

Bruno Cesar Ribeiro Ramos

Fototransdução em células embrionárias ZEM-2S do
peixe teleósteo *Danio rerio*

Phototransduction in embryonic ZEM-2S cells of the
teleost fish *Danio rerio*

São Paulo

2014

Bruno Cesar Ribeiro Ramos

Fototransdução em células embrionárias ZEM-2S do
peixe teleósteo *Danio rerio*

Phototransduction in embryonic ZEM-2S cells of the
teleost fish *Danio rerio*

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, em 01/07/2014, na
Área de Fisiologia Geral.

Orientador(a): Ana Maria de Lauro
Castrucci

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Ramos, Bruno Cesar Ribeiro

Fototransdução em células embrionárias ZEM-2S do peixe teleósteo *Danio rerio*. / Bruno Cesar Ribeiro Ramos; orientador Ana Maria de Lauro Castrucci. -- São Paulo, 2014.

130 f.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Melanopsina. 2. Fototransdução. 3. *Danio rerio*. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Dedico esta tese a minha família e especialmente aos meus amados pais, Hélio Theodoro Ramos e Elisabete Simonato Ribeiro.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, pois foram e sempre serão os motivos de minhas realizações.

Agradeço aos meus irmãos, Daniel Gustavo Ribeiro Ramos, Alexandre Ribeiro de Freitas, Theodoro Tetsuo Nagoya, Jefferson Ribeiro Guerra, Ana Beatriz, por tudo o que eles representam para mim.

Agradeço ao meu padrasto Antonio Tadeu de Freitas e a minha madrasta Maria de Jesus, pelo carinho e apoio.

Agradeço à minha noiva Daniela Sawatani, pelor amor, paciência e cumplicidade.

Agradeço aos meus amigos pelos momentos de diversão e descontração durante o longo processo de construção deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de laboratório, Marcio Patto, Jennifer Sousa, Rafael Dias, Nathana Mezzalira, Rodrigo Costa, Leonardo Assis e especialmente à Maria Nathália, Leonardo Lima e Maristela Poletini, pelo suporte e auxílio na construção deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora Ana Maria de Lauro Castrucci por tudo o que já foi dito aos meus amigos de laboratório, por abrir as portas do seu laboratório para realização deste projeto e pela orientação exemplar.

Por fim, agradeço a Deus por ter posto todos vocês no meu caminho.

ÍNDICE

Notas	1
Nomenclatura adotada para genes e proteínas	1
<i>Introdução</i>	2
Rodopsinas	5
Melanopsina: Contexto Histórico.....	10
Estrutura da Melanopsina.....	16
Fototransdução da Melanopsina.....	19
Relógios Periféricos	22
Os Aspectos Genéticos dos Relógios Biológicos.....	24
Modelo de Estudo: Células Embrionárias ZEM-2S de Danio rerio	28
<i>Objetivos</i>	31
<i>Material e Métodos</i>	33
Manutenção de Células ZEM-2S	34
Determinação das Melanopsinas por Ensaio Imunocitoquímico	34
Estimulação por Luz Azul.....	36
Inibição de componentes das vias de sinalização	36
Produção de óxido nítrico em resposta ao estímulo luminoso	37
Ativação de guanil ciclase por YC-1	38
Produção de AMPc em resposta ao estímulo luminoso	39
Silenciamento das Melanopsinas	40
Transfecção de Luciferase em Células ZEM-2S.....	42
Transfecção de DNA Plasmidial e siRNA por Nanotubos de Carbono	44
Extração de RNA Total	45
Reação de Transcriptase Reversa - RT-PCR.....	46
PCR quantitativo	47
<i>Resultados</i>	49
Detecção e Localização da Melanopsina em Células ZEM-2S.....	50
Fototransdução em Células ZEM-2S	53
Silenciamento das melanopsinas.....	70
Estabelecimento da Linhagem ZEM-2S per1:luc	79
<i>Discussão</i>	82
Melanopsina e Relógios Periféricos.....	83
Fototransdução	85
Crosstalks com a Via de Sinalização de Fosfoinositídeos	91
Transfecção em Células ZEM-2S e Silenciamento de Melanopsinas	99

<i>Conclusão</i>	103
<i>Resumo</i>	106
<i>Abstract</i>	109
<i>Bibliografia</i>	112

Notas

Nomenclatura adotada para genes e proteínas

Danio rerio - <https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines>

Xenopus laevis - <http://www.xenbase.org/gene/static/geneNomenclature.jsp>

Mus musculus - <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>

Drosophila sp - <http://flybase.org/wiki/FlyBase:Nomenclature>

Introdução

Muito antes do surgimento da vida, os ciclos de claro e escuro já se faziam presentes em nosso planeta. A presença de tais ciclos gerou e continua gerando, como consequência, o delineamento de dois momentos muito distintos dentro do período diário, ou seja, do período de 24 horas que compreende o dia como conhecemos. Um primeiro momento de alta incidência de radiação e elevadas temperaturas e um segundo momento de baixa incidência de radiação e temperaturas mais amenas. Se pensarmos no surgimento da vida e no período evolutivo subsequente a este, podemos concluir que radiação, na forma de luz visível e não-visível, e temperatura, representam um dos primeiros obstáculos à vida e uma das principais pressões seletivas a sua evolução. Tal assunção levou inclusive ao surgimento de teorias como a postulada por Pittendrigh (1993), conhecida como “fuga da luz”, a qual faz clara referência à associação entre fotorreceptores e osciladores endógenos vista em praticamente todos os organismos, cujo resultado adveio da co-evolução desses dois sistemas frente às pressões seletivas dos ciclos diários de luz e temperatura.

A prova inequívoca da importância da luz e da temperatura na evolução da vida pode ser expressa no fato de que, em organismos que vão desde bactérias até os mais complexos vertebrados, encontramos ritmos diários muito bem definidos, conhecidos como ritmos biológicos. Tal característica é fundamental à sobrevivência da maioria das espécies existentes, pois representa as adaptações e antecipações aos estresses proporcionados pelas variações dos ciclos diários, um fenômeno conhecido como arrastamento. Contudo, a seleção dessa característica no curso da evolução não seria possível caso não houvesse, nesses organismos, a capacidade de detectar variações ambientais adequadamente e, nesse aspecto, assume fundamental importância uma classe de proteínas, capaz de captar estímulos luminosos, conhecida como fotorreceptores.

INTRODUÇÃO

Todas as proteínas fotorreceptoras descritas na literatura podem ser agrupadas em um número limitado de famílias, com base na estrutura química do componente responsável pela absorção da luz, conhecido como cromóforo. Desse raciocínio derivam seis importantes famílias: as rodopsinas, os fitocromos, as xantopsinas, os criptocromos, as fototropinas e as *BLUF-proteins* (*blue-light using FAD proteins*) (Van Der Horst & Hellingwerf, 2004) (Fig. 1). No entanto, a fim de não exorbitar o escopo desse trabalho e não torná-lo demasiado longo, será abordada apenas a família que de fato possui relevante importância nas discussões subsequentes, no caso, as rodopsinas.

Photoreceptor Proteins van der Horst and Hellingwerf

Table 1. Well-Characterized Classes of Chromophores and Photosensor Families^a

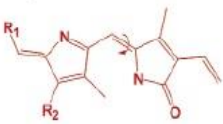
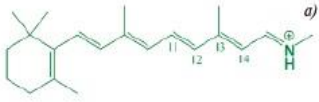
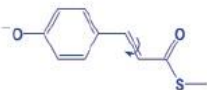
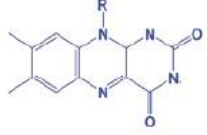
classes	CHROMOPHORES		PHOTOSENSOR FAMILY	PHOTOCHEMISTRY
	example	key structural element		
tetrapyrroles	phytochromobilin		Phytochromes	<i>trans</i> ↔ <i>cis</i>
polyenes	retinal		Rhodopsins	<i>trans</i> ↔ <i>cis</i>
	coumaric acid		Xanthopsins	<i>trans</i> ↔ <i>cis</i>
'aromatics'	flavin		Cryptochromes	electron transfer?
			Phototropin	cysteinylyl adduct formation
			BLUF proteins	proton transfer?

Fig. 1 – Divisão das seis famílias de proteínas fotorreceptoras de acordo com o seu cromóforo (adaptado de Van der Horst & Hellingwerf, 2004).

Rodopsinas

Opsinas são proteínas transmembrânicas com massa aproximada de 30-50 kDa. Elas agem, de modo geral, como detectores de luminosidade e estão distribuídas em todo o reino animal, embora proteínas semelhantes em estrutura, mas não em sequência de aminoácidos, sejam encontradas em outros reinos como Archaea, Fungi e Plantae (Spudich *et al.*, 2000; Sineshchekov *et al.*, 2002). Nestes últimos, as opsinas atuam como bombas iônicas ativadas por luz ou como detectores luminosos, porém não existe nenhuma evidência de que essas proteínas sejam estruturalmente relacionadas com as opsinas animais (Terakita, 2005) e, por esse motivo, não serão consideradas nas futuras discussões.

As opsinas são proteínas com sete domínios transmembrânicos associadas à proteína G. São compostas por uma porção protéica, denominada “opsina” e uma porção não protéica, conhecida como cromóforo. O cromóforo é um aldeído derivado da vitamina A, denominado retinal, ligado à porção protéica através de um resíduo de lisina extremamente conservado (K296) localizado na sétima alça transmembrânica. Tal é o nível de conservação desse resíduo, que sua presença ou ausência pode ser utilizada para definir se uma nova proteína fotossensível pertence à família das rodopsinas ou não (Terakita, 2005). O cromóforo liga-se à sétima alça transmembrânica pela base de Schiff, na qual o átomo de nitrogênio do resíduo de lisina (K296) forma uma dupla ligação com o átomo de carbono do retinal. A base de Schiff é uma ligação relativamente instável e sua estabilização é dada pela presença de um contra íon, resíduo de aminoácido carregado negativamente. O contra íon é uma característica fundamental das opsinas, sendo inclusive utilizado na diferenciação entre opsinas de invertebrados e opsinas de vertebrados: nestas é composto pelo glutamato na posição 113 (E113),

enquanto naquelas ocorre a substituição do glutamato e a posição altamente conservada E181 serve como contra íon (Fig. 2) (Terakita, 2005).

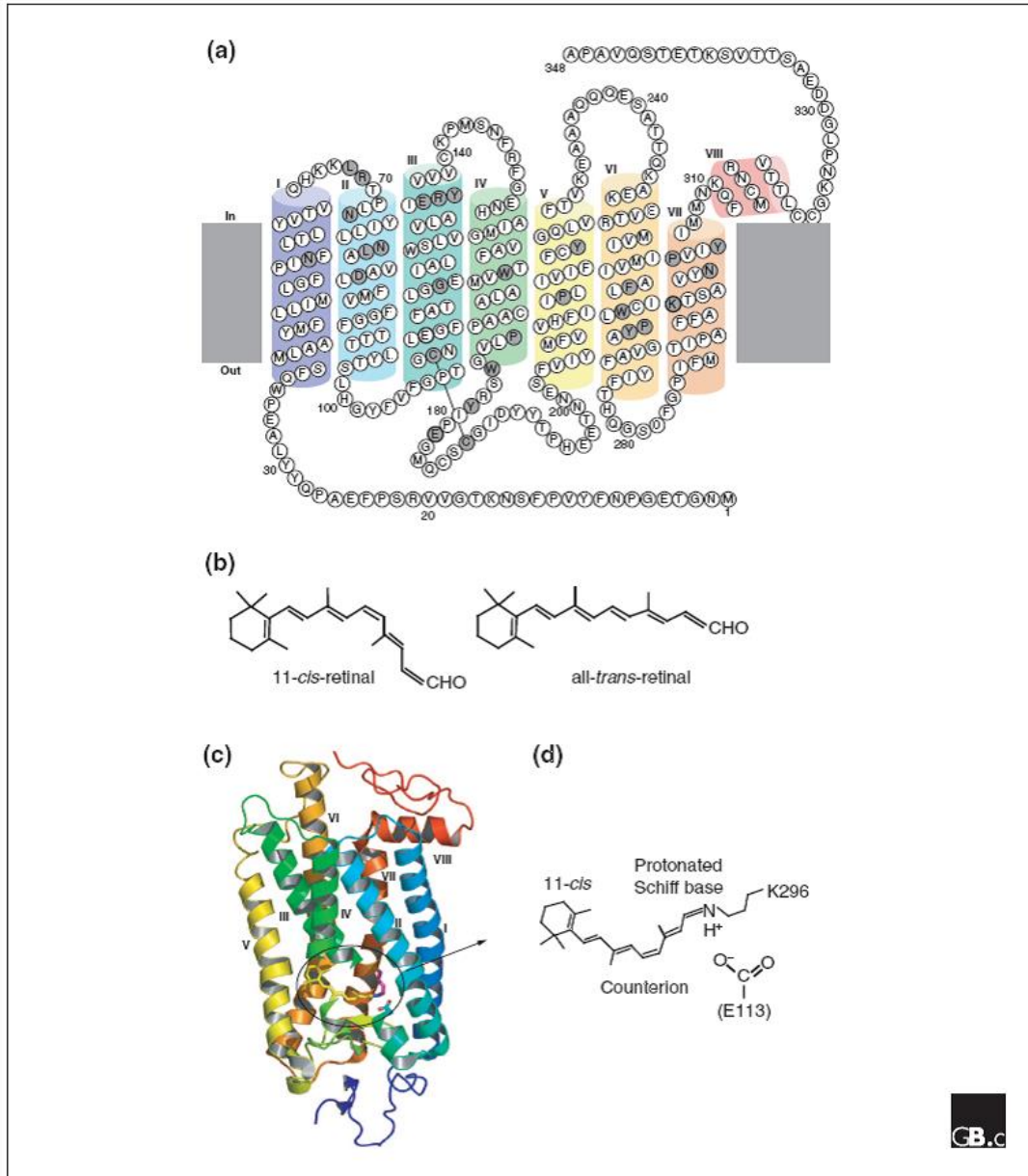


Fig. 2 – Estrutura das opsinas. (a) Representação dos sete domínios transmembrânicos e sequência de aminoácidos; (b) Porção não protéica das opsinas (cromóforo), antes (11-*cis*-retinal) e após (all-*trans*-retinal) a isomerização; (c) Representação da estrutura tridimensional das opsinas; (d) Representação esquemática da ligação da base de Schiff ao resíduo de aminoácido conservado K296 e o contra íon necessário à sua estabilização (adaptado de Terakita et al., 2005).

Quando analisamos o fenômeno da detecção luminosa realizada pelas opsinas podemos observar que o cromóforo assume um papel central no funcionamento desse receptor. A molécula ativa presente no cromóforo de todas as opsinas é o retinal, e é através dele que ocorre a interação do fóton de luz com o receptor. Dessa maneira, quando um fóton de luz é absorvido pela molécula de retinal, a energia absorvida é capaz de provocar a isomerização do 11-*cis*-retinal em all-*trans*-retinal, levando à mudança de conformação da opsina, ativação da proteína G acoplada e ao consequente desencadeamento da via de sinalização.

A isomerização do retinal é outro ponto de diferenciação entre opsinas de vertebrados e invertebrados. Nos vertebrados, a transformação de 11-*cis*-retinal em all-*trans*-retinal leva ao desacoplamento dessa molécula da porção protéica, sendo considerada, portanto monoestável, enquanto que nas opsinas de invertebrados o cromóforo, mesmo após a isomerização, permanece ligado à proteína, sendo considerado assim biestável. Durante muito tempo monoestabilidade e biestabilidade foram utilizados como critérios de diferenciação entre opsinas de vertebrados e invertebrados, todavia experimentos recentes têm demonstrado que esse conceito não deve mais ser aplicado, pois algumas opsinas de vertebrados, como por exemplo, a melanopsina, apresentam as duas formas de estabilidade do cromóforo (Davies *et al.*, 2011).

Atualmente existem milhares de opsinas identificadas que podem ser classificadas em oito grupos grosseiramente distintos (Fig. 3): opsinas acopladas à proteína G_t, presentes em fotopigmentos visuais e não visuais de vertebrados; opsinas acopladas à proteína G_q, presentes em fotopigmentos visuais de invertebrados e na melanopsina; opsinas de invertebrados acopladas à proteína G_o; Opn3 acoplada à proteína G_i/G_o (*teleost multiple tissue opsin* (tmt) e encefalopsina); Opn5 acoplada à

INTRODUÇÃO

proteína G_i (neuropsina); opsinas de cnidários acopladas à proteína G_s ; outros dois grupos considerados como fotoisomerasas: retinocromo e peropsina (Koyanagi & Terakita, 2014). Os seis primeiros grupos são reconhecidamente proteínas fotorreceptoras enquanto que os membros dos dois últimos utilizam a luz para reisomerizar o cromóforo de fotopigmentos bistáveis, ou seja, transformar o *all-trans*-retinal em *11-cis*-retinal, para que este possa ser utilizado em um novo ciclo visual. Apesar do grande número de opsinas identificadas atualmente, é curioso o fato de que todas elas atuam através de, apenas, duas vias de sinalização distintas e aparentemente muito bem conservadas durante a evolução. Essas vias são características de receptores rabdoméricos (invertebrados) e receptores ciliares (vertebrados) e serão abordadas com maiores detalhes adiante.

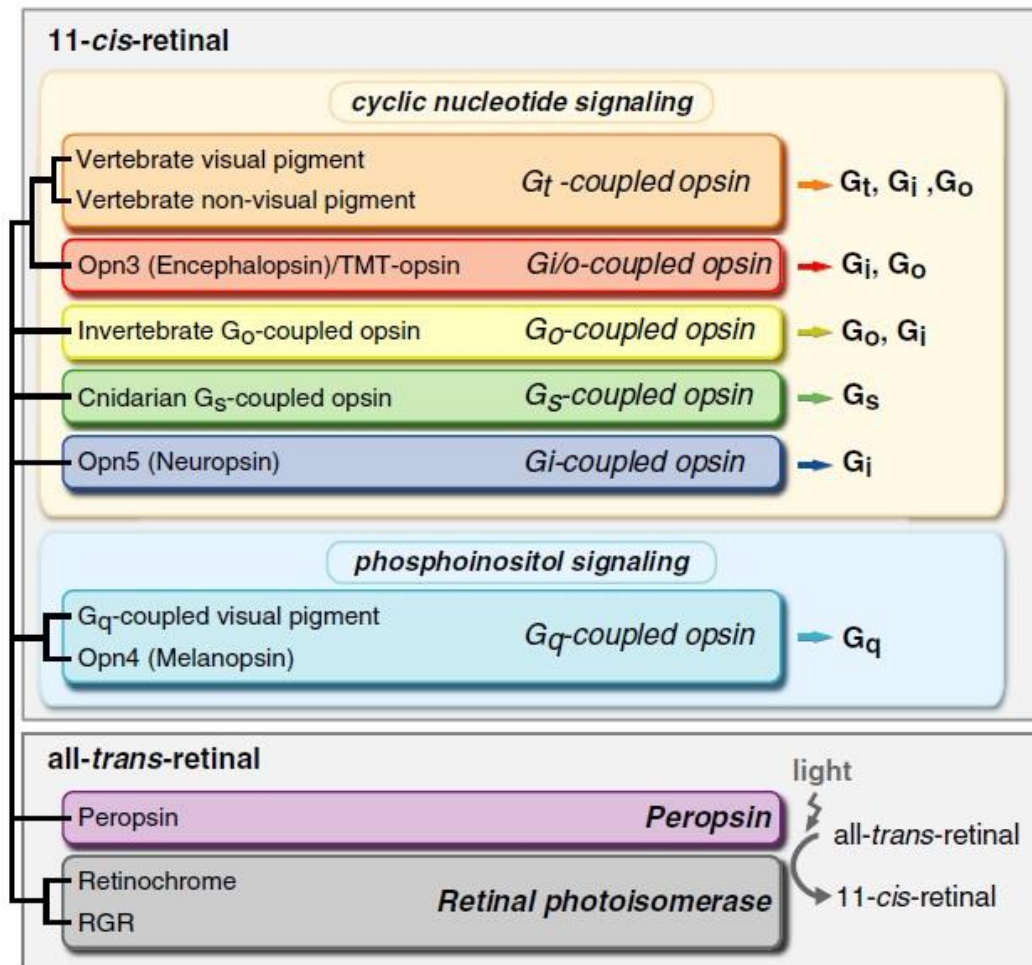


Fig. 3 - Divisão das opsinas em 8 grupos. Os seis primeiros são proteínas fotorreceptoras, ligadas ao 11-*cis*-retinal e atuam através de duas vias de sinalização: fosfoinositídeos e nucleotídeos cíclicos. Os dois últimos grupos são conhecidos como fotoisomerases, ligam-se ao all-*trans*-retinal para, na presença de luz, convertê-lo em 11-*cis*-retinal (adaptado de Koyanagi & Terakita, 2014).

