and synchronization of locomotor activity circadian rhythm to ahemeral cycles of light and temperature. **Chronobiology International**, London, v. 26, n. 2, p. 200-218, Feb. 2009.

MADRID, J. A.; BOUJARD, T.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Feeding rhythms. In: HOULIHAN, D. F.; BOUJARD, T.; JOBLING, M. (Ed.). **Food intake in fish**. Oxford: Blackwell Science, 2001. p. 189-215.

MAITER, D. et al. Acute down-regulation of the somatogenic receptors in rat liver by a single injection of growth hormone. **Endocrinology**, Baltimore, v. 122, n. 4, p. 1291-1296, Apr. 1988.

MAKINO, K. et al. Expression of hormone genes and osmoregulation in homing chum salmon: a minireview. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 152, n. 2/3, p. 304-309, June 2007.

MARCHANT, T. A.; PETER, R. E. Seasonal variations in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 237, n. 2, p. 231-239, Feb. 1986.

MATSUDA, K. et al. Immunohistochemical observation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and adenohipophysial hormones in the pituitary of a teleost, *Uranoscopus japonicus*. **Zoological Science**, Tokyo, v. 22, n. 1, p. 71-76, Jan. 2005.

MÉNDEZ, E. et al. Identification of a type II insulin-like growth factor receptor in fish embryos. **Endocrinology**, Baltimore, v. 142, n. 3, p. 1090-1097, Mar. 2001.

METÓN, I. et al. Liver insulin-like growth factor-I mRNA is not affected by diet composition or ration size but shows diurnal variations in regularly-fed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 4, p. 757-760, Apr. 2000.

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

MITCHELL, G. et al. Differential involvement of nitric oxide signaling in dopamine and PACAP stimulation of growth hormone release in goldfish. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 155, n. 2, p. 318-327, Jan. 2008.

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

MOON, T. W. et al. Insulin and IGF-I binding in isolated trout cardiomyocytes. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 103, n. 3, p. 264-272, Sept. 1996.

MOORE, R. Y.; EICHLER, V. B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. **Brain Research**, Philadelphia, v. 42, n. 4, p. 201-206, July 1972.

MOORE, R. Y.; LENN, N. J. A retinohypothalamic projection in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, Philadelphia, v. 146, n. 1, p. 1-14, Sept. 1972.

MORGAN, E. Ecological significance of biological clocks. **Biological Rhythm Research**, Lisse, v. 35, n. 1/2, p. 3-12, 2004.

NAKAO, N. et al. Molecular cloning, identification and characterization of four distinct receptor subtypes for insulin and IGF-I in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 173, n. 2, p. 365-375, May 2002.

NAM, Y. K. et al. Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. **Transgenic Research**, London, v. 10, n. 4, p. 353-362, Aug. 2001.

NELSON, L. E.; SHERIDAN, M. A. Regulation of somatostatins and their receptors in fish. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 142, n. 1/2, p. 117-133, May 2005.

NOLAN, C. M. et al. Mannose 6-phosphate receptors in an ancient vertebrate, zebrafish. **Development Genes and Evolution**, Oxford, v. 216, n. 3, p. 144-151, Mar. 2006.

NORBECK, L. A.; KITTILSON, J. D.; SHERIDAN, M. A. Resolving the growth-promoting and metabolic effects of growth hormone: differential regulation of GH-IGF-I system components. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 151, n. 3, p. 332-341, May 2007.

NORBECK, L. A.; SHERIDAN, M. A. An in vitro model for evaluating peripheral regulation of growth in fish: effects of 17β -estradiol and testosterone on the expression of growth hormone receptors, insulin-like growth factors, and insulin-like growth factor type 1 receptors in rainbow trout. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 173, n. 2, p. 270-280, Sept. 2011.

OKUZAWA, K.; GEN, K. High water temperature impairs ovarian activity and gene expression in the brain-pituitary-gonadal axis in female red seabream during the spawning season. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 194, p. 24-30, Dec. 2013.

PALAMARCHUK, A. Y. et al. The chum salmon IGF-II gene promoter is activated by hepatocyte nuclear factor 3beta. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 446, n. 2/3, p. 251-255, Mar. 1999.