Melanopsina: Contexto Histórico

Os ritmos biológicos vêm sendo estudados desde o século XVIII e a primeira pesquisa realizada nesse sentido foi feita pelo pesquisador francês Jean Jaques Ortous de Marian em 1729. Desde então, uma série de estudos acabou por demonstrar características básicas dos ritmos biológicos, como por exemplo, compensação à temperatura e o seu período aproximado de 24 horas.

O estudo dos ritmos biológicos só ganhou o *status* de ciência após 1960 com a realização do primeiro congresso sobre ritmos biológicos, chamado “*Cold Spring Harbor Symposium on Biological Clocks*”. Nessa época já havia um considerável conhecimento a respeito dos ritmos biológicos, principalmente com relação a sua característica endógena, responsável pela manutenção dos ritmos mesmo na ausência de pistas externas. Essa característica trouxe à tona a hipótese da existência de um relógio interno, um oscilador central onde todos esses ritmos seriam gerados. Em 1972, dois estudos independentes chegaram a um provável candidato a relógio central em mamíferos. Friedrich Stephan e Irvin Zucker, através de lesões pontuais no cérebro de ratos, chegaram a uma estrutura conhecida como núcleo supraquiasmático (NSQ). Robert Moore e Nicholas Lenn chegaram à mesma estrutura, porém utilizando para isso uma metodologia baseada na injeção de aminoácidos radioativos nos olhos de ratos. Essa metodologia, além de evidenciar os NSQs como oscilador central de mamíferos, ainda demonstrou o caminho percorrido pela luz até alcançá-los, caminho esse que conhecemos hoje como trato retinohipotalâmico (RHT) (para revisão ler Foster & Kreitzman, 2004). Apesar da clara evidência que esse dois trabalhos trouxeram em relação ao relógio central de mamíferos, estes não forneceram provas suficientes para sua determinação. A estrutura do relógio central possui três componentes básicos: (i) Aferências, estruturas responsáveis por trazer os estímulos e pistas externas até o

relógio central; (ii) Relógio central, responsável pela geração dos ritmos e; (iii) Eferências, responsáveis por levar os estímulos desencadeados pelo relógio central ao restante do corpo. Nesse caso, lesões provocadas tanto no relógio central quanto nas eferências, levam a quadros idênticos de arritmicidade, e esse foi o grande questionamento na época, se os NSQs eram de fato o relógio central de mamíferos ou apenas uma eferência do sistema.

Somente em 1990, Ralph e colaboradores, através de uma linhagem de hamsters com mutação *Tau*, conseguiram determinar de forma irrefutável que os NSQs eram de fato o relógio central de mamíferos. Nesses animais, o período circadiano, que normalmente era de 24,1 horas, passou a ser de 22 horas em animais com heterozigose e 20 horas quando em homozigose. A partir desse fato, os pesquisadores realizaram lesões nos NSQs dos animais selvagens (24,1h) e dos animais com homozigose (20h), e transplantaram os NSQs de forma cruzada entre as linhagens. Os animais transplantados assumiram o ritmo dos NSQs transplantados e, dessa forma, foi estabelecido o NSQ como relógio central de mamíferos. A determinação do relógio central de mamíferos foi um marco na cronobiologia, contudo ainda restava uma estrutura para ser determinada nesse sistema, e é nesse contexto que a melanopsina começa a ganhar destaque.

Na década de 90, iniciou-se a busca pelo fotorreceptor responsável pela captação luminosa e conseqüentemente pela sincronização dos ritmos biológicos aos ciclos diários. Nesse quesito, a pesquisa em mamíferos foi de grande utilidade, pois nestes todas as estruturas fotorreceptoras se concentram em um único órgão, o olho (Foster, 1998). O início dessa busca deu-se com a utilização de uma linhagem de camundongos com homozigose para degeneração de retina (rd/rd) nos quais, embora houvesse a completa degeneração dos bastonetes, aproximadamente 5% dos cones remanesciam por mais de 18 meses (Carter-Dawson *et al.*, 1978). Apesar da enorme perda de

fotorreceptores, esses animais apresentavam respostas circadianas indistintas quando comparadas a de animais normais (Foster *et al.*, 1991). Esses dados juntamente com estudos de degeneração de retina em humanos (Czeisler *et al.* 1995) levantaram a hipótese da existência de um novo fotorreceptor presente na retina de mamíferos. Contudo, a população de cones remanescente na retina dos camundongos rd/rd (~5%) ainda poderia ser a responsável pela sincronização desses animais (Foster *et al.*, 1993). Essa questão só foi resolvida com o desenvolvimento de uma linhagem de camundongos nocautes para cones e bastonetes (rd/rd cl). Esses animais, apesar de completamente desprovidos de cones e bastonetes, ainda eram capazes de se sincronizar aos ciclos de claro e escuro com perfeição (Freedman *et al.*, 1999). A partir desse momento ficou evidente a existência de um terceiro fotorreceptor na retina de mamíferos, o qual era responsável pela sincronização desses animais aos ciclos circadianos. Três anos depois, dois trabalhos independentes e lançados praticamente de forma simultânea vieram a demonstrar quais eram esses fotorreceptores (Berson *et al.*, 2002) e qual o fotopigmento presente nessas células (Provencio *et al.*, 2002).

O fotopigmento melanopsina foi primeiramente descoberto em melanóforos de *Xenopus leavis* (Provencio *et al.*, 1998) (Fig. 4). Desde sua descoberta, a melanopsina surgiu como um possível candidato a intermediar os fenômenos de sincronização nos vertebrados, pois foi encontrada não apenas na pele e cérebro dessa rã, mas também em sua retina. Em 2002, Provencio e colaboradores verificaram a presença da melanopsina num pequeno subgrupo de células ganglionares da retina de mamíferos, grupo este muito semelhante ao identificado por Berson e colaboradores no mesmo ano. Essas células representam aproximadamente 2,7% do total de células ganglionares (Sekaran *et al.*, 2003) e têm como característica uma capacidade fotossensível intrínseca e, por esse motivo, foram denominadas células ganglionares retinianas intrinsecamente

fotossensíveis (ipRGCs) (Fig. 5). Devido a semelhança entre a localização da melanopsina e a distribuição das ipRGCs diversos estudos se sucederam no intuito de verificar se a melanopsina era de fato o fotopigmento responsável pela sincronização em mamíferos. Destes podemos destacar um estudo (Panda *et al.*, 2003) o qual, através do estabelecimento de uma linhagem de camundongos triplo nocautes (*rd/rd Opn4^{-/-}*), demonstrou de forma muito elegante que a melanopsina é essencial a sincronização desses animais, pois a sua remoção levou a completa perda das respostas referentes aos estímulos luminosos (Fig. 6). Contudo, somente a remoção do gene *Opn4* provocou apenas uma atenuação na resposta desses camundongos aos ciclos circadianos (Ruby *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2003; Panda *et al.*, 2003), evidenciando que cones e bastonetes podem parcialmente compensar a perda da fotossensibilidade das ipRGCs mas que em contra partida, estas podem compensar completamente a perda de cones e bastonetes (Hankins *et al.*, 2007).

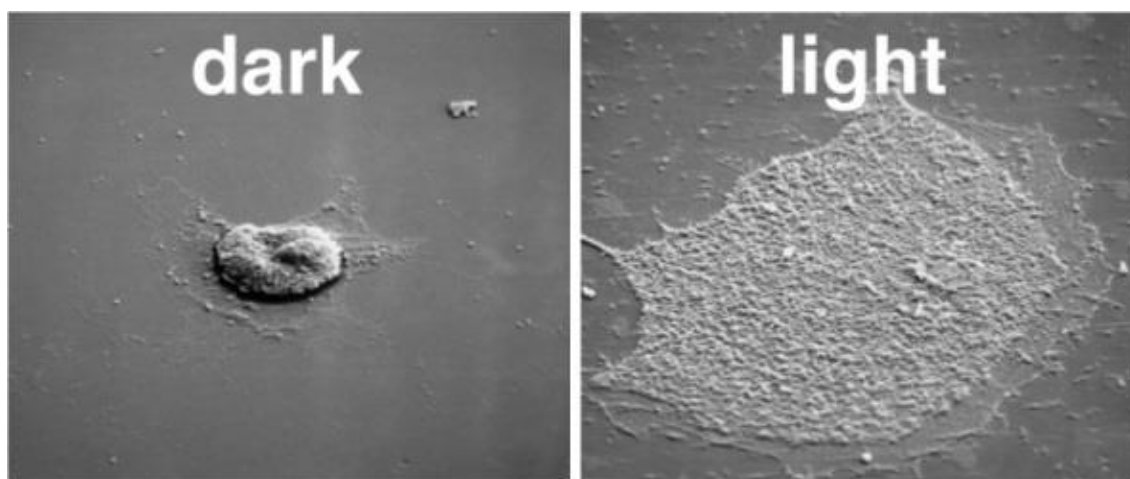


Fig. 4 – Melanóforos fotossensíveis de *Xenopus laevis*. Em *dark*, célula submetida ao escuro constante, com agregação dos grânulos de melanina ao redor do núcleo. Em *light*, célula submetida ao estímulo luminoso e a consequente dispersão dos grânulos de melanina pelo citoplasma. Imagem gentilmente cedida por Mark D. Rollag.

Depois de comprovado o envolvimento da melanopsina nas respostas circadianas de mamíferos, diversos estudos foram realizados utilizando sua expressão heteróloga em diferentes modelos. A expressão heteróloga da melanopsina tornou fotossensível vários tipos celulares como células COS (Newman *et al.*, 2003), oócitos de *Xenopus* (Panda *et al.*, 2005), células Neuro-2A (Melyan *et al.*, 2005) e células HEK-293 (Qiu *et al.*, 2005). Em conjunto, esses experimentos comprovaram que o gene da melanopsina era capaz de expressar um fotopigmento completamente funcional e encerraram os possíveis questionamentos da atuação da melanopsina como uma fotoisomerase (Foster & Bellingham, 2002). Muito embora com seu papel devidamente definido em mamíferos, a melanopsina ainda levantaria uma série de questões, das quais muitas seriam respondidas e outras tantas permanecem ainda por responder.

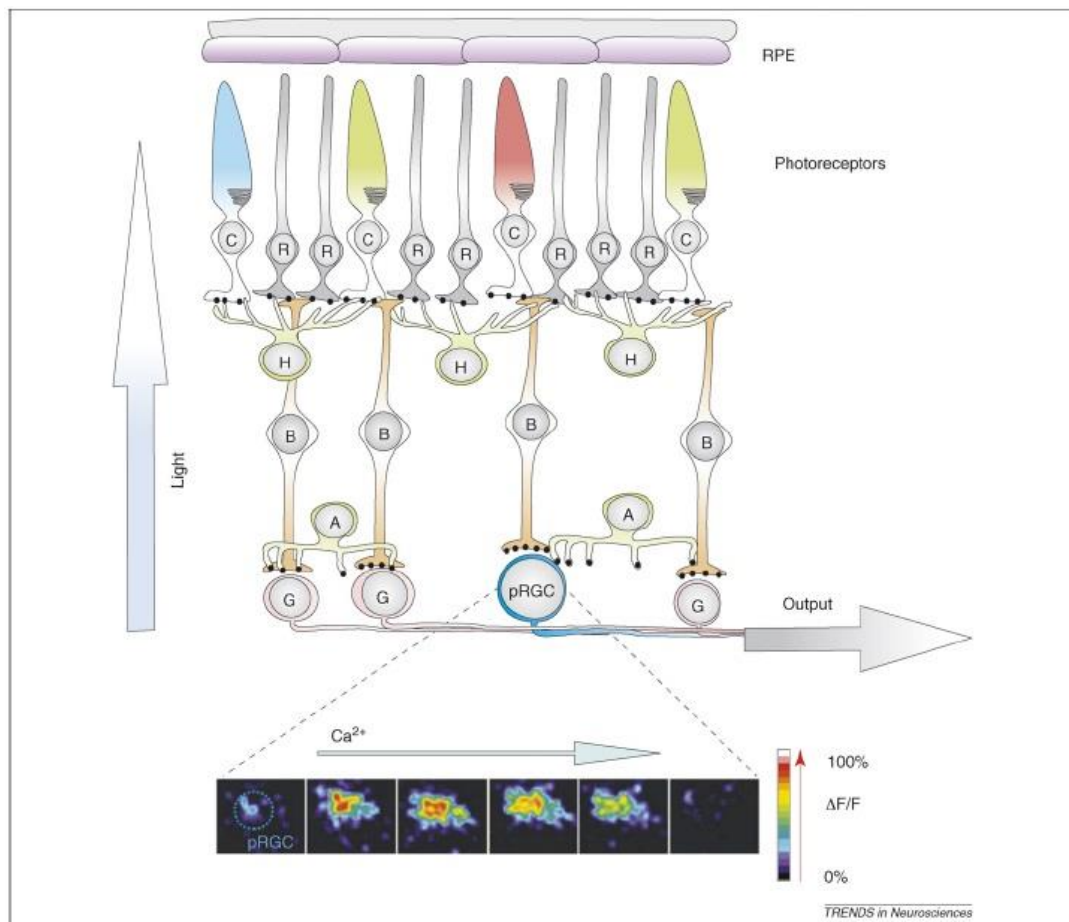


Fig . 5 – Representação esquemática de retina de mamíferos. RPE, epitélio pigmentar da retina. C e R, cones e bastonetes respectivamente. H, células horizontais. B, células bipolares. A, células amácrinas. G, células ganglionares. pRGC, células ganglionares fotossensíveis. Output, nervo óptico formado pelos axônios das células ganglionares (adaptado de Hankins *et al.*, 2007). Porção inferior, experimento realizado em camundongos (*rd/rd cl*) demonstrando que um subgrupo de células ganglionares apresenta aumento de cálcio citoplasmático quando estimulado por luz (pRGCs) (Sekaran *et al.*, 2003).

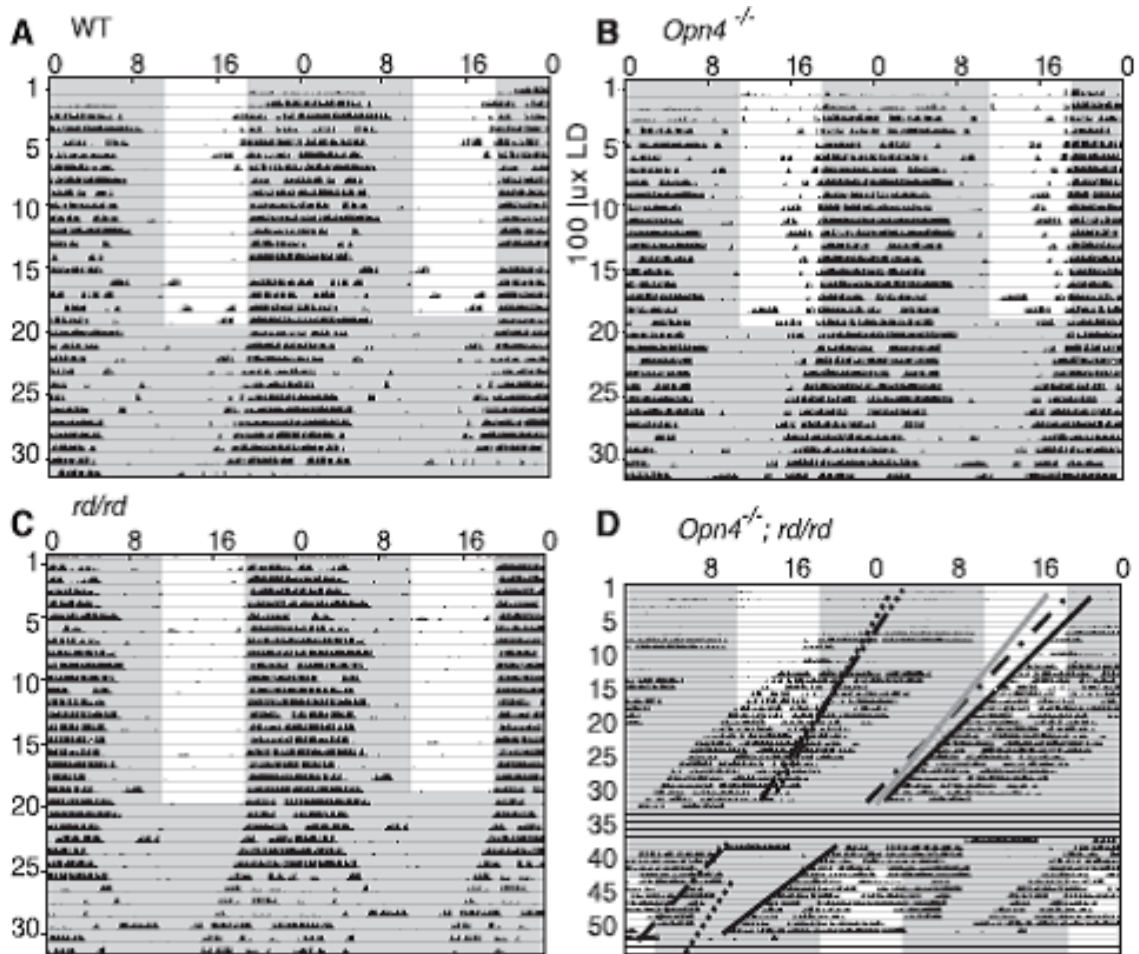


Fig. 6 – Determinação do papel da melanopsina na regulação dos ritmos circadianos em mamíferos. Registro da atividade locomotora (actograma) de: WT, camundongos normais; *Opn4^{-/-}*; camundongos com remoção do gene da melanopsina; *rd/rd*, camundongos com degeneração de retina (ausência de cones e bastonetes); *rd/rd Opn4^{-/-}*, camundongos triplo nocautes (cones, bastonetes e melanopsina) (adaptado de Panda *et al.*, 2003).

Estrutura da Melanopsina

A melanopsina é uma proteína com sete domínios transmembrânicos, acoplada a proteína G, que se liga covalentemente ao cromóforo 11-*cis*-retinal pela base de Schiff. Tais características a enquadram com perfeição dentro da família das rodopsinas, mas

análises mais detalhadas sobre sua estrutura revelariam que esse fotopigmento era mais complexo do que se imaginava.

Tão logo a melanopsina foi descoberta, uma das primeiras características observadas foi que ela possuía uma maior semelhança com opsinas de invertebrados do que com opsinas de vertebrados. A sequência deduzida de aminoácidos de sua estrutura apresentou uma similaridade de 39% quando comparada a rodopsina de polvo, enquanto que, quando comparada a uma opsina típica dos vertebrados, apresentou apenas 30% de homologia (Provencio *et al.*, 1998). As semelhanças com opsinas de invertebrados não residem apenas em sua sequência de aminoácidos, mas se estendem a domínios tidos como de fundamental significância. Primeiro, a melanopsina possui uma substituição na posição do contra íon glutamato (E113) de opsinas de vertebrados por tirosina (Tyr-113); conseqüentemente foi sugerido que o glutamato na posição 181 (E181) serviria como contra íon para estabilizar a ligação da base de Schiff (Yan *et al.*, 2003). Segundo, a melanopsina possui uma inserção na terceira alça citoplasmática, ausente em opsinas de vertebrados, a qual é responsável pela determinação da família de proteína G que será ativada pela opsina. E terceiro, a melanopsina possui uma longa cauda citoplasmática (C-terminal), contendo 14 possíveis sítios de fosforilação, os quais sugerem que o estado de ativação da melanopsina pode ser regulado por quinases (Provencio *et al.*, 1998).

Estudos posteriores demonstraram a sua presença na retina de todas as classes de vertebrados (Provencio *et al.*, 1998; Provencio *et al.*, 2002; Bellingham *et al.*, 2002; Chaurasia *et al.*, 2005; Frigato *et al.*, 2006). Até 2006, acreditava-se que a única melanopsina encontrada nas diferentes classes de vertebrados fosse ortóloga à originalmente encontrada em *Xenopus*. Porém, as comparações realizadas entre as sequências de aminoácidos deduzidas para essa opsina (Bellingham *et al.*, 2002;

Bellingham & Foster, 2002) mostraram que a semelhança das sequências entre as diferentes espécies analisadas era muito menor (em torno de 55%) quando comparada à de famílias de opsinas mais tradicionais como as encontradas em cones e bastonetes (85% de semelhança entre rodopsinas de humanos e *Xenopus*).

Diante dessa marcante observação, várias hipóteses surgiram para justificar essa aparente falta de semelhança entre as melanopsinas de diferentes classes. Em 2006, um estudo realizado por Bellingham e colaboradores demonstrou que vertebrados não mamíferos possuem dois genes codificadores de melanopsina, denominados *Opn4m* (*mammalian-like*) e *Opn4x* (*Xenopus-like*). As comparações realizadas dentro dos grupos *Opn4m* e *Opn4x* demonstraram uma semelhança relativamente alta, maior que 66%, enquanto que as semelhanças entre os grupos foram consideravelmente menores, em torno de 55%. Curiosamente, em mamíferos foi encontrado apenas um gene que codifica a melanopsina (*Opn4m*), e a explicação mais aceita atualmente é que a perda do gene *Opn4x* ocorreu logo no início da evolução dessa classe, num período conhecido como “gargalo noturno”, o qual levou a uma significativa redução das estruturas fotorreceptoras em mamíferos.

Apesar desses dados parcialmente justificarem a aparente variação interespecífica da melanopsina, eles trouxeram consigo a necessidade de uma comparação funcional mais detalhada entre os dois genes, *Opn4m* e *Opn4x*, para esclarecer a aparente redundância da existência de duas melanopsinas em vertebrados não mamíferos. Essa situação se torna ainda mais complexa quando levamos em conta animais como o peixe teleóteo *Danio rerio*, onde foram encontrados não dois, mas cinco genes que codificam a melanopsina (Davies *et al.*, 2011).

Fototransdução da Melanopsina

Depois que a melanopsina foi identificada na retina de todas as classes de vertebrados, a divisão até então existente das opsinas, em opsinas de vertebrados e opsinas de invertebrados, começou a ser questionada, pois, como mencionado anteriormente, essa opsina possui todas as características de um fotopigmento de invertebrado. Atualmente, os termos que melhor descrevem esta divisão são baseados na origem das células fotorreceptoras. Logo, fotopigmentos presentes em fotorreceptores rabdoméricos (invertebrados) são denominados opsinas rabdoméricas, enquanto fotopigmentos presentes em fotorreceptores ciliares (vertebrados), opsinas ciliares. A presença de opsinas rabdoméricas na retina de vertebrados se justifica pelo fato de que as células ganglionares da retina, as células horizontais e as células amácrinas terem evoluído a partir de um fotorreceptor ancestral rabdomérico, diferente de cones e bastonetes, os quais são derivados de um precursor ciliado comum (Arendt *et al.*, 2003).

As vias de transdução em fotorreceptores rabdoméricos e ciliares já estão bem descritas na literatura. A via de sinalização em fotorreceptores rabdoméricos foi estudada principalmente em drosófilas (Hardie & Raghu, 2001) e, de maneira geral, essa cascata de sinalização envolve a ativação de proteína G_q/G_{11} , ativação de fosfolipase C (PLC) e subsequente abertura de canais de potencial receptor transitório subtipo C (TRPCs), resultando na despolarização da membrana celular. Já o mecanismo de fotorrecepção visual em vertebrados (fotorreceptores ciliares) é bem diferente, envolvendo a ativação da transducina (G_t), fosfodiesterase de GMPc, hidrólise de GMPc, fechamento dos canais ativados por nucleotídeos cíclicos (CNG) e a conseqüente hiperpolarização da membrana plasmática (Hardie & Raghu, 2001; Arshavsky *et al.*, 2002).

As características apresentadas pela melanopsina imediatamente sugeriram um forte paralelo com o sistema de fototransdução de invertebrados. Alguns dos estudos essenciais na determinação da melanopsina como um fotopigmento funcional também ajudaram a elucidar a sua via de sinalização. Em oócitos de *Xenopus* foi demonstrado que a ativação de melanopsina se dá através da proteína $G_{q/11}$ (Panda *et al.*, 2005). Em células HEK293 (*human embryonic kidney cell line*) expressando melanopsina humana, a sinalização por luz evoca a ativação de fosfolipase C, e há aumento de cálcio citoplasmático proveniente de estoques intracelulares (Qiu *et al.*, 2005; Kumbalasisiri *et al.*, 2006). Os estudos em células Neuro-2a evidenciaram que a melanopsina é um fotopigmento biestável (Melyan *et al.*, 2005), o que está de acordo com a localização e o papel desempenhado por ela nos vertebrados. O primeiro evento na fotoativação da melanopsina é a fotoisomerização do retinaldeído do cromóforo de 11-*cis*-retinal para all-*trans*-retinal. Em células fotorreceptoras como cones e bastonetes, o 11-*cis*-retinal provém de várias etapas enzimáticas, processo conhecido como ciclo visual, no qual ele é regenerado a partir de all-*trans* nos segmentos externos do fotorreceptor. No entanto, enzimas chave dessa via estão no epitélio pigmentar da retina (EPR), essencial, portanto, para essa regeneração. Como a melanopsina é encontrada nas camadas mais superficiais da retina de mamíferos, distante do EPR, é improvável que a regeneração do cromóforo 11-*cis*-retinal para a melanopsina ocorra no EPR. Possivelmente, *in vivo*, as células ganglionares regeneram 11-*cis* da melanopsina de forma independente de outros tipos celulares (Tu *et al.*, 2006). Isso estaria de acordo com o fato de que fotorreceptores rhabdoméricos regeneram seu cromóforo *in situ*, processo ativado por um comprimento de onda diferente do estímulo para fotorrecepção. Também explicaria como melanóforos de *Xenopus laevis* e células ZEM-2S de *Danio rerio* regeneram seu

cromóforo quando em cultura pura do mesmo tipo celular responsável pela fotorrecepção.

Um estudo que descreveu com riqueza de detalhes a via de transdução da melanopsina foi realizado em nosso laboratório com melanóforos fotossensíveis de *Xenopus* (Isoldi *et al.*, 2005). Diferentemente do que havia sido feito em modelos anteriores, onde a melanopsina era expressa heterologicamente, em melanóforos de *Xenopus* a melanopsina é expressa naturalmente, de modo que eventuais questionamentos sobre o correto funcionamento desta opsina, não seriam fundamentados. Esse estudo demonstrou que a fotodispersão dos melanossomos é iniciada pela ativação fótica da melanopsina. A PLC é então ativada, provavelmente via proteína Gq, e aumenta a produção de inositol trisfosfato (IP₃) dentro da célula através da hidrólise de um fosfolípide presente na membrana celular (fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato). O aumento de IP₃ gera um aumento da concentração de Ca⁺² intracelular que, conseqüentemente, ativa proteína quinases dependentes de Ca⁺² (PKC), as quais são responsáveis pela dispersão dos melanossomos. Porém, nesse estudo também foi relatado um aumento de GMPc intracelular frente ao estímulo luminoso, o qual permanece sem explicação até o momento, pois o bloqueio desse aumento não afeta a resposta de dispersão melanossômica. Esse aumento de GMPc pode refletir um *crosstalk* entre vias de sinalização e, somado ao fato da posterior descoberta de que a melanopsina é expressa através de dois genes diferentes em vertebrados não mamíferos, *Opn4m* e *Opn4x* (Bellingham *et al.*, 2006), deu origem a uma nova linha de investigação, a qual pretende avaliar possíveis diferenças entre as vias de sinalização das proteínas produzidas pelos genes *Opn4m* e *Opn4x*.

Relógios Periféricos

Os estudos dos relógios periféricos tiveram como base a descoberta de que os ritmos circadianos estão enraizados no nosso código genético (Konopka & Benzer, 1971). Os ritmos observados nos organismos são gerados por genes conhecidos como genes do relógio, estes não são expressos apenas nos relógios centrais ou em determinados grupos de organismos, mas estão presentes e são expressos na maioria dos organismos vivos e na maioria de suas células (Huang *et al.*, 2011).

Diversos estudos demonstraram que a presença desses genes nas células e em tecidos periféricos permitia sua sincronização independentemente do relógio central. Em drosófilas, foi demonstrado que fragmentos do corpo mesmo quando separados são capazes de se sincronizar aos ciclos de claro e escuro (Plautz & Kay, 1997), assim como no peixe teleosteo *Danio rerio*, no qual tecidos e órgãos podem ser sincronizados por luz (Whitmore *et al.*, 2000). Experimentos em cultura celular também foram de grande valia, pois demonstraram que mesmo células em cultura podem ser sincronizadas por diversos fatores como luz (Whitmore *et al.*, 2000; Pando *et al.*, 2001; Farhat *et al.*, 2009), temperatura (Buhr *et al.*, 2010) e choque de soro (Balsalobre *et al.*, 1998). E até mesmo tecidos de mamíferos, quando isolados em cultura, podem ser sincronizados por estímulos de temperatura (Buhr *et al.*, 2010).

Considerados isoladamente, osciladores centrais e periféricos possuem características praticamente idênticas quanto ao mecanismo que leva a sua sincronização (isto é, os genes responsáveis pela geração dos ritmos). A diferença preponderante entre esses dois sistemas está no fato de que, quando isolados em cultura, os osciladores centrais mantêm a expressão rítmica dos genes de relógio, enquanto que os osciladores periféricos não são capazes de sustentar esse ritmo, perdendo a expressão rítmica desses genes dentro de alguns dias (Yamasaki *et al.*, 2000). Deve-se ressaltar

que, de forma bastante curiosa, quando as células dos NSQs são dissociadas e colocadas em cultura, elas agem de forma completamente independente, perdendo a sincronização (Welsh *et al.*, 1995) como se fossem osciladores periféricos e revelando que a associação entre essas células é de extrema importância para a manutenção da robustez de seu ritmo.

O estudo dos relógios periféricos é relativamente novo e só recentemente se estabeleceu como um campo de estudo. A grande questão atualmente é como se dá especificamente a interação entre o oscilador central e os osciladores periféricos, e de que maneira estes últimos podem influenciar na geração e manutenção dos ritmos nos organismos. Até algum tempo atrás, acreditava-se na hierarquia do oscilador central sobre o oscilador periférico. No entanto, vários laboratórios demonstraram a independência do oscilador em muitos tecidos (Yamazaki *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2002; Bartell *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2005; Davidson *et al.*, 2005), que provavelmente contêm elementos sincronizadores (Yoo *et al.*, 2004). Como exemplo clássico de independência dos osciladores periféricos em relação aos osciladores centrais, temos a sincronização através da alimentação que, ao longo dos anos, vem fornecendo evidências da existência de um oscilador sincronizado pela alimentação (FEO – *food entrainable oscillator*) independente dos NSQs de mamíferos (para revisão ler Blum *et al.*, 2012).

O que torna ainda mais interessante a discussão sobre os relógios periféricos é que, em vertebrados não mamíferos, existe uma extensa gama de fotorreceptores espalhados por todo o corpo (Foster & Soni, 1998). Essa é uma forte evidência da importância dos osciladores periféricos e suscita questões a respeito da reciprocidade entre os osciladores circadianos. Nesse sentido ganham importância os fotorreceptores e inclusive a melanopsina, que já foi detectada nos relógios periféricos de *Gadus morhua*

(Bellingham *et al.*, 2006), *Xenopus laevis* (Provencio *et al.*, 1998) e *Gallus gallus* (Lima *et al.*, 2006), uma vez que são essenciais na sincronização dos osciladores periféricos por luz. Assim um estudo mais detalhado de como esses fotopigmentos intermedeiam os processos de sincronização, a fim de se entender como os sinais desencadeados por eles alteram a expressão dos genes do relógio, é importante para determinar o correto funcionamento dos osciladores periféricos e estabelecer a sua função no organismo como um todo.

Os Aspectos Genéticos dos Relógios Biológicos

Como já mencionado, o primeiro experimento que demonstrou que os ritmos biológicos estavam codificados no DNA foi realizado em drosófilas em 1971 (Konopka & Benzer, 1971). Drosófilas possuem o ritmo circadiano próximo de 24 horas; através da indução de mutações genéticas por agentes químicos esses pesquisadores conseguiram modificar o período desses ritmos e determinar que o gene responsável por essa alteração se encontrava localizado no cromossomo X. Esse primeiro gene identificado foi nomeado de *Per* (*period*) por ser o responsável pela determinação do período do ritmo nesses animais. Somente anos depois da descoberta desse gene, após o desenvolvimento de ferramentas mais modernas de biologia molecular, é que o funcionamento dos chamados genes do relógio começou a ser desvendado.

O mecanismo genético do relógio circadiano está baseado em alças de retroalimentação positiva e negativa, envolvendo produtos de genes cíclicos que podem controlar sua própria síntese através da regulação positiva e negativa de genes e proteínas (Dunlap, 1999; Shearman *et al.*, 2000; Okamura *et al.*, 2002) (Fig. 7). Em mamíferos, a alça positiva é representada pelos genes *Clock* e *Bmal1* (*brain and muscle Arnt-like protein 1*), cujas proteínas formam um heterodímero CLOCK:BMAL1, que

atua como fator de transcrição para a expressão dos genes *Per1*, *2 e 3*, *Cry1 e 2* (Yamaguchi *et al.*, 2000). O estímulo à expressão dos genes *Per* e *Cry* dá início à segunda alça de retroalimentação, dessa vez negativa, na qual as proteínas PER e CRY formam oligômeros com uma caseína quinase, que são fosforilados e transportados do citoplasma para o núcleo, onde bloqueiam a sua própria transcrição ao interagirem com o heterodímero CLOCK:BMAL1 inibindo sua ação como fator de transcrição (Young & Kay, 2001; Okamura *et al.*, 2002).

Entretanto, não são apenas estes genes que participam da regulação dos ritmos celulares. O dímero CLOCK:BMAL1 ativa uma segunda alça de retroalimentação composta pelos genes *Rev-erb α/β* e *Ror α/β* que agem coordenadamente com os genes descritos acima. As proteínas ROR α/β e REV-ERB α/β atuam sobre a mesma região do promotor de *Bmal1*, *Retinoic acid-related Orphan receptor Response Element* (RORE), de forma competitiva, na qual o primeiro inicia a transcrição de *Bmal1*, e o segundo a inibe (Buhr & Takahashi, 2013). As proteínas REV-ERB α/β aumentam com a indução da transcrição de CLOCK:BMAL1 e vão para o núcleo, ligando-se ao promotor de *Bmal1* e reprimindo sua transcrição (Preitner *et al.*, 2002). Uma alta expressão de REV-ERB α/β é capaz de inibir a ação de ROR α/β (Guillaumond *et al.*, 2005), dessa maneira, quando a proteína REV-ERB está ausente, o gene *Bmal1* é novamente transcrito com o auxílio de ROR α/β , podendo formar novamente o fator de transcrição CLOCK:BMAL1, reiniciando um novo ciclo circadiano. Assim como os genes *Rev-erb α/β* e *Ror α/β* , a enzima caseína quinase 1 ϵ (CK1 ϵ) é um elemento essencial na regulação dos genes de relógio. A CK1 ϵ é responsável pela fosforilação e consequente estabilidade das proteínas PER no citoplasma da célula. Mutações no gene da CK1 ϵ levaram à descoberta do primeiro mamífero mutante para ritmos circadianos, os hamsters com mutação *Tau* (Ralph & Menaker, 1988).

Toda essa dinâmica entre as alças positivas e negativas leva aproximadamente 24 horas para se concluir (Bass & Takahashi, 2010; Zhang & Kay, 2010). Em geral, um ciclo típico tem início nas primeiras horas da manhã com a ativação da transcrição de *Per* e *Cry* por CLOCK:BMAL1. Os níveis de transcrição atingem seu ápice por volta de meio-dia e os níveis de proteína no citoplasma atingem o seu apogeu cerca de duas horas depois (Sangoram *et al.*, 1998, Gotter *et al.*, 2000, Albrecht & Eichele, 2003).

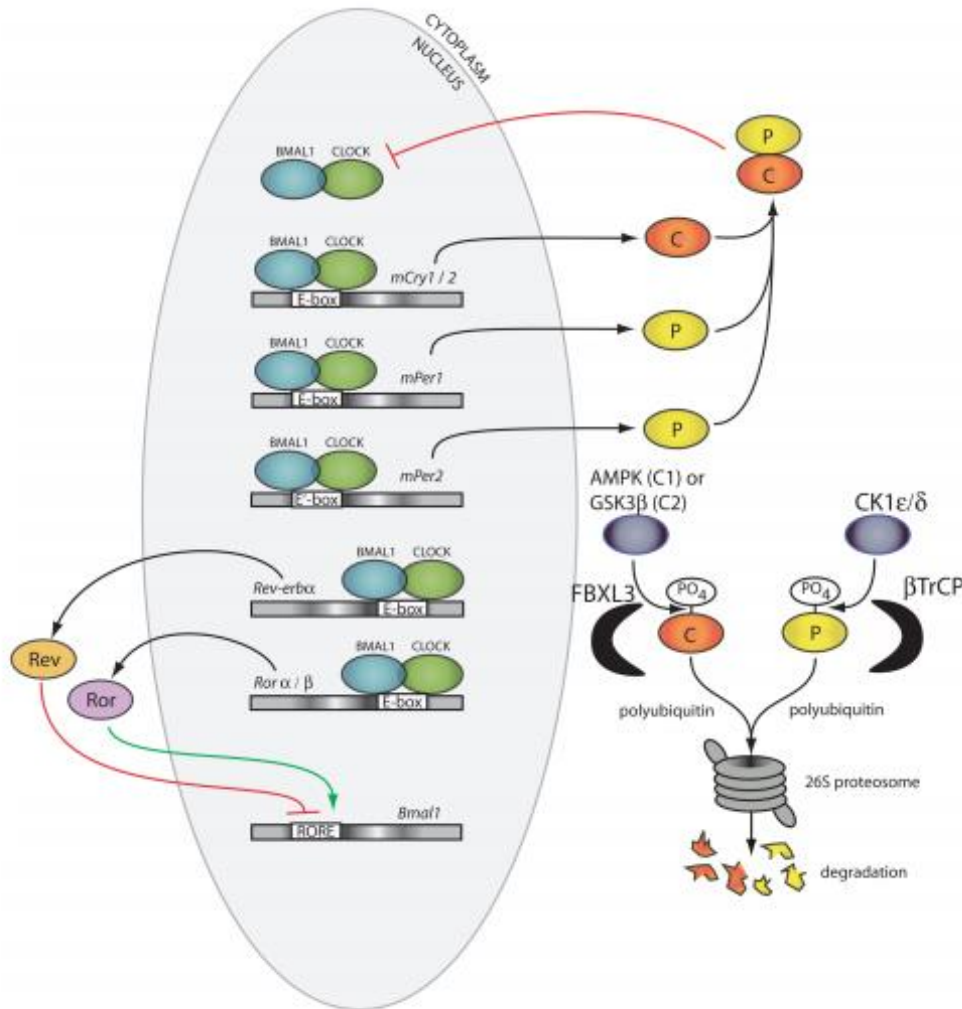


Fig. 7 – Representação do mecanismo de funcionamento dos genes de relógio. Em verde e azul o dímero CLOCK/BMAL1 representando a alça positiva do sistema. O dímero atua na região promotora dos genes *Per* e *Cry*, *Rev-erb α/β* e *Ror α/β*. A transcrição dos genes *Per* e *Cry* dá início à alça negativa, enquanto as proteínas REV-ERB α/β e ROR α/β competem pela inibição ou ativação do gene *Bmal1* respectivamente. As proteínas PER e CRY associam-se, juntamente com uma caseína quinase, inibindo a ação do dímero CLOCK/BMAL1 no núcleo e inibindo a transcrição de seus próprios genes. A finalização da alça negativa ocorre com o auxílio de enzimas como CK1 ϵ e AMPK ou GSK3 β que hiperfosforilam as proteínas PER e CRY, respectivamente, para que sejam degradadas nos proteossomos, e se inicie um novo ciclo (adaptado de Buhr & Takahashi, 2013).