PALAMARCHUK, A. Y. et al. The chum salmon insulin-like growth factor II promoter requires Sp1 for its activation by C/EBP β . **Molecular and Cellular Endocrinology**, San Diego, v. 172, n. 1/2, p. 57-67, Feb. 2001.

PALAMARCHUK, A. Y. et al. Organization and expression of the chum salmon insulin-like growth factor II gene. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 416, n. 3, p. 344-348, Oct. 1997.

PEDROSO, F. L. et al. Changes in mRNA expression of grouper (*Epinephelus coioides*) growth hormone and insulin-like growth factor I in response to nutritional status. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 145, n. 3, p. 237-246, Feb. 2006.

PETERSON, B. C.; SMALL, B. C. Effects of exogenous cortisol on the GH/IGF-I/IGFBP network in channel catfish. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 28, n. 4, p. 391-404, May 2005.

PETERSON, B. C.; WALDBIESER, G. C. Effects of fasting on IGF-I, IGF-II, and IGF-binding protein mRNA concentrations in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 37, n. 2, p. 74-83, Aug. 2009.

PICHA, M. E. et al. Regulation of endocrine and paracrine sources of Igfs and Gh receptor during compensatory growth in hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *Morone saxatilis*). **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 199, n. 1, p. 81-94, Oct. 2008.

PIERCE, A. L. et al. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatotactin receptor in Mozambique tilapia: tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 154, n. 1/3, p. 31-40, Jan. 2007.

PIERCE, A. L. et al. Metabolic hormones regulate basal and growth hormone-dependent igf2 mRNA level in primary cultured coho salmon hepatocytes: effects of insulin, glucagon, dexamethasone, and triiodothyronine. **Journal of Endocrinology**, v. 204, n. 3, p. 331-339, Dec. 2009.

PIERCE, A. L. et al. Time course of the GH/IGF axis response to fasting and increased ration in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 192-202, Feb. 2005.

PIWIEN-PILIPUK, G.; HUO, J. S.; SCHWARTZ, J. Growth hormone signal transduction. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 15, n. 6, p. 771-786, June 2002.

PONCE, M. et al. Molecular characterization and gene expression analysis of insulin-like growth factors I and II in the redbanded seabream, *Pagrus auriga*: transcriptional regulation by growth hormone. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 150, n. 4, p. 418-26, Aug. 2008.

PORTALUPPI, F.; SMOLENSKY, M. H.; TOUITOU, Y. Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. **Chronobiology International**, London, v. 27, n. 9/10, p. 1911-1929, Oct. 2010.

POZIOS, K. C. et al. IGFs stimulate zebrafish cell proliferation by activating MAP kinase and PI3-kinase-signaling pathways. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 280, n. 4, p. R1230-1239, Apr. 2001.

RADAELLI, G. et al. Localization of IGF-I, IGF-I receptor, and IGFBP-2 in developing *Umbrina cirrosa* (Pisces: Osteichthyes). **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 130, n. 3, p. 232-244, Feb. 2003.

REINDL, K. M. et al. Growth hormone-stimulated insulin-like growth factor-1 expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes is mediated by ERK, PI3K-AKT, and JAK-STAT. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 301, n. 1, p. R236-R243, Apr. 2011.

REINDL, K. M.; SHERIDAN, M. A. Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, Oxford, v. 163, n. 3/4, p. 231-245, 2012.

REINECKE, M. Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone-insulin-like growth factor-I system. **Journal of Fish Biology**, London, v. 76, n. 6, p. 1233-1254, Apr. 2010.

RENSING, L.; RUOFF, P. Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. **Chronobiology International**, London, v. 19, n. 5, p. 807-864, 2002.

ROBINSON, I. C. A. F. Chronopharmacology of growth hormone and related peptides. **Advanced Drug Delivery Reviews**, London, v. 6, n. 1, p. 57-82, Jan. 1991.

RODGERS, B. D.; ROALSON, E. H.; THOMPSON, C. Phylogenetic analysis of the insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) and IGFBP-related protein gene families. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 155, n. 1, p. 201-207, Jan. 2008.