Modelo de Estudo: Células Embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*

O peixe teleósteo *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish*, tem sido usado como modelo de desenvolvimento de vertebrados por décadas. As principais características que fazem desse animal um excelente modelo de estudo nas mais diversas áreas do conhecimento estão relacionadas ao seu desenvolvimento e à sua reprodução. O *zebrafish* é um peixe pequeno, robusto, de baixo custo e de fácil reprodução em laboratório (Spence *et al.*, 2008). Seus embriões são transparentes, pequenos e possuem um rápido desenvolvimento. Cerca de 24 a 36 horas após a fertilização, todos os precursores de órgãos e sistemas podem ser reconhecidos no embrião (Spence *et al.*, 2008; Vatine *et al.*, 2011). Apesar de ser um excelente modelo para o estudo do desenvolvimento, seu uso tem se expandido, tornando o *zebrafish* um modelo ideal também para o estudo de sistemas visuais (Billota & Saszik, 2001), mecanismos de dor (Gonzalez-Nunez & Roriguez, 2009), farmacologia, pesquisa clínica como um modelo de doenças, e na descoberta de novas drogas (Chakraborty *et al.*, 2009).

Outra marcante característica desse animal é a sua capacidade de perceber luz através de seus órgãos, tecidos e mesmo por células em cultura (Whitmore *et al.*, 2000; Car & Whitmore, 2005; Farhat *et al.*, 2009). Tal característica faz do *zebrafish* um excelente modelo para estudos de sincronização e análise dos mecanismos genéticos do relógio biológico, porém deve-se ressaltar que existem fatores complicadores nessa análise devido ao evento de duplicação gênica pelo qual os peixes teleósteos passaram. Em *zebrafish* existem seis genes *cry* e quatro genes *per* (Vatine *et al.*, 2011), assim como recentemente foram detectados cinco genes da melanopsina (Davies *et al.*, 2011), aumentando dessa forma, consideravelmente, o grau de complexidade nas análises desse modelo.

O modelo de estudos escolhido nesta tese é representado por células embrionárias de *zebrafish*, uma linhagem comercial conhecida como ZEM-2S. A capacidade de percepção luminosa dessas células já foi caracterizada por um estudo anterior realizado pelo nosso grupo (Farhat *et al.*, 2009), o qual demonstrou que a linhagem de células embrionárias ZEM-2S exibe uma proliferação diferencial quando exposta a diferentes ciclos de claro e escuro. Em adição, análises moleculares dos genes do relógio demonstraram que essas células são capazes de se sincronizarem aos ciclos de claro e escuro através da expressão rítmica de genes de relógio como *clock*, *per1* e *cry1b*, que conhecidamente são responsáveis por sincronizar os ritmos biológicos ao fotoperíodo ambiental. Mas talvez a característica mais importante pertinente a esta tese tenha sido a confirmação da expressão dos genes da melanopsina *opn4m* e *opn4x* (hoje conhecidos como *opn4m-1* e *opn4m-2*).

Apesar desse estudo demonstrar de forma inequívoca a fotossensibilidade das células ZEM-2S, a via de sinalização que leva a sincronização dessas células ainda não foi determinada, assim como o pigmento fotorreceptor que a desencadeia. Essa é uma questão ainda muito debatida no meio científico, no qual vários candidatos são propostos para desempenhar o papel do fotorreceptor circadiano em relógios periféricos de *zebrafish*. Dentre eles podemos destacar: (i) opsinas como *teleost multiple tissue opsin* (tmt-opsin) e a *vertebrate ancient opsin* (va-opsin); (ii) os criptocromos que, em drosófilas, são responsáveis pela fotorrecepção circadiana (Cermakian *et al.*, 2002); (iii) processos de estresse oxidativo através da ativação de oxidases contendo flavinas e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Uchida *et al.*, 2010).

Um dos possíveis candidatos a dar início a essa via é a melanopsina, fazendo com que esse estudo tenha extrema importância não apenas para elucidação da fototransdução nessas células, mas também para a futura determinação da

INTRODUÇÃO

funcionalidade das duas formas variantes de melanopsina existentes em vertebrados não mamíferos, expressas através dos genes *Opn4m* e *Opn4x*, que ainda permanecem em discussão no meio científico.

Objetivos

OBJETIVOS

1. Determinar a presença e localização das melanopsinas nas células ZEM-2S.
2. Determinar a via de sinalização que desencadeia a resposta a estímulos luminosos em células da linhagem ZEM-2S de *Danio rerio*.
3. Estabelecer metodologias eficientes de transfecção de RNA de interferência e de plasmídeo *perl:luc*.

Material e Métodos

Manutenção de Células ZEM-2S

Células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio* foram mantidas em meio com 50% de L15, 35% de D-MEM, 15% de F12 e 15 mM de HEPES (Gibco, EUA), complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocel, Brasil) e 1% de antibiótico/antimicótico (10.000 U/mL penicilina; 10.000 µg/mL estreptomicina; 25 µg/mL anfotericina B), em estufa a 28° C. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana e as células foram subcultivadas (1:3) quando atingiram a confluência nos frascos. Para tanto foram removidas com solução de Tyrode/EDTA (NaCl 8,0 g/L; KCl 0,2 g/L; NaHCO₃ 1,0 g/L; NaH₂PO₄ 0,05 g/L; MgCl₂ 1,0 g/L; EDTA 1,86 g/L) e transferidas para novos frascos.

Para a realização de todos os experimentos, a concentração de soro fetal bovino foi reduzida para 2% e foi adicionado retinaldeído (Sigma, EUA) em concentração final de 10⁻⁷ M. Para se determinar a correta densidade celular para cada experimento descrito abaixo, as células ZEM-2S foram destacadas dos frascos de cultura, centrifugadas a 500 x g por 5 min, ressuspensas em meio de cultura e contadas em câmara de Neubauer. Quando os experimentos envolviam estimulação por luz, todos os procedimentos que antecederam a estimulação foram conduzidos sob luz vermelha de baixa intensidade.

Determinação das Melanopsinas por Ensaio Imunocitoquímico

A expressão e a localização das proteínas da melanopsina na linhagem ZEM-2S foram avaliadas por ensaio de imunocitoquímica. Neste processo, as preparações fixadas e permeabilizadas foram incubadas com anticorpos específicos para as proteínas em questão. A localização dos anticorpos primários foi visualizada com anticorpos

secundários conjugados com os fluoróforos isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou Cy3.

Os anticorpos anti-melanopsina foram desenvolvidos em coelhos inoculados com os antígenos para as diferentes sequências (Covance, EUA), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 . Sequências dos antígenos inoculados em coelhos

<i>Danio rerio</i>	Opn4m1 (porção C-terminal) Cys- Gly- Arg- Phe- Arg- Phe- Arg- Arg- Thr- Ser- Thr- Gly- Lys- Ser- Arg- Leu- Ser- Ser- Ala- Ser- Asp- Ser
	Opn4m2 (porção N-terminal) Met- Ser- His- His- Ser- Ser- Trp- Arg- Gly- His- His- Cys- Ala- Pro- Gly- Cys

As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade celular de 10^4 células/poço. Após adesão por 24 h em estufa a 28° C, as células foram fixadas em 4% de paraformaldeído diluído em PBS, a 4° C durante 1 h. Em seguida as células foram lavadas com PBS 3 vezes por 10 min. Os sítios não específicos foram bloqueados com 3% de soro de cabra (Sigma, EUA) diluído em PBS e incubado por 30 min a 4°C. Após nova lavagem com PBS, 3 vezes por 10 min, as células foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo primário para Opn4m-1 ou com o anticorpo primário para Opn4m-2, nas concentrações de 1:100 a 1:5000 em tampão de incubação. Após 3 lavagens com PBS por 10 min, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho, conjugado a FITC ou Cy3 (feito em cabra, Jackson Laboratories, EUA) em tampão de incubação, durante 1 h, protegidas de luz e à temperatura ambiente.

Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS, 3 vezes por 10 min e, posteriormente, foi adicionado meio aquoso Vectashield contendo DAPI (Vector Laboratories, EUA). O tampão de incubação utilizado para diluição dos anticorpos primário e secundário contém 1% de albumina de soro bovino (Calbiochem, EUA), 0,25% de carragenina lambda (Sigma-Aldrich, EUA) e 0,3% de Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, EUA). As imagens foram obtidas em microscópio invertido de fluorescência (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Alemanha).

Estimulação por Luz Azul

Para investigar a influência da luz sobre os genes de relógio, as células ZEM-2S foram semeadas em frascos de 25 cm² em uma densidade celular de 2.10⁶ células/frasco e foram colocadas em escuro constante (EC) por 6 dias em estufa a 28°C. No início de sétimo dia, foram estimuladas com luz azul (lâmpada Golden Plus, 4,5 watts, 60 leds, Paulista Business Com. Imp. Exp. Prod. Eletr. Ltda., Brasil, 450-475 nm, com intensidade de 87,85 a 95,17 μ watts/cm²). A intensidade foi mantida em 650 lux, medida com o auxílio de um luxímetro (LX-102, Lutron Eletrovic Enterprise, Taiwan). A duração do pulso de luz foi de 10 min, e em seguida as células foram mantidas em EC em estufa a 28°C até o momento de extração. A extração ocorreu nos tempos de 1, 2, 6 e 12 h após o pulso de luz. Os grupos controle foram mantidos em EC ao longo do experimento e o RNA foi extraído conjuntamente com os grupos tratados.

Inibição de componentes das vias de sinalização

Para investigar a via de sinalização que modula a expressão dos genes de relógio através do estímulo luminoso, as células foram separadas em quatro grupos (I) EC, (II) EC na presença de inibidores específicos, (III) pulso de luz, como no protocolo anterior

e (IV) pulso de luz na presença de inibidores. A montagem e execução desse protocolo foi idêntica à descrita no protocolo anterior, com exceção de que os inibidores foram adicionados às células 30 min antes do estímulo de luz, permanecendo nas garrafas ao longo de todo o experimento. Utilizaram-se os seguintes inibidores: U-73122 (inibidor de fosfolipase C, PLC), BAPTA-AM (quelante de cálcio), RO 31-8220 (inibidor de proteína quinase C, PKC), KN-93 (inibidor de cálcio/calmodulina quinase II, CaMK II), L-NAME (inibidor de óxido nítrico sintase, NOS), PD-98059 (inibidor de MEK), SQ-22536 (inibidor de adenilil ciclase), todos da Enzo Life Sciences, EUA. Todos foram dissolvidos em DMSO (concentração máxima de 0,1% no meio), exceto L-NAME e SQ-22536 que foram dissolvidos em água MilliQ estéril. O RNA foi extraído 2 h após o estímulo luminoso.

Produção de óxido nítrico em resposta ao estímulo luminoso

Para demonstrar a produção de óxido nítrico (NO) em resposta à luz, as células da linhagem ZEM-2S foram semeadas em placas próprias para microscopia confocal previamente tratadas com poli-*D*-lisina (Sigma-Aldrich, EUA), a uma densidade de 10^4 células/placa. As células foram mantidas em EC a 28° C por pelo menos 24 h antes da estimulação. No dia do experimento, as células tiveram o meio de cultura removido e substituído por uma solução de PBS contendo 5 μ M do marcador de óxido nítrico DAR-4M AM (Enzo LifeSciences, EUA) suplementado com 100 μ M de *L*-arginina (Sigma-Aldrich, EUA). Após incubação por 30 min em EC a 28° C, as células foram lavadas três vezes com PBS para remoção do excesso do marcador fluorescente e foram levadas para análise em microscopia confocal. As imagens foram capturadas em microscópio confocal LSM-510 (Carl Zeiss, Alemanha) e os comprimentos de onda de excitação e emissão para o DAR-4AM foram 560 nm e 575 nm respectivamente. Uma vez

encontrado o campo focal das células com auxílio de filtro vermelho Safe-Light GBX-2 (Kodak, Brasil) em objetiva de 63x em água, foi escolhido um campo com um número apropriado de células. Encontrado o campo focal, passou-se a imagem para o computador, onde os parâmetros: fluorescência basal, *pinhole* e *detector gain* foram ajustados antes do início do registro (Programa LSM-510, Carl Zeiss, Alemanha). Para o registro das imagens utilizou-se a opção *Time Series* do programa com um intervalo de varredura entre as imagens de 1 seg. A partir de então foi aplicado um pulso de 10 seg de luz azul a 488 nm a uma potência de 0,2 μ W.

Ativação de guanil ciclase por YC-1

Com o objetivo de investigar se o NO foi o mediador dos efeitos da luz, as células foram separadas em três grupos (I) EC, (II) EC na presença do ativador de via de sinalização específico, (III) pulso de luz azul (lâmpada Golden Plus, 4,5 watts, 60 leds, Paulista Business Com. Imp. Exp. Prod. Eletr. Ltda., Brasil, 450-475 nm, com intensidade de 87,85 a 95,17 μ watts/cm²). A montagem e execução ocorreu de acordo com o que foi descrito no protocolo de estímulo com luz azul, com exceção de que o ativador foi adicionado às células no início do sétimo dia e permaneceu no meio até o momento da extração. Para efeito de padronização, foi considerado para o tempo de ação do ativador o mesmo tempo utilizado para incubação dos inibidores, ou seja 30 minutos. O RNA foi extraído 2 h após o término desse período. Neste protocolo utilizou-se o ativador de guanil ciclase YC-1 (Enzo Life Sciences, EUA), cuja solução estoque foi feita em água MilliQ estéril. Os seguintes controles foram feitos: controle negativo, sem YC-1, sem estímulo luminoso; controle positivo, sem YC-1, com estímulo luminoso.

Produção de AMPc em resposta ao estímulo luminoso

As células da linhagem ZEM-2S foram destacadas, centrifugadas, ressuspendidas e contadas como descrito anteriormente. Para analisar o efeito da luz azul sobre a concentração intracelular de AMPc, as células foram semeadas em placas de seis poços a uma densidade de $5 \cdot 10^5$ células/poço. As placas permaneceram em EC por três dias a 28° C. No dia do experimento, todas as placas experimentais foram tratadas com o inibidor de fosfodiesterase isobutilmetilxantina (IBMX) 10^{-4} M (Enzo LifeSciences, EUA) 15 min antes do estímulo, permanecendo no meio durante todo o experimento. As células do grupo controle positivo foram tratadas com o ativador de adenilil ciclase, forskolina 10^{-5} M por 15 min, e às outras foi aplicado um pulso de luz azul (lâmpada Golden Plus, 4,5 watts, 60 leds, Paulista Business Com. Imp. Exp. Prod. Eletr. Ltda., Brasil, 450-475 nm, com intensidade de 87,85 a 95,17 $\mu\text{watts}/\text{cm}^2$) por 1, 5 ou 10 min. Ao término do estímulo, as células foram lisadas e as amostras processadas de acordo com as instruções do *kit Direct Cyclic AMP* (Enzo LifeSciences, EUA). A concentração de AMPc foi lida no leitor de placa SpectraMax 250 (Molecular Devices, Alemanha) no comprimento de onda específico de 405 nm. A concentração foi determinada por regressão linear com auxílio do programa *GraphPad Prism 5.1*.

Silenciamento das Melanopsinas

Para estudar o mecanismo de ação utilizado na fototransdução da melanopsina em culturas de células embrionárias de *Danio rerio*, utilizaram-se RNAs de interferência desenhados pelo programa da Dharmacon (EUA) e sintetizados pela Ambion (EUA), complementares às sequências dos RNA mensageiros dos genes da melanopsina, *opn4m-1* e *opn4m-2*, sendo geradas três sequências de oligonucleotídeos para cada gene (Tabela 2). Para a transfecção do RNA de interferência, as células ZEM-2S foram semeadas em garrafas de 25 cm² 24 h antes da transfecção, em uma densidade celular de aproximadamente 50% de confluência (2.10⁶ células/garrafa). No dia do experimento, o meio de cultura foi substituído por meio fresco 30 min antes da transfecção. A inserção do RNA de interferência nas células ocorreu de acordo com o protocolo do fabricante, *GenMuteTM siRNA Transfection* (Signagen Laboratories, EUA) onde, para cada 1 mL de meio, foram adicionados 100 µL de *GenMute Transfection Buffer* (1x) e 4 µL de *GenMute Reagent*. A concentração final de RNA de interferência em cada garrafa foi de 50 nM e a confirmação da transfecção foi feita através da análise em microscópio invertido de fluorescência (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Alemanha), tendo em vista a marcação fluorescente presente nos RNAs de interferência para *opn4m2-1* e *opn4m1-1* em destaque (Tabela 2). A expressão remanescente após introdução do silenciador foi quantificada por PCR quantitativo, usando os *primers* e sondas da Tabela 3.

Tabela 2. RNAs de interferência para melanopsinas de *Danio rerio*

	<i>Sense</i>	<i>Anti-sense</i>
<i>Danio</i> <i>Opn4m2-1</i>	FAM-GGG AAA CGC ACA AGG UGU AUU	FAM-UUC CCU UUG CGU GUU CCA CAU
<i>Danio</i> <i>Opn4m2-2</i>	GAA AUG CAC UGG UGG UCU AUU	UUC UUU ACG UGA CCA CCA GAU
<i>Danio</i> <i>Opn4m2-3</i>	CAG AGU UAG CCG ACG CAA AUU	UUG UCU CAA UCG GCU GCG UUU
<i>Danio</i> <i>Opn4m1-1</i>	Cy3-GAU GGA UCU UUG GAG AGA AUU	Cy3-UUC UAC CUA GAA ACC UCU CUU
<i>Danio</i> <i>Opn4m1-2</i>	CAA ACG AGA CUC GAU GAA AUU	UUG UUU GCU CUG AGC UAC UUU
<i>Danio</i> <i>Opn4m1-3</i>	CGA CUG AAA AAU GAA UGG AUU	UUG CUG ACU UUU UAC UUA CCU

Tabela 3. Sequências dos *primers* e sondas para os ensaios da eficiência do silenciamento por PCR quantitativo

<i>Primers</i>	<i>Danio rerio (zebrafish)</i>
Nome e no. de acesso	Sequência
<i>Opn4m1 (Opn4m)</i> - GQ925715.1	<i>Foward</i> – 5' GGG CAA CTT CCT GGT CAT CTA TG 3'
	<i>Backward</i> – 5' ATG CTG GTG GTG AAG AAG ATG G 3'
	<i>Probe</i> – 5'/5Cy5/AGG AGC CGG ACC CTG AGG ACC C/3BHQ_2/ 3'
<i>Opn4m2 (Opn4x)</i> - GQ925716.1	<i>Foward</i> – 5' GCG ATT GTC TTC TGC CTC TGA 3'
	<i>Backward</i> - 5' AGG GAA CTG ACA CTG GAA CCA 3'
	<i>Probe</i> – 5'-/5,6-FAM/AGT GAT TCT TGC TGG ACT GAG AGT GAG GCT/3BHQ_1/-3'

Transfecção de Luciferase em Células ZEM-2S

O plasmídeo contendo a sequência promotora do gene *per1* de *Danio rerio*, doado pelo Prof. David Whitmore (University College London, Inglaterra), foi subclonado no vetor *PGL-3 basic* de acordo com o protocolo de clonagem do kit da Invitrogen (C4040-10). Realizamos a competência de *Escherichia coli* em nosso laboratório, seguindo protocolo descrito no livro: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2 ed.* O plasmídeo foi purificado pelo kit *PureYield™ Plasmid Midiprep*

System (Promega, A2492) e quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop, ThermoScientific, EUA).

Os vetores foram digeridos (enzimas de restrição, Tabela 4) resultando nos tamanhos esperados para cada inserto. Os plasmídeos foram enviados para sequenciamento (Retrogen, EUA) e os resultados do sequenciamento foram alinhados com a sequência de cada promotor usando a ferramenta *Blast* do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Os plasmídeos foram linearizados para a transfecção estável com a enzima citada na Tabela 4, a qual foi escolhida por atuar em uma sequência no vetor, inexistente nas sequências clonadas.

Tabela 4. Enzimas de restrição e linearização recomendadas

Gene/ID	Inserto (pb)	Enzimas de restrição	Enzima de linearização
<i>zfp1/563926</i>	3100	Xho+HindIII	Kpn1

As células foram mantidas em condições apropriadas de cultivo. Ao atingirem a fase exponencial de crescimento, foram destacadas das garrafas de cultivo, pela adição da solução de Tyrode/EDTA. As células foram contadas, centrifugadas e ressuspensas num volume apropriado a garantir uma densidade de $1,5 \cdot 10^6$ por 100 μ L de tampão de transfecção (tampão V, Lonza, Suíça). Os testes iniciais foram realizados com o plasmídeo *pmaxGFP* (Lonza, EUA) nas concentrações de 1, 2, 4 e 8 μ g para determinação da concentração de DNA plasmidial que traria os melhores resultados de transfecção. Depois de 24 h da transfecção com este vetor, imagens de três campos de cada poço foram capturadas por uma câmera acoplada a um microscópio invertido de fluorescência (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Alemanha). Estas imagens foram processadas

pelo programa *Adobe Photoshop* e a porcentagem de células que expressam GFP foi calculada.

O plasmídeo *zfp_{er1}:luc* foi adicionado, na concentração escolhida, aos 100 µL de suspensão celular. As células foram então transferidas para cubetas apropriadas e submetidas a eletroporação no aparelho Nucleofector II Amaxa (Lonza, Suíça), utilizando-se o protocolo mais adequado para a linhagem em questão (programa T-020, Nucleofector II, Amaxa, Lonza, Suíça). Após a eletroporação, 500 µL de meio de cultura foram adicionados à cubeta e as células foram semeadas em placas de 6 poços, já contendo 1,5 ml de meio de cultura.

Concomitante à transfecção do vetor *PGL3-Luc* (Invitrogen, EUA), foi transfectado o vetor *pcDNA 3.1 (-)* (Invitrogen, EUA), vetor este que confere resistência à geneticina (Gibco, EUA). A relação entre as quantidades dos vetores *PGL3-Luc* e *pcDNA 3.1* foi de 7:1, ou seja, 3,5 µg de *zfp_{er1}:luc* para 0,5 µg de *pcDNA*.

Após a eletroporação, as células permaneceram em repouso por um período de dois dias a uma semana, quando se deu início à seleção dos clones com geneticina. A concentração utilizada foi determinada através de uma curva de mortalidade, com concentrações de antibiótico variando de 200 a 900 µg/mL. A concentração escolhida para seleção dos clones foi a de 900 µg/mL, pois foi a mais eficiente para eliminar as células não transfectadas no menor período de tempo, no caso, 15 dias.

Transfecção de DNA Plasmidial e siRNA por Nanotubos de Carbono

Os nanotubos de carbono (NTC) utilizados no experimento foram cedidos pelos Profs. Luis Orlando Ladeira (Departamento de Física, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte) e Maria de Fátima Leite (Departamento de Fisiologia e

Biofísica, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte). Assim que recebidos, os NTCs foram pesados e adicionou-se a eles uma quantidade de água MilliQ autoclavada para a obtenção de uma solução com concentração final de 0,5 mg/mL. Antes da utilização da solução para os experimentos, foi necessário fazer a funcionalização dos NTCs, procedimento no qual a solução permaneceu por 3 horas em sonicador (U200 S Control, KIKA Labortechnik, Alemanha) para ativação dos NTCs.

As células foram mantidas em condições apropriadas de cultivo. Ao atingirem a fase exponencial de crescimento, foram destacadas das garrafas de cultivo pela adição da solução de Tyrode/EDTA. Em seguida as células foram contadas e semeadas em placas de 6 poços, com uma densidade de 1.10^6 células em 2 mL de meio por poço. As células foram mantidas 24 h em estufa a 28° C para sua adesão à placa. A solução de transfecção contendo 0,5 mg/mL de nanotubos e 100 nM de siRNA foi sonicada (sonicador T14, Thornton Inpec Eletrônica Ltda., Brasil) por 30 min antes de ser adicionada às placas, procedimento necessário para que haja a interação entre as nanopartículas e o siRNA. Foram adicionados 100 µL da solução de transfecção aos poços cultivados das placas, a fim de se obter uma concentração final de 0,025 mg/mL de NTCs, considerada ideal para transfecção com nanotubos. As células foram deixadas por 48 h em estufa a 28° C para posterior verificação da eficiência da transfecção por microscopia de fluorescência (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Alemanha).

Extração de RNA Total

Após o descarte do meio, foi adicionado 1 mL de *Tri-Reagent-LS* (Ambion, EUA) diretamente sobre as células. O lisado celular foi coletado e incubado por 5 min à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação das proteínas nucleares. Adicionou-se 200 µL de bromo-cloro-propano (Sigma-Aldrich, EUA) e, em seguida, as

amostras foram agitadas vigorosamente por 15 seg. Após incubação por 10 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4° C, separando-se em seguida a fase superior aquosa, que contém RNA. O RNA foi precipitado com a adição de 650 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA) por 10 min à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 35 min a 4° C. O sobrenadante foi removido e o RNA lavado com 1,3 mL de etanol 75%. O RNA foi recuperado por centrifugação a 12.000 x g por 15 min a 4° C, e a lavagem com etanol repetida, sendo as amostras colocadas a -80° C por, no mínimo, 1 h. Após nova centrifugação, o etanol foi descartado e o precipitado de RNA evaporado à temperatura ambiente, ressuscitado em 20 µL de H₂O/DEPC (Ambion Inc, EUA) e tratado com DNase conforme instruções do fabricante (*turbo-DNA-freeTM*, Ambion Inc., EUA).

Reação de Transcriptase Reversa - RT-PCR

A concentração de RNA foi determinada por leitura da absorbância a 260 nm em espectrofotômetro (Nanodrop, ThermoScientific, EUA) e o RT-PCR realizado com 1 µg de RNA total, utilizando 1µL de oligonucleotídeos randômicos (50 µg/µL) e 1 µL de dNTPs 10 mM (Life Technologies, EUA), em reação com volume final de 13 µL ajustado com H₂O/DEPC. As amostras foram aquecidas por 5 min a 65° C e, a seguir, transferidas para cuba com gelo, adicionando-se 4 µL de tampão para PCR (5x), 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de inibidor de ribonuclease (40 U/µL) e 1 µL da enzima *Superscript III* (200 U/µL, Life Technologies, EUA), para um volume final de 20 µL. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada por 5 min a 25° C, e em seguida por 50 min a 50° C. A reação foi interrompida por incubação a 70° C por 15 min. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subsequentes de PCR quantitativo.

PCR Quantitativo

Para os ensaios de PCR quantitativo, foram preparadas soluções contendo os *primers* e sondas (para *per1b*, *cry1b* e RNA ribossômico 18S (RNA 18S) ou para *per2*, *cry1a* e RNA 18S, Tabela 5), Supermix 2X (KCl 100 mM, Tris-HCl 40 mM, dNTPs 1,6 mM, iTaq DNA polimerase 50 U/mL e MgCl₂ 6 mM, Life Technologies, EUA) suplementado para 400 μM de dNTPS, 6 mM de MgCl₂ e 0,1 U/μL de Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies, EUA), e H₂O para volume final de 29 μL/poço. Essa solução foi alíquotada (cada alíquota suficiente para 3,5 poços) em tubos, e o cDNA de cada amostra adicionado (3,5 uL/alíquota) a um tubo. As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa de experimento (30 μL/poço). Controles negativos sem cDNA foram incluídos rotineiramente.

O par de *primers* e a sonda específicos para cada gene (Tabela 5) foram desenhados usando o programa *Primer Express* (Life Technologies, EUA), baseados nas sequências obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>), e sintetizados por IDT (EUA). RNA 18S foi utilizado como normalizador (*house-keeping gene*) dos experimentos. Todos os ensaios foram realizados em termociclador iQ5 (BioRad, EUA), nas seguintes condições: 7 min a 95° C seguido por 50 ciclos de 10 seg a 95° C e 1min a 60° C.

A análise dos dados foi feita pela comparação entre ciclos de amplificação (C_{TS}) dos poços controle e experimentais, obtida entre as porções de crescimento geométrico das curvas, passando-se uma reta denominada limiar que cruza essas porções. Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (C_T), foi encontrado o ΔC_T que é a diferença entre o valor do gene de interesse e do RNA 18S. A seguir, foram subtraídos os valores encontrados para os poços experimentais daqueles dos poços controle, obtendo-se o ΔΔC_T. Colocando-se esse valor como exponencial negativo na base 2 (2⁻

$\Delta\Delta CT$), obtém-se o número de vezes que o gene está expresso no grupo experimental em relação ao controle. Para determinar os níveis de significância das possíveis diferenças, os dados em log foram comparados por análise de variância *one-way* (ANOVA), seguida por Tukey (ou excepcionalmente teste *t* de Student). A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Tabela 5. Primers e sondas para os ensaios de PCR quantitativo

	Sequências	Concentração final
18S rRNA X03205.1	For: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	50 nM
	Rev: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	50 nM
	Pr:5'-/5TexRd/TGCTGGCACCAGACTTGCC CTC/3BHQ_2/-3'	50 nM
<i>per1</i> AY597250 ou M_212439.2	For: 5'-AGCTCAAACCTCACAGCCCTT-3'	300 nM
	Rev: 5'- TCAGAGCTGGCACTCAACAGA -3'	300 nM
	Pr:5'-/5Cy5/TCCACCCAGCAGTTCTCTGGC ATACA/3BHQ_2/-3'	200 nM
<i>cry1b</i> NM_131790.4	For: 5'-CGTCTCTGGAGGAGCTCGG-3'	300 nM
	Rev: 5'- TCTCCCCCGGGCCAC-3'	300 nM
	Pr:5'-/5HEX/TTTGAAACAGAGGGACTGTC CACTGCTG/3BHQ_1/-3'	200 nM
<i>per2</i> AY597250 ou NM_212439.2	For: 5'- GTGGAGAAAGCGGGCAGC-3'	300 nM
	Rev:5'-GCTCTTGTTGCTGCTTTCAGTTCT-3 '	300 nM
	Pr:5'/6FAM/ATGGGTTTCAGGATCAAACCG CTGT/3BHQ_1/3'	200 nM
<i>cry1a</i> NM_131790.4	For:5'-CTACAGGAAGGTCAAAAAGAACA GC-3'	300 nM
	Rev: 5'-CTCCTCGAACACCTTCATGCC-3'	300 nM
	Pr:5'-/5HEX/AAAGCGTGGGTTGTTTGTAG CAGC/3BHQ_1/-3'	200 nM

For=*primer* forward; Rev=*primer* reverse; Pr=sonda fluorescente; TexRd=Texas Red; Cy5=Cyanine 5; Hex=6-carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein succinimidyl ester; FAM=Carboxyfluorescein; 3BHQ_1=Black hole quencher 1 (IDT); 3BHQ_2=Black hole quencher 2 (IDT).

Resultados

Deteccão e Localização da Melanopsina em Células ZEM-2S

O primeiro passo na realização deste projeto foi a deteccão e localização das proteínas Opn4m-1 e Opn4m-2 nas células ZEM-2S de *Danio rerio*. Para tanto, realizamos ensaios de imunocitoquímica, com a utilização de anticorpos primários (anti-melanopsina) e anticorpos secundários contendo marcação fluorescente (Cy3). Inicialmente determinamos a concentração ideal dos anticorpos primários, já que estes foram encomendados por nosso laboratório e, portanto, não possuem indicação da diluição a ser utilizada. As concentrações dos anticorpos primários variaram entre 1:100 e 1:5000. As melhores marcações para Opn4m-1 e Opn4m-2 foram obtidas nas concentrações de 1:250 e 1:100 respectivamente, e podem ser observadas nas Figuras 8 e 9.

Nossos resultados demonstram a existência de imunopositividade para ambas as proteínas, Opn4m-1 e Opn4m-2 (Figs. 8B e 9B). As imagens deixam claro que ambas as proteínas se encontram distribuídas por toda célula, onde a proteína Opn4m-1 se encontra igualmente distribuída por toda a membrana celular e próxima a região do núcleo (Figs. 8B e 8D). Contudo um resultado surpreendente foi observado para a proteína Opn4m-2, pois as imagens mostram uma fraca marcação na membrana celular (Fig. 9B) e uma forte marcação na região do núcleo (Fig. 9D), o que é um forte indício da presença dessa proteína no núcleo ou membrana nuclear, considerado atípico para um fotorpigmento. A especificidade do anticorpo secundário ao anticorpo primário também foi testada: o grupo controle foi incubado com pré-soro e o anticorpo secundário, e a marcação negativa demonstra que esse anticorpo é específico para os anticorpos anti-melanopsina (Figs. 8A e 9A). Todavia os resultados expostos aqui são em caráter preliminar, sendo necessários ainda, ensaios de competição com peptídeos

antigênicos para se comprovar a especificidade dos anticorpos primários anti-melanopsina utilizados.

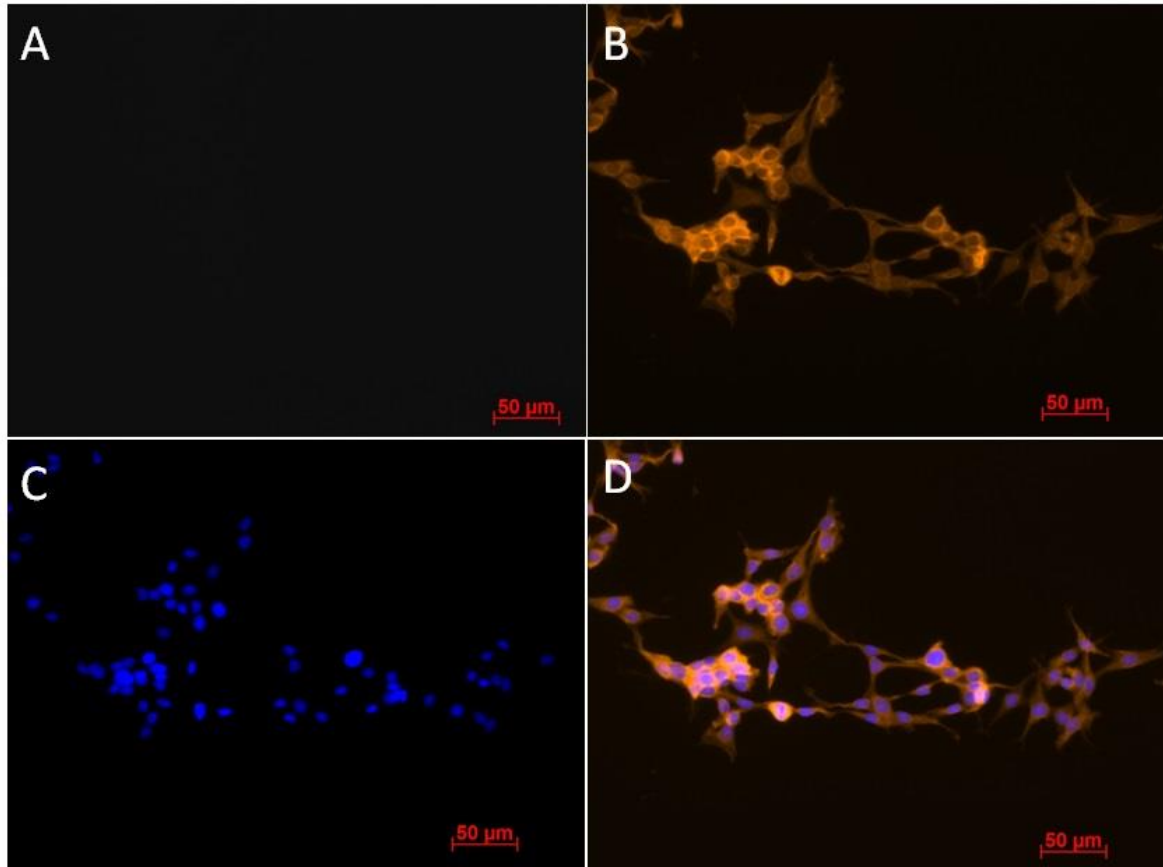


Fig. 8 – Imunocitoquímica da proteína Opn4m-1 em células ZEM-2S de *D. rerio*. Em A, controle, incubado com pré-soro e anticorpo secundário na concentração de 1:500. Em B, células marcadas com Cy3 mostrando a imunopositividade para o anticorpo anti-Opn4m-1 em diluição 1:250. Em C, cultura de células marcadas com DAPI evidenciando os núcleos celulares. Em D, sobreposição de B e C demonstrando que a proteína Opn4m-1 está dispersa de forma homogênea por todo o citoplasma, mas fortemente concentrada na membrana celular. Em azul, DAPI, marcador nuclear; laranja, Cy3, marcador de Opn4m. As imagens foram analisadas em microscópio invertido de fluorescência acoplado a uma câmera digital com um aumento de 200x.

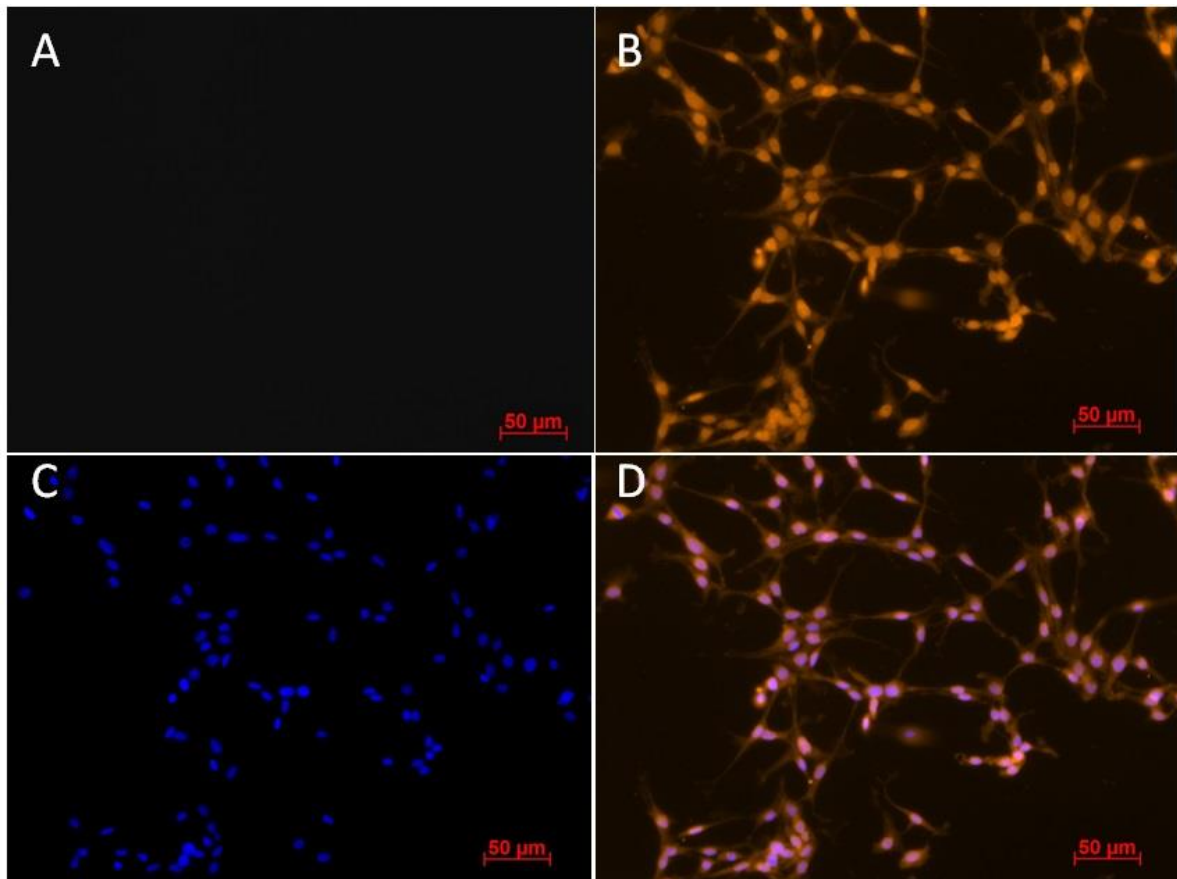


Fig. 9 – Imunocitoquímica da proteína Opn4m-2 em células ZEM-2S de *D. rerio*. Em A, controle, incubado com pré-soro e anticorpo secundário na concentração de 1:500. Em B, células marcadas com Cy3 mostrando a imunopositividade para o anticorpo anti- Opn4m-2 em diluição 1:100. Em C, cultura de células marcadas com DAPI evidenciando os núcleos celulares. Em D, sobreposição de B e C demonstrando que a proteína Opn4m-2 está concentrada no núcleo das células. Em azul, DAPI, marcador nuclear; laranja, Cy3, marcador de Opn4m. As imagens foram analisadas em microscópio invertido de fluorescência acoplado a uma câmera digital com um aumento de 200x.