ROMANELLI, R. J. et al. Insulin-like growth factor type-I receptor internalization and recycling mediate the sustained phosphorylation of Akt. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 31, p. 22513-22524, Aug. 2007.

ROTWEIN, P.; BILLIARD, J.; WOELFLE, J. Molecular physiology of IGF-I expression. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, Tel Aviv, v. 15, n. 5, p. 1455-1458, Dec. 2002. Supplement.

ROWLAND, J. E. et al. In vivo analysis of growth hormone receptor signaling domains and their associated transcripts. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 25, n. 1, p. 66-77, Dec. 2004.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Bioinformatics Methods and Protocols**, Cambridge, v. 132, n. 3, p. 365-386, 1999.

SAERA-VILA, A.; CALDUCH-GINER, J. A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, J. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 142, n. 2, p. 193-203, May 2005.

SAKAMOTO, T.; MCCORMICK, S. D. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 147, n. 1, p. 24-30, May 2006.

SALGADO-DELGADO, R. et al. Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. **Neuroscience**, Oxford, v. 154, n. 3, p. 922-931, June 2008.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. et al. Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 60, n. 2, p. 665-674, Aug. 1996.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J.; MADRID, J. A. Feeding anticipatory activity. In: HOULIHAN, D.; BOUJARD, T.; JOBLING, M. (Ed.). **Food intake in fish**. Anglian: Wiley, 2001. p. 189-215.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J.; MADRID, J. A.; ZAMORA, S. Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. **Journal of Biological Rhythms**, New York, v. 10, n. 3, p. 256-266, Sept. 1995.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J.; ZAMORA, S.; MADRID, J. A. Light-dark and food restriction cycles in sea bass: effect of conflicting zeitgebers on demand-feeding rhythms. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 58, n. 4, p. 705-714, Oct. 1995.

SCHAYEK, H. et al. Transcription factor E2F1 is a potent transactivator of the insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) gene. **Growth Hormone & IGF Research**, New York, v. 20, n. 1, p. 68-72, Feb. 2010.

SCHLUETER, P. J. et al. Insulin-like growth factor signaling regulates zebrafish embryonic growth and development by promoting cell survival and cell cycle progression. **Cell Death and Differentiation**, New York, v. 14, n. 6, p. 1095-1105, June 2007.

SCHULZ, U. H.; LEUCHTENBERGER, C. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 66, n. 2A, p. 565-574, 2006.

SENIOR, P. V et al. Expression of the IGF-II/mannose-6-phosphate receptor mRNA and protein in the developing rat. **Development**, Cambridge, v. 109, n. 1, p. 67-73, May 1990.

SHAMBLOTT, M. J.; CHEN, T. T. Age-related and tissue-specific levels of five forms of insulin-like growth factor mRNA in a teleost. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, New Jersey, v. 2, n. 6, p. 351-361, Dec. 1993.

SHAMBLOTT, M. J. et al. Appearance of insulin-like growth factor mRNA in the liver and pyloric ceca of a teleost in response to exogenous growth hormone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 15, p. 6943-6946, July 1995.

SHAMBLOTT, M. J. et al. Characterization of a teleost insulin-like growth factor II (IGF-II) gene: evidence for promoter CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) sites, and the presence of hepatic C/EBP. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, New Jersey, v. 7, n. 3, p. 181-190, Sept. 1998.

SHERWOOD, N. M.; KRUECKL, S. L.; MCRORY, J. E. The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 21, n. 6, p. 619-670, Dec. 2000.

SHIMIZU, M. et al. Circulating salmon 28- and 22-kDa insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) are co-orthologs of IGFBP-1. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 174, n. 2, p. 97-106, Nov. 2011.

STEPHAN, F. K. The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. **Journal of Biological Rhythms**, New York, v. 17, n. 4, p. 284-292, Aug. 2002.

STEPHAN, F. K.; ZUCKER, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 69, n. 6, p. 1583-1586, June 1972.

STOKKAN, K. A. et al. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. **Science**, New York, v. 291, n. 5503, p. 490-493, Jan. 2001.

SUNDSTROM, L. F. et al. Growth hormone transgenic salmon pay for growth potential with increased predation mortality. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 271, n. 5, p. S350-S352, Aug. 2004. Supplement.