Fototransdução em Células ZEM-2S

Um trabalho anterior realizado pelo nosso grupo já havia demonstrado que as células ZEM-2S de *Danio rerio* eram fotossensíveis. As células foram sincronizadas por luz, assim como apresentaram um crescimento diferencial sob diferentes períodos de ciclos claro-escuro (Farhat *et al.*, 2009). Nesse estudo duas importantes descobertas nos levaram ao presente trabalho. A primeira foi a presença de dois genes que expressam a melanopsina *opn4m* e *opn4x* (agora conhecidos como *opn4m-1* e *opn4m-2*, respectivamente); a segunda foi que a expressão dos genes *per1b* e *cry1b* não varia em condições de escuro constante mas são fortemente sincronizados por ciclo claro-escuro (luz branca) nestas células.

Com base nesses dados, inicialmente questionamos se a melanopsina seria o fotopigmento responsável pela modulação dos genes de relógio em células ZEM-2S. Para responder essa pergunta estimulamos as células ZEM-2S durante 10 min com luz azul (450-475nm), um comprimento de onda coincidente com o espectro de absorção máxima da melanopsina, e analisamos a expressão de quatro genes de relógio, dois deles sincronizados por luz branca, *per1* e *cry1b*, e dois genes sabidamente induzidos por luz branca, *per2* e *cry1a*. Nossos resultados demonstram que os quatro genes analisados foram modulados pelo pulso de luz azul, porém, notadamente, os genes *per2* e *cry1a* apresentaram uma maior resposta ao estímulo do que os genes *per1b* e *cry1b* (Figs. 10 e 11). A expressão do gene *per1b* aumentou duas horas depois do estímulo ($p < 0,0083$) e a expressão do gene *cry1b* foi diminuída após seis horas ($p < 0,0001$). Embora esses genes sejam responsivos ao estímulo luminoso azul, a resposta observada foi muito menor quando comparada à dos genes *per2* e *cry1a*. A expressão do gene *per2* aumentou aproximadamente 6 vezes duas horas depois do pulso de luz azul quando comparado ao controle ($p < 0,0001$), enquanto a do gene *cry1a* apresentou aumentos uma

RESULTADOS

e duas horas após o estímulo luminoso ($p < 0,0001$), com pico de expressão no ponto de duas horas e aumento de cerca de 4 vezes em relação ao controle (Figs. 10 e 11). Ambos retornaram aos níveis basais após seis horas. Devido à disparidade apresentada entre as respostas dos genes *per2* e *cry1a* e dos genes *per1b* e *cry1b*, optamos por utilizar apenas os dois primeiros nos experimentos subsequentes, a fim de obtermos maior clareza na avaliação das respostas aos tratamentos aplicados.

Pulso de Luz Azul

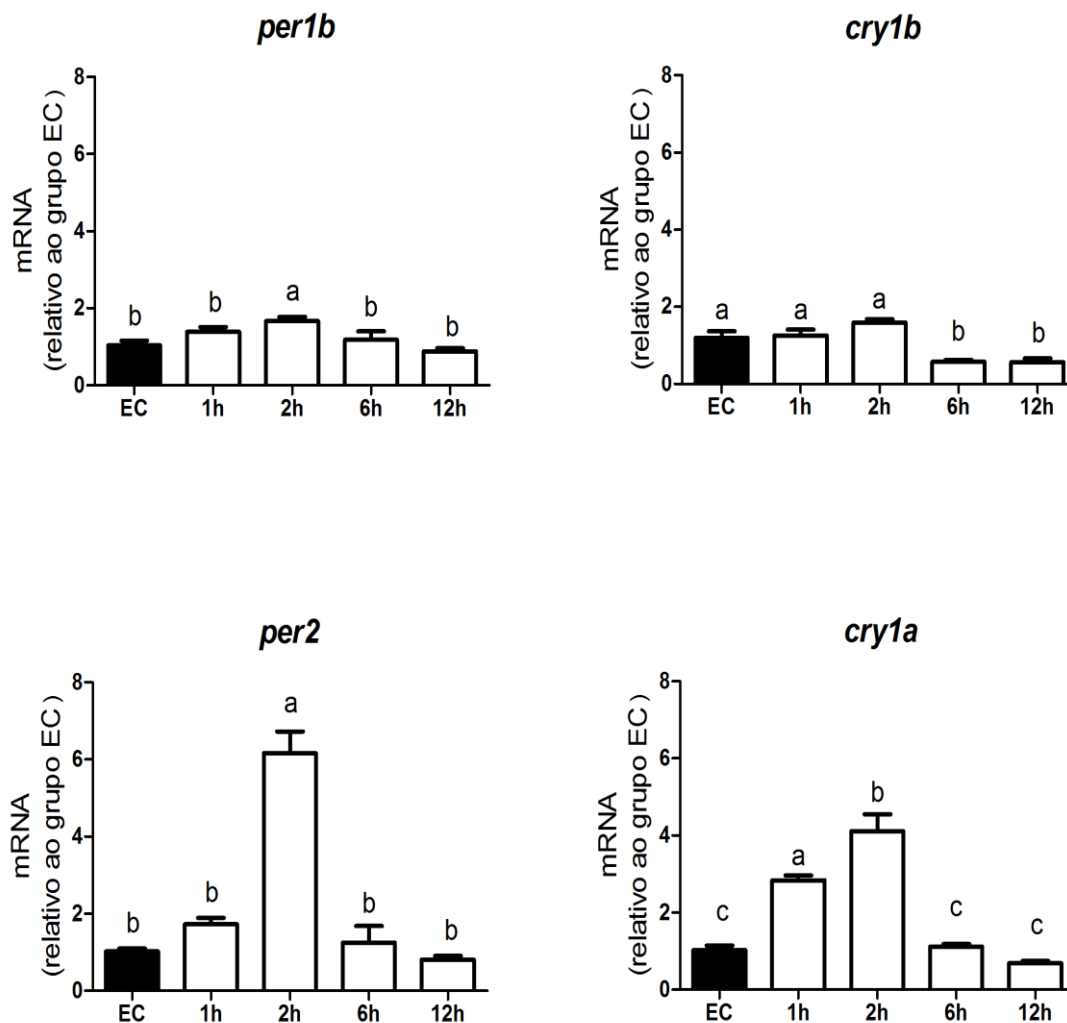


Fig. 10 – PCR quantitativo dos genes *per1b*, *per2*, *cry1a* e *cry1b* em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas com luz azul (450-475 nm, 87,85 a 95,17 $\mu\text{watts}/\text{cm}^2$) por 10 min, e o RNA total foi extraído 1, 2, 6 e 12 horas após o estímulo. (a) é significativamente diferente de (b) e (b) é significativamente diferente de (c) ($p < 0,05$). Os valores são médias ($n=5-6$) \pm EPM.

Pulso de Luz Azul vs EC

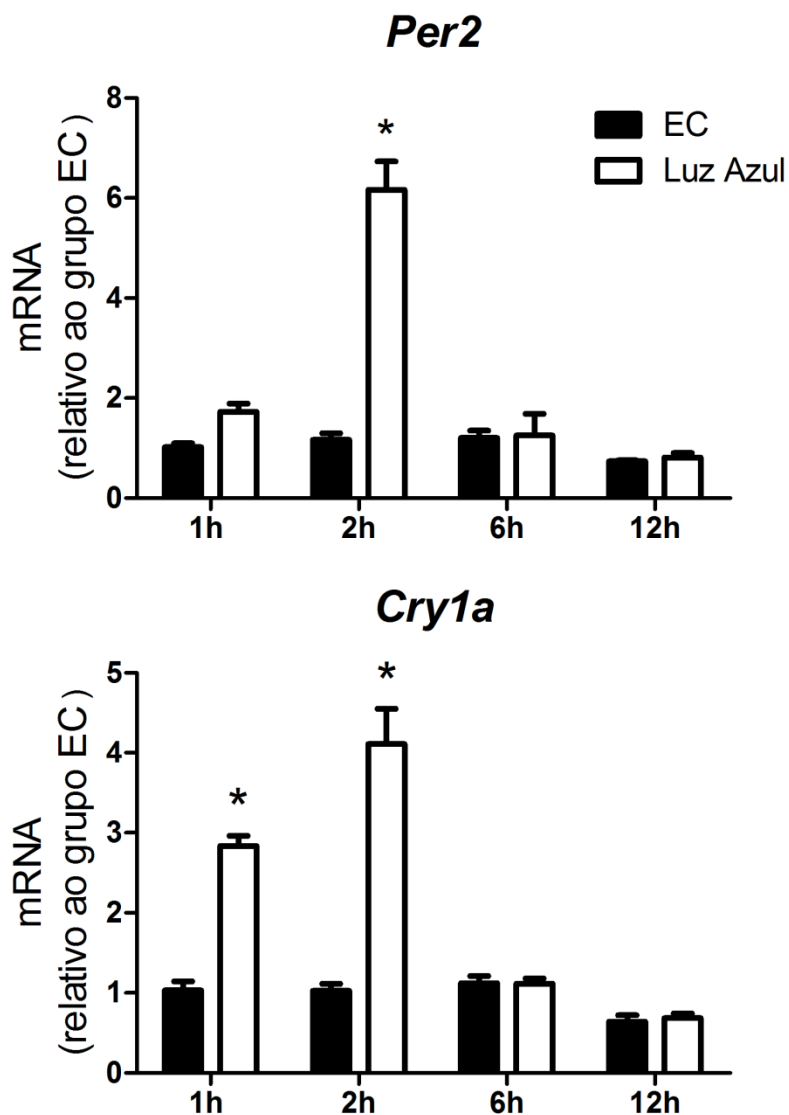


Fig. 11 – PCR quantitativo dos genes *per2* e *cry1a* em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas com luz azul (450-475 nm, 87,85 a 95,17 $\mu\text{watts}/\text{cm}^2$) por 10 min, e o RNA total foi extraído 1, 2, 6 e 12 horas após o estímulo. Barras claras representam os grupos estimulados e as barras escuras seus respectivos controles mantidos em escuro constante (EC). Cada barra representa o valor médio ($n=4-6$) \pm EPM. (*) indica valores com diferenças significativas em relação aos respectivos controles em EC ($p<0,0001$).

Após comprovarmos que o pulso de luz azul era capaz de alterar a expressão dos genes de relógio, colocando a melanopsina como possível candidato a intermediar esse processo, passamos a investigar a via de sinalização responsável por tal alteração. De acordo com os dados de estrutura e fototransdução da melanopsina encontrados na literatura e com o conhecimento gerado a partir de nossos estudos em melanóforos de *Xenopus* (Isoldi *et al.*, 2005), onde a melanopsina media a resposta de fotodispersão dos melanossomos através da via dos fosfoinosítídeos, nossa hipótese era que a melanopsina estimulada pela luz afetasse os genes de relógio através dessa mesma via de sinalização.

Para a determinação da via de sinalização evocada pelo pulso de luz azul, a estratégia adotada foi a utilização de ferramentas farmacológicas, isto é, inibidores e ativadores de etapas de vias de sinalização e a posterior análise de seus efeitos sobre a resposta dos genes de relógio *per2* e *cry1a* à estimulação por luz azul. A concentração utilizada dos fármacos foi, sempre que possível, o IC50 determinado pelo fabricante e testes de sobrevivência das células nessas soluções foram realizados por um período nunca inferior a 24 horas.

Três importantes pontos foram avaliados dentro da via dos fosfoinosítídeos: a ativação da enzima fosfolipase C (PLC), o aumento intracelular de cálcio e a ativação da enzima proteína quinase C (PKC). Nossos resultados demonstraram que o inibidor da PLC, U-73122, na concentração de 10^{-7} M (Fig. 12), inibiu o aumento da expressão gerada pela luz azul nos genes *per2* e *cry1a* ($p < 0,0001$), com seus valores de expressão retornando a níveis próximos do controle. Da mesma forma, o quelante de cálcio BAPTA-AM, na concentração de 10^{-6} M (Fig. 13), e o inibidor da proteína quinase C, Ro 31-8220 10^{-7} M (Fig. 14), também foram capazes de suprimir as respostas evocadas pela luz azul nos genes *per2* e *cry1a*.

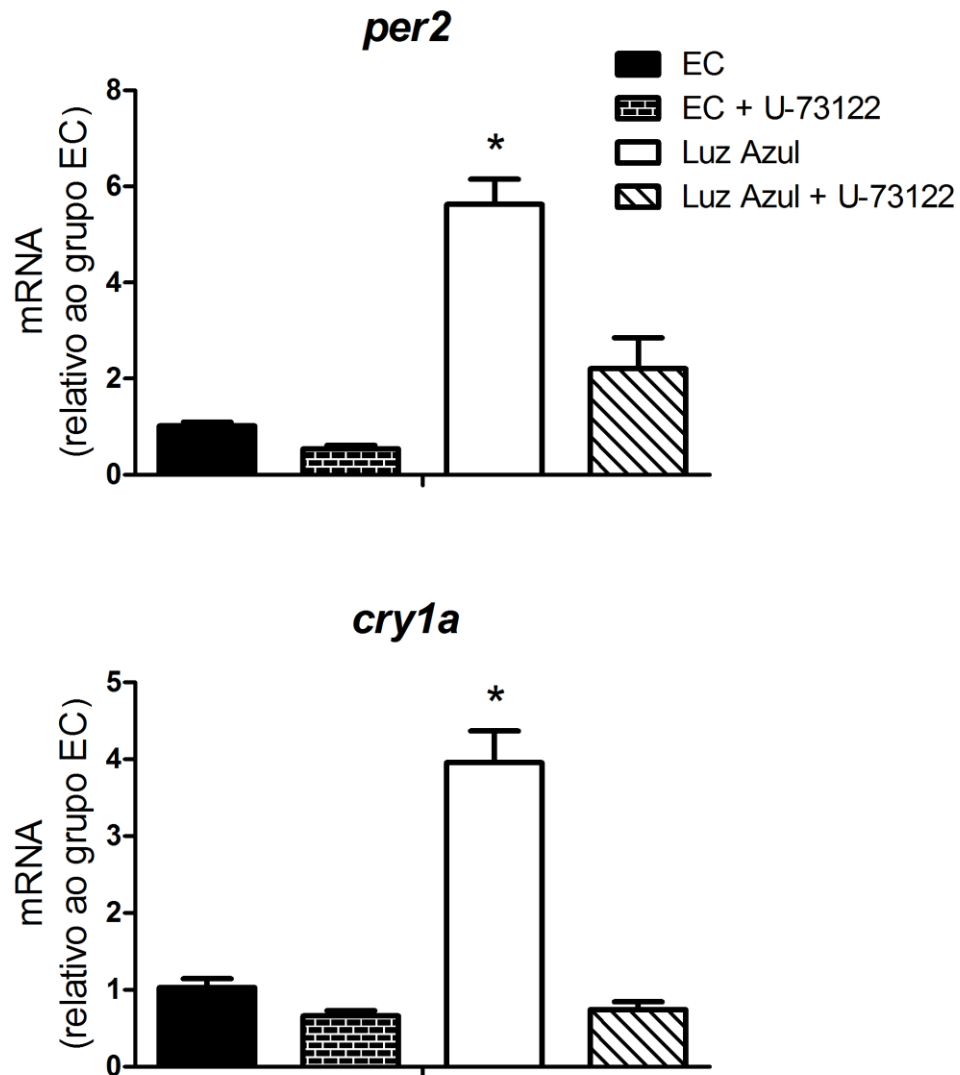
Inibidor de PLC - U-73122 (10^{-7} M)

Fig. 12 – PCR quantitativo dos genes *per2* e *cry1a* em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas com luz azul (450-475 nm, 87,85 a 95,17 μ watts/cm²) por 10 min na presença e na ausência do inibidor de fosfolipase C (PLC), U-73122, na concentração de 10^{-7} M. O RNA total foi extraído 2 horas após o estímulo para todos os grupos. Cada barra representa o valor médio (n=5-9) \pm EPM. (*) indica valores com diferenças significativas em relação a todos os outros grupos (p<0,0001).

Quelante de Cálcio - BAPTA-AM (10^{-6} M)

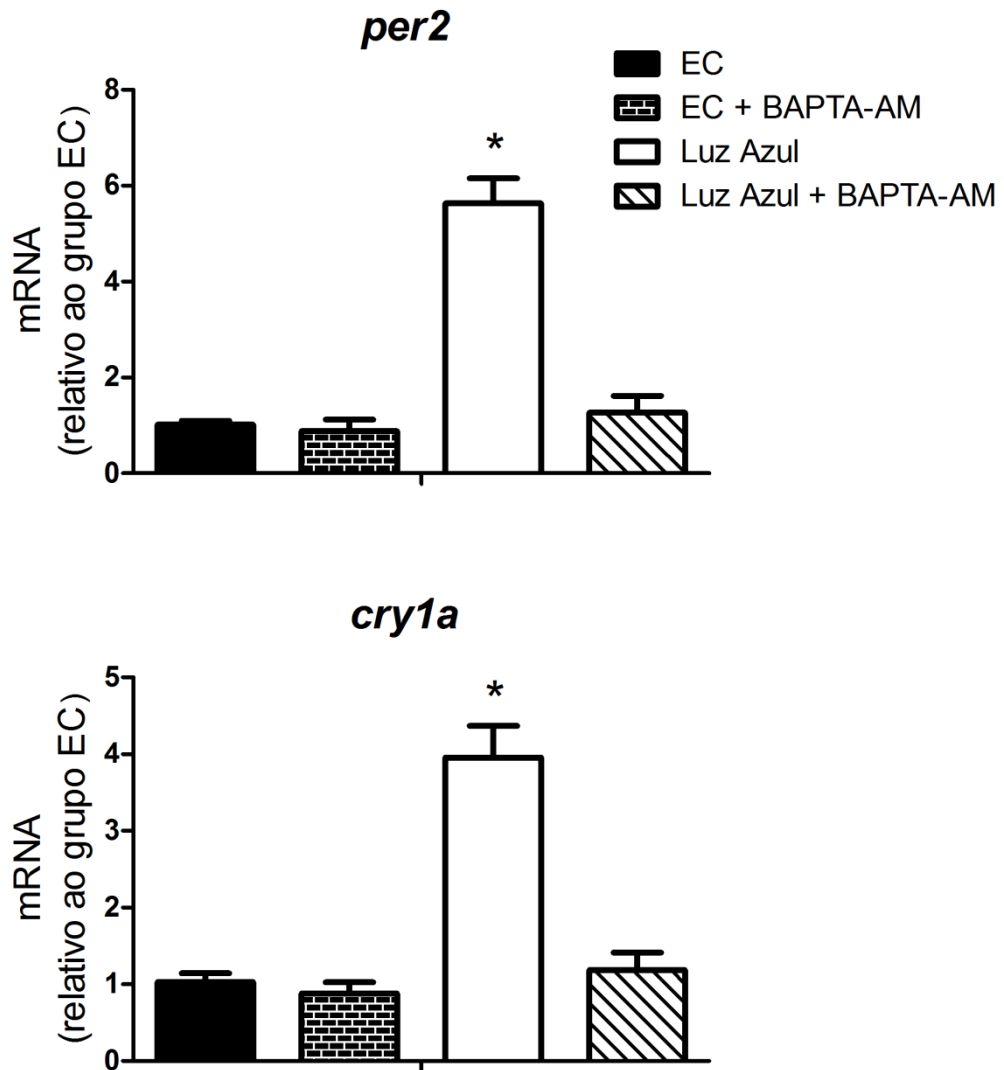


Fig. 13 – PCR quantitativo dos genes *per2* e *cry1a* em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas com luz azul (450-475 nm, 87,85 a 95,17 μ watts/cm²) por 10 min na presença e na ausência do quelante de cálcio BAPTA-AM, na concentração de 10^{-6} M. O RNA total foi extraído 2 horas após o estímulo para todos os grupos. Cada barra representa o valor médio (n=5-9) \pm EPM. (*) indica valores com diferenças significativas em relação a todos os outros grupos (p<0,0001).

Inibidor de PKC - RO 31-8220 (10^{-7} M)

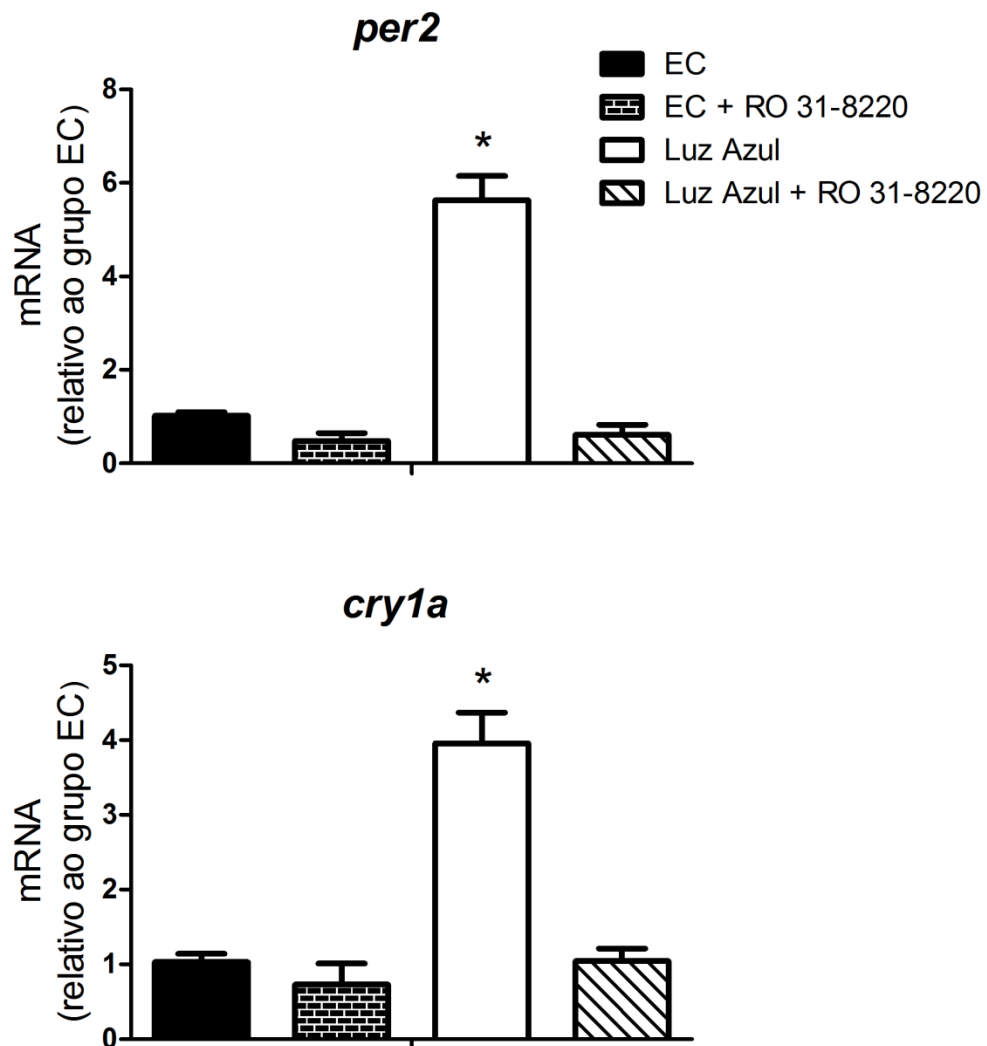


Fig. 14 – PCR quantitativo dos genes *per2* e *cry1a* em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas com luz azul (450-475 nm, 87,85 a 95,17 μ watts/cm²) por 10 min na presença e na ausência do inibidor de proteína quinase C (PKC), RO 31-8220, na concentração de 10^{-7} M. O RNA total foi extraído 2 horas após o estímulo para todos os grupos. Cada barra representa o valor médio (n=4-9) \pm EPM. (*) indica valores com diferenças significativas em relação a todos os outros grupos (p<0,0001).

A inibição provocada por esses três inibidores é uma forte evidência de que a via de sinalização por trás da modulação dos genes de relógio pela luz azul em células ZEM-2S é a dos fosfoinosítídeos. Comprovada a participação dessa cascata de sinalização na modulação dos genes de relógio, surge a pergunta: como esta via estaria induzindo a expressão dos genes *per2* e *cry1a*?

A evidência de um possível *crosstalk* entre vias de sinalização surgiu dos experimentos com melanóforos de *Xenopus*, nos quais foi detectado um aumento de GMPc que não estava relacionado com a dispersão dos grânulos de melanina nessas células. A hipótese levantada na época foi de que este aumento poderia estar associado à sincronização dos genes de relógio nos tecidos periféricos de *Xenopus*. De fato, no NSQ de mamíferos, o envolvimento de vias de sinalização como NO/GMPc, MAPK e AMPc/PKA têm sido amplamente descrito na literatura por controlarem e modularem as respostas circadianas do NSQ a estímulos luminosos (Golombeck & Rosenstein, 2010). Então, diante desses fatos, decidimos investigar a possibilidade de *crosstalk* entre essas vias de sinalização e a via dos fosfoinosítídeos nas células ZEM-2S.

Nossos resultados indicam a participação da via NO/GMPc nas respostas provocadas pela luz azul. O inibidor de CaMK II, KN-93 na concentração de 10^{-6} M (Fig. 15), inibiu o aumento da expressão dos genes *per2* e *cry1a* ($p < 0,0001$), assim como o L-NAME 10^{-3} M, um inibidor não específico de NOS (Fig. 16), preveniu o aumento da expressão de ambos os genes ($p < 0,0001$). Outro dado que evidenciou a participação do óxido nítrico (NO) em resposta à luz foi a análise da produção de NO por microscopia confocal (Fig. 17). Apesar de preliminares, os dados demonstram um forte aumento da produção de NO, entre 4,97 e 13,06 vezes nas células analisadas (Fig. 18), quando estimuladas pelo laser azul (488 nm) por 10 segundos. Curiosamente, apesar do papel aparente da NOS em resposta à luz, o ativador de guanil ciclase, Y-C1,

na concentração de $4 \cdot 10^{-5}$ M, que deveria mimetizar no escuro o efeito da luz nos genes de relógio, não teve qualquer efeito na expressão dos genes avaliados (Fig. 19).

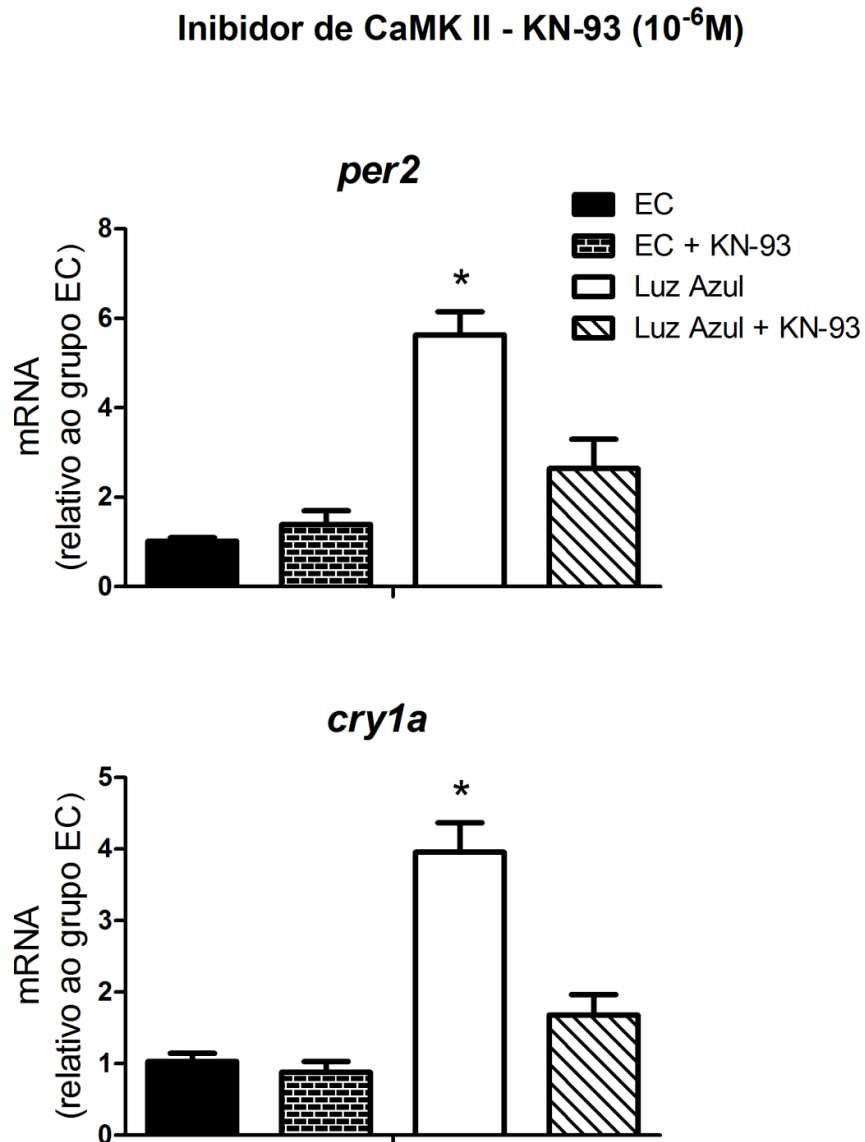


Fig. 15 – PCR quantitativo dos genes *per2* e *cry1a* em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas com luz azul (450-475 nm, 87,85 a 95,17 μ watts/cm²) por 10 min na presença e na ausência do inibidor da quinase dependente de cálcio/calmodulina II (CAMK II), KN-93, na concentração de 10^{-6} M. O RNA total foi extraído 2 horas após o estímulo para todos os grupos. Cada barra representa o valor médio (n=6-9) \pm EPM. (*) indica valores com diferenças significativas em relação a todos os outros grupos (p<0,0001).

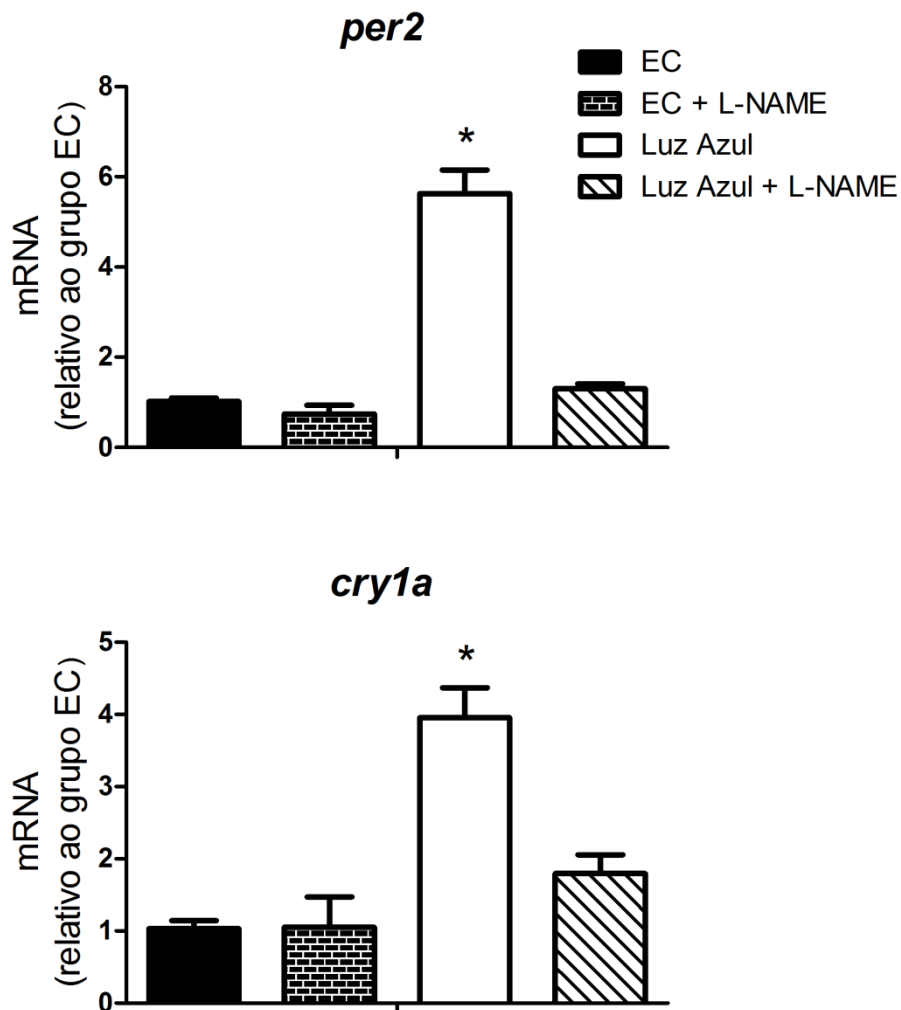
Inibidor de NOS - L-NAME (10^{-3} M)

Fig. 16 – PCR quantitativo dos genes *per2* e *cry1a* em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas com luz azul (450-475 nm, 87,85 a 95,17 μ watts/cm²) por 10 min na presença e na ausência do inibidor de óxido nítrico sintase (NOS), L-NAME, na concentração de 10^{-3} M. O RNA total foi extraído 2 horas após o estímulo para todos os grupos. Cada barra representa o valor médio (n=4-9) \pm EPM. (*) indica valores com diferenças significativas em relação a todos os outros grupos (p<0,0001).

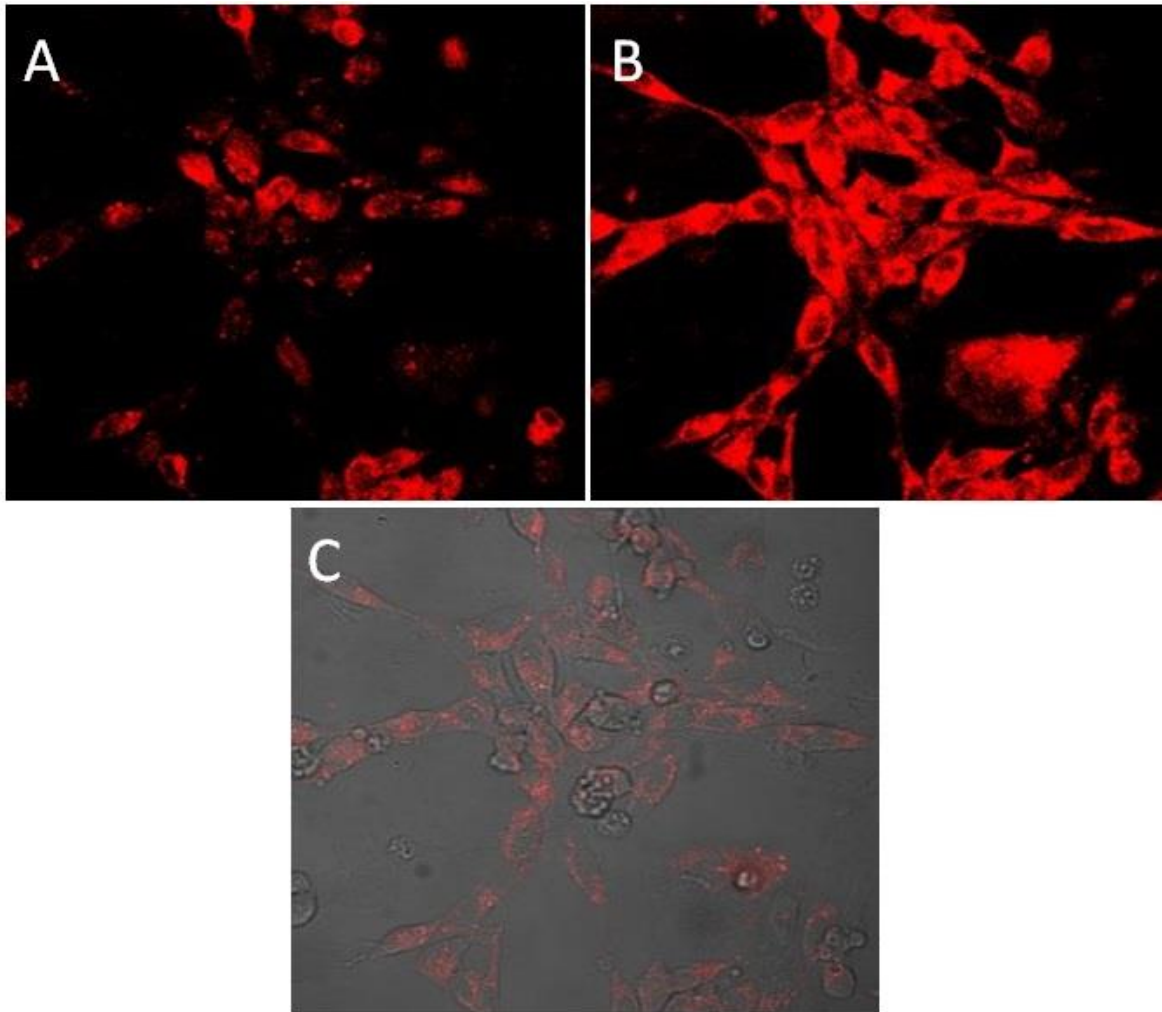


Fig. 17 – Produção de NO em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas por 10 s com laser argônio (azul, 488 nm) após terem sido incubadas com 5 μ M do marcador fluorescente de NO DAR-4AM e suplementadas com 10^{-4} M de *L*-arginina. Em A, células antes da estimulação. Em B, células 10 min após a estimulação. Em C, campo claro mais fluorescência. As células foram monitoradas em laser verde, 543nm 4,7mW e as imagens capturadas sob aumento de 630x.

Produção de Óxido Nítrico em células ZEM-2S

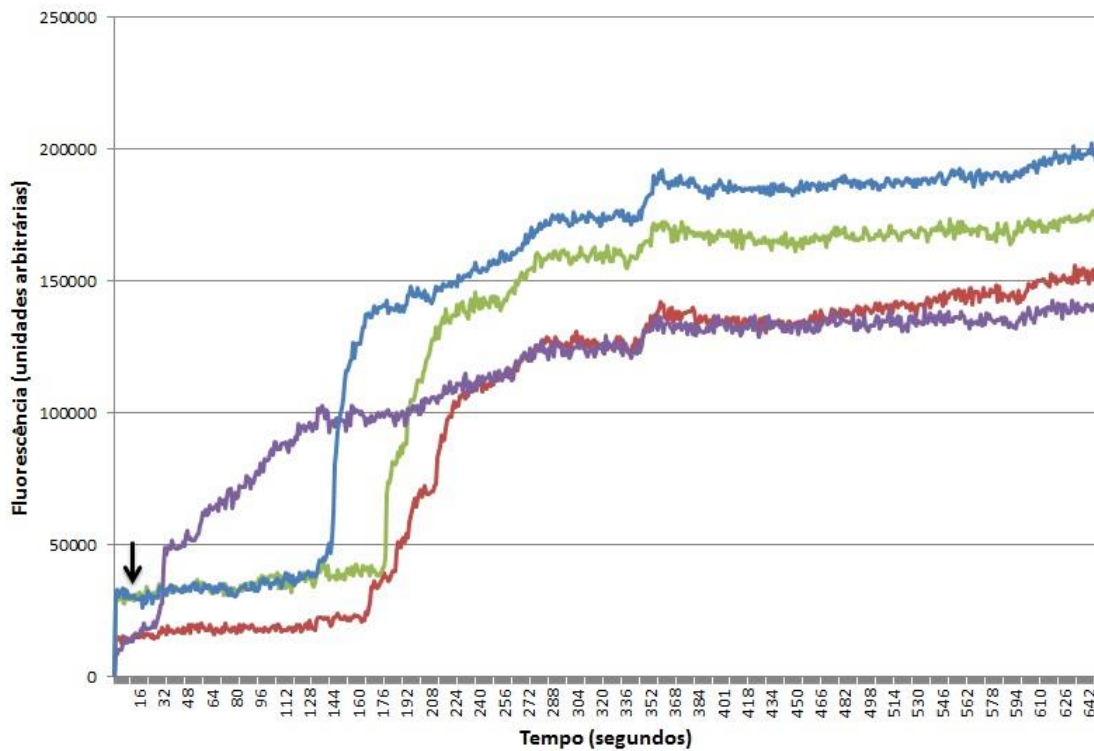


Fig. 18 – Produção de NO em células individualizadas de *Danio rerio*. As células foram estimuladas por 10 s (seta) com laser argônio (azul, 488 nm) (seta), após terem sido incubadas com 5 μ M do marcador fluorescente de NO DAR-4AM e suplementadas com 10^{-4} M de L-arginina. As células foram monitoradas em laser verde, 543 nm 4,7mW. A seleção das células individuais foi realizada com o auxílio da função ROI do programa LSM-510.