TEGLUND, S. et al. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. **Cell**, Cambridge, v. 93, n. 5, p. 841-850, May 1998.

TSALAVOUTA, M. et al. Regulation of expression of zebrafish (*Danio rerio*) insulin-like growth factor 2 receptor: implications for evolution at the IGF2R locus. **Evolution & Development**, Malden, v. 11, n. 5, p. 546-558, Jan. 2009.

TSE, M. C. L. et al. PCR-cloning and gene expression studies in common carp (*Cyprinus carpio*) insulin-like growth factor-II. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 1575, n. 1/3, p. 63-74, May 2002.

UCHIDA, K. et al. Effects of fasting on growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, Oxford, v. 134, n. 2, p. 429-439, Feb. 2003.

VERA, L. M. et al. Circadian rhythms of locomotor activity in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Chronobiology International**, London, v. 26, n. 4, p. 666-681, May 2009.

VERA, L. M. et al. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 90, n. 2/3, p. 518-524, 2007.

VERA, L. M.; MADRID, J. A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Locomotor, feeding and melatonin daily rhythms in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 88, n. 1/2, p. 167-172, June 2006.

VERA, L. M.; MONTOYA, A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Effectiveness of the anaesthetic MS-222 in gilthead seabream, *Sparus aurata*: effect of feeding time and day-night variations in plasma MS-222 concentration and GST activity. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v. 110/111, p. 51-57, Feb. 2013.

VERAS, G. C. et al. Ritmos biológicos e fotoperíodo em peixes. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 62, n. 1, p. 25-43, Mar. 2013.

VERY, N. M.; SHERIDAN, M. A. Somatostatin regulates hepatic growth hormone sensitivity by internalizing growth hormone receptors and by decreasing transcription of growth hormone receptor mRNAs. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 292, n. 5, p. R1956-R1962, Jan. 2007.

VONG, Q. P.; CHAN, K. M.; CHENG, C. H. K. Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 178, n. 3, p. 513-521, Sept. 2003.

WEBB, I. C.; COOLEN, L. M.; LEHMAN, M. N. NMDA and PACAP receptor signaling interact to mediate retinal-induced scn cellular rhythmicity in the absence of light. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e76365, Oct. 2013.

WHITE, Y. A. R.; KYLE, J. T.; WOOD, A. W. Targeted gene knockdown in zebrafish reveals distinct intraembryonic functions for insulin-like growth factor ii signaling. **Endocrinology**, Baltimore, v. 150, n. 9, p. 4366-4375, Sept. 2009.

WONG, A. O. L. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: I., functional coupling of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and Ca²⁺/calmodulin-dependent signaling pathways in PACAP-induced GH secretion. **Endocrinology**, San Diego, v. 146, n. 12, p. 5407-5424, Dec. 2005.

WOOD, A. W.; DUAN, C.; BERN, H. A. Insulin-like growth factor signaling in fish. **International Review of Cytology**, New York, v. 243, p. 215-285, Jan. 2005.

XIAO, D.; LIN, H. R. Effects of cysteamine--a somatostatin-inhibiting agent--on serum growth hormone levels and growth in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, Oxford, v. 134, n. 1, p. 93-99, Jan. 2003.

YADA, T. Growth hormone and fish immune system. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 152, n. 2/3, p. 353-358, Jan. 2007.

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

ZBIKOWSKA, H. M. Fish can be first: advances in fish transgenesis for commercial applications. **Transgenic Research**, London, v. 12, n. 4, p. 379-389, 2003.

ZHANG, P. J. et al. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 25, n. 1, p. 3-13, Jan. 1990.

ZHANG, W. M.; LIN, H. R.; PETER, R. E. Episodic growth hormone secretion in the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* (C. & V.). **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 95, n. 3, p. 337-341, Sept. 1994.

ZHU, T. et al. Signal transduction via the growth hormone receptor. **Cellular Signalling**, New York, v. 13, n. 9, p. 599-616, Sept. 2001.

ZUCCHI, S.; CASTIGLIONI, S.; FENT, K. Progesterone alters global transcription profiles at environmental concentrations in brain and ovary of female zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 47, n. 21, p. 12548-12556, Nov. 2013.