Ativador de Guanilil Ciclase - Y-C1 ($4 \cdot 10^{-5} \text{M}$)

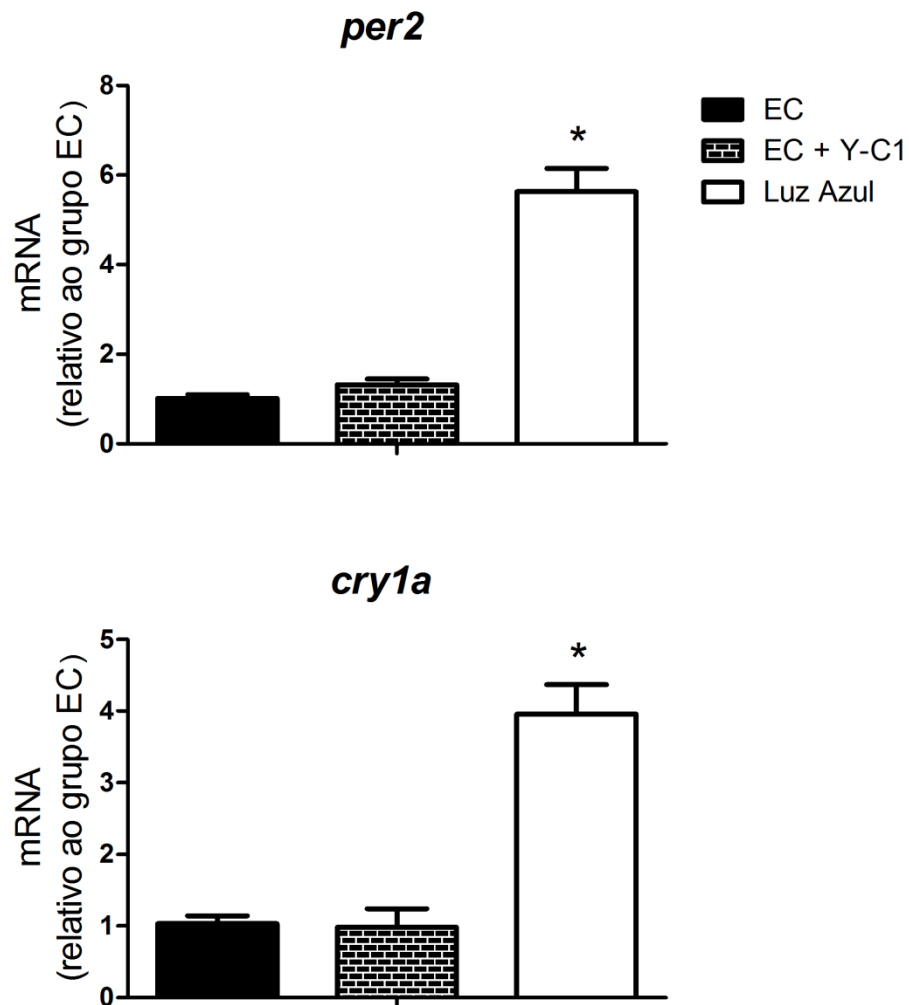


Fig. 19 – PCR quantitativo dos genes *per2* e *cry1a* em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas com luz azul (450-475 nm, 87,85 a 95,17 $\mu\text{watts}/\text{cm}^2$) por 10 min, ou permaneceram em EC na presença e na ausência do ativador de guanilil ciclase, YC-1, na concentração de $4 \cdot 10^{-5} \text{M}$. O RNA total foi extraído 2 horas após o estímulo para todos os grupos. Cada barra representa o valor médio ($n=4-9$) \pm EPM. (*) indica valores com diferenças significativas em relação aos outros dois grupos ($p < 0,0001$).

A via das MAPKs também parece estar envolvida com a ativação de genes de relógio, já que o inibidor de MEK, PD-98059 na concentração de $4.10^{-5}M$, inibiu o aumento da expressão de ambos os genes, *per2* e *cry1a* (Fig. 20).

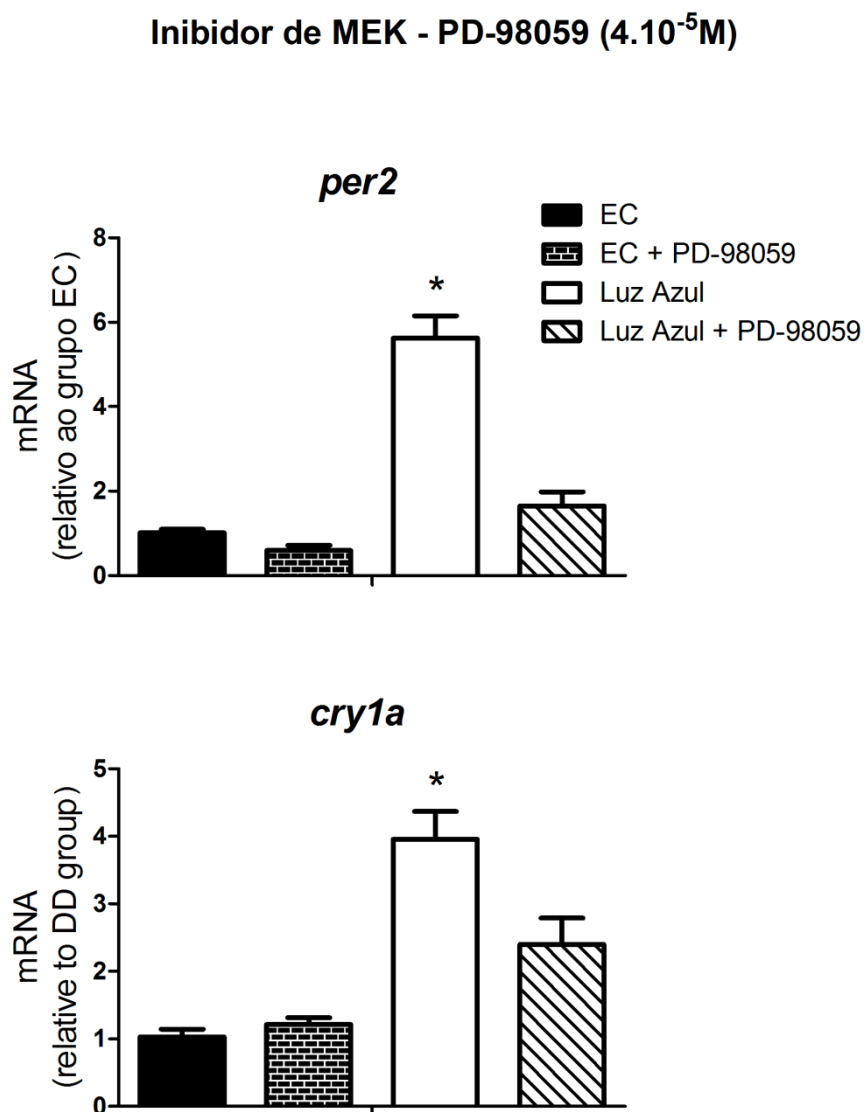


Fig. 20 – PCR quantitativo dos genes *per2* e *cry1a* em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas com luz azul (450-475 nm, 87,85 a 95,17 $\mu\text{watts}/\text{cm}^2$) por 10 min na presença e na ausência do inibidor de MEK, PD-98059, na concentração de $4.10^{-5} M$. O RNA total foi extraído 2 horas após o estímulo para todos os grupos. Cada barra representa o valor médio ($n=4-9$) \pm EPM. (*) indica valores com diferenças significativas em relação a todos os outros grupos ($p<0,0001$).

A via do AMPc/PKA é uma via bem conhecida na modulação dos genes de relógio. Contudo, os resultados obtidos na avaliação da participação dessa via de sinalização na resposta a luz azul foram contraditórios. A quantificação de AMPc após os pulsos de 1, 5 e 10 min mostrou que um pulso de luz azul de 10 minutos foi capaz de diminuir os níveis intracelulares de AMPc (Fig. 21), sugerindo que este nucleotídeo não participa da indução dos genes de relógio pela luz azul em células ZEM-2S. Já os dados obtidos pela inibição da adenilil ciclase por SQ-22536 2.10^{-5} M mostram que essa enzima, quando inibida, diminuiu o aumento provocado pelo estímulo luminoso (Fig. 22).

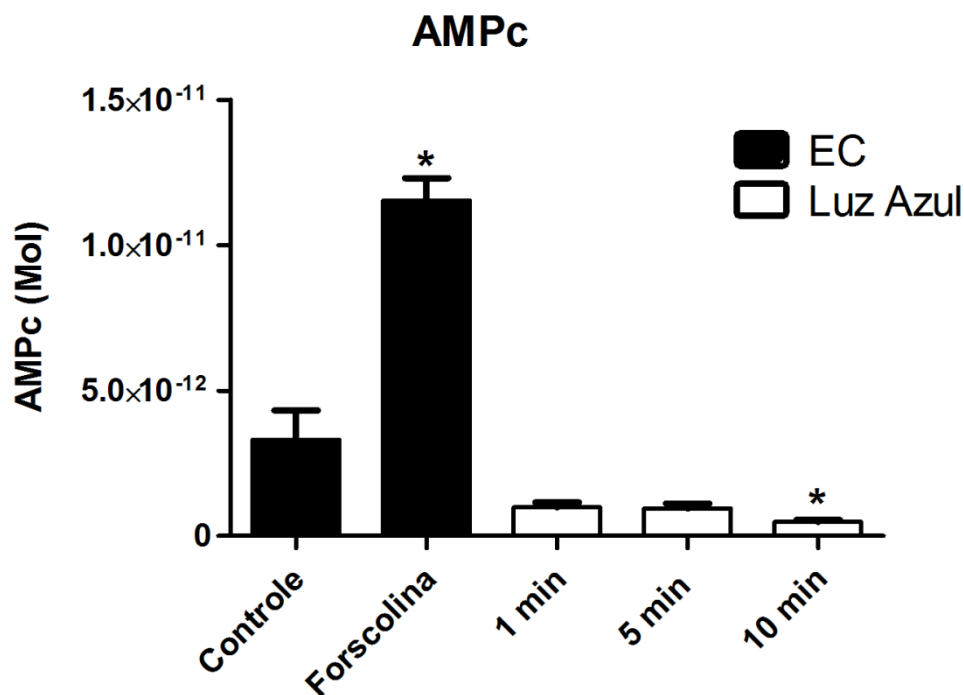


Fig. 21 – Quantificação de AMPc em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas com luz azul (450-475 nm, 87,85 a 95,17 μ watts/cm²) por 1, 5 e 10 minutos, e o AMPc foi medido imediatamente após o estímulo luminoso. Forscolina na concentração de 10^{-5} M foi utilizado como controle positivo em células mantidas em EC. As barras representam valores médios (n=3) \pm EPM. (*) indica valores com diferenças significativas em relação ao controle em EC (p<0,05).

Inibidor de Adenilil Ciclase- SQ-22536 ($2.10^{-5}M$)

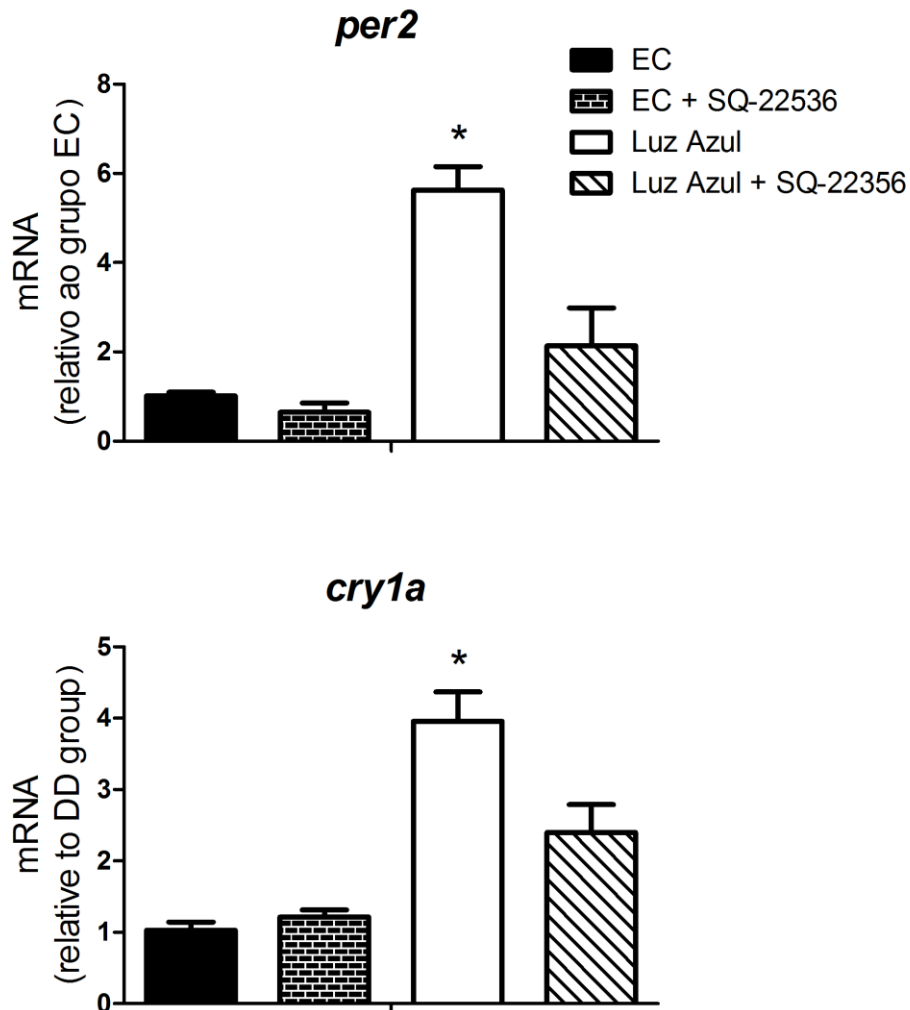


Fig. 22 – PCR quantitativo dos genes *per2* e *cry1a* em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas com luz azul (450-475 nm, 87,85 a 95,17 $\mu\text{watts}/\text{cm}^2$) por 10 min na presença e na ausência do inibidor de adenilil ciclase, SQ-22536, na concentração de 2.10^{-5} M. O RNA total foi extraído 2 horas após o estímulo para todos os grupos. Cada barra representa o valor médio ($n=4-9$) \pm EPM. (*) indica valores com diferenças significativas em relação a todos os outros grupos ($p<0,0001$).

Silenciamento das melanopsinas

Para realizar a análise funcional dos genes da melanopsina, o primeiro passo necessário foi a realização da transfecção dos siRNA nas células ZEM-2S. A primeira metodologia utilizada para transfecção dos siRNAs consistiu na utilização de nanotubos de carbono (NTCs) *single-wall* ou *multi-wall*. A diferença básica entre os dois NCTs reside no número de camadas que compõem o nanotubo: no *single-wall*, uma única camada, e no *multi-wall*, várias camadas. Os resultados obtidos demonstram que ambos os NTCs foram eficientes na transfecção dos RNAs de interferência em células ZEM-2S, promovendo a inserção dos siRNAs em praticamente 100% das células (Fig. 23).

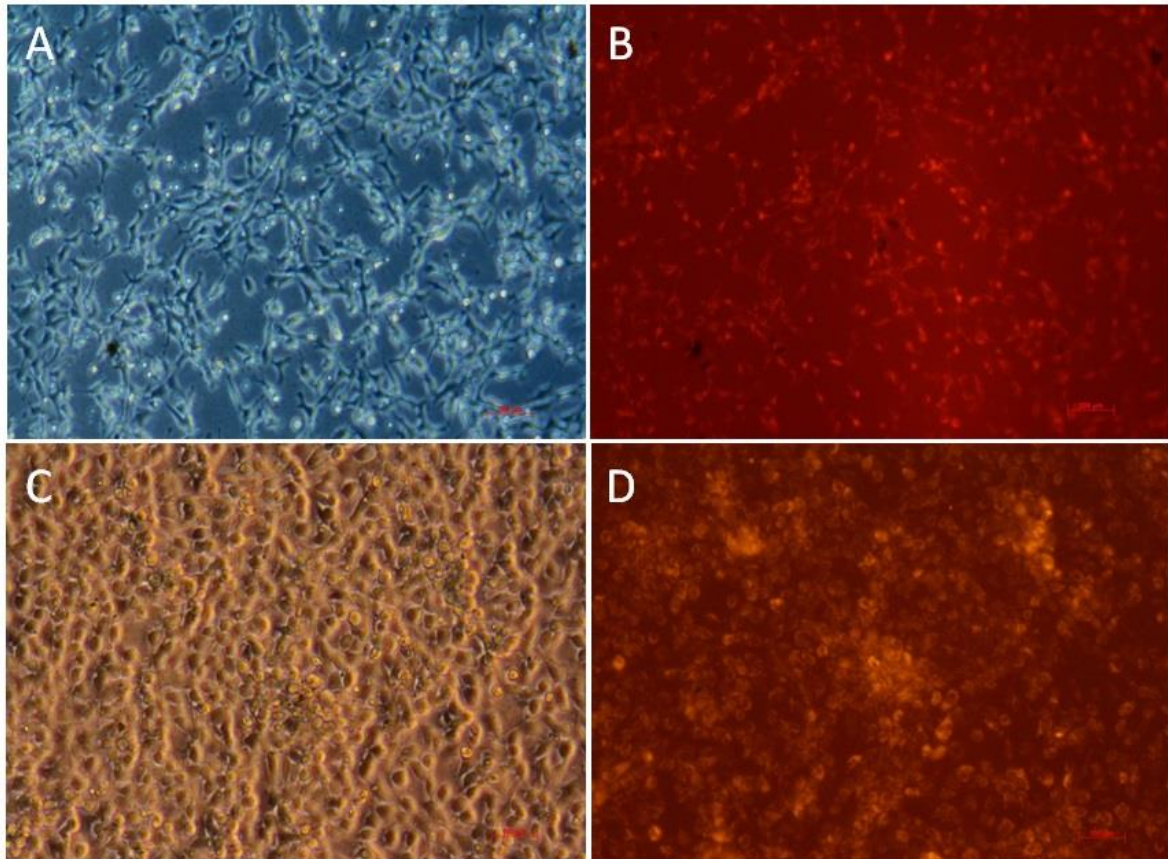


Fig. 23 – Transfecção de células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio* com siRNA associado a nanotubos de carbono (NTC). Em A e B, transfecção com NTCs *single-wall*, na concentração de 0,025 mg/mL e 100 nM de siRNA com marcação fluorescente Cy3 sob aumento óptico de 100x. Em C e D, transfecção com NTCs *multi-wall*, na concentração de 0,025 mg/mL e 100 nM de siRNA com marcação fluorescente Cy3 sob aumento óptico de 200x. As imagens foram capturadas 48 horas após a transfecção.

O segundo método utilizado foi o de transfecção química. Vários *kits* de transfecção foram utilizados, mas o único que apresentou resultados promissores foi o *kit GenMute*. Na realidade, a eficiência da transfecção superou nossas expectativas, sendo possível detectar a presença do RNAi em praticamente 100% das células analisadas. A transfecção foi monitorada por um período de 24, 48 e 72 h, sendo observada a incorporação gradual do siRNA dentro das células ao longo do período avaliado (Figs. 24, 25 e 26).

RESULTADOS

Após a confirmação do sucesso da transfecção com o *kit*, foi realizado um experimento piloto no intuito de avaliar o tempo necessário para o silenciamento dos genes *opn4m-1* e *opn4m-2*. Nesse experimento, foram utilizadas as seis sequências de RNAi disponíveis para os dois genes da melanopsina, na concentração final de 50 nM. A expressão dos genes foi avaliada 3, 6 e 12 h após a transfecção. Apesar de visualmente a incorporação dos siRNAs ocorrer de forma gradual ao longo de 72 horas, nossos resultados demonstraram que a utilização desse método é capaz de produzir efeitos rápidos, diminuindo os níveis de RNAm logo nas primeiras horas após a transfecção. No primeiro ponto avaliado, no caso, 3 horas após a transfecção, o silenciamento do gene *opn4m-2* atingiu valores próximos a 80%, que se mantiveram constantes nos demais tempos avaliados (Fig. 27). O silenciamento do gene *opn4m-1* também foi eficiente, porém devido a sua amplificação excessivamente tardia, não houve possibilidade de se realizar o cálculo do ΔC_T , elemento necessário para construção do gráfico de comparação.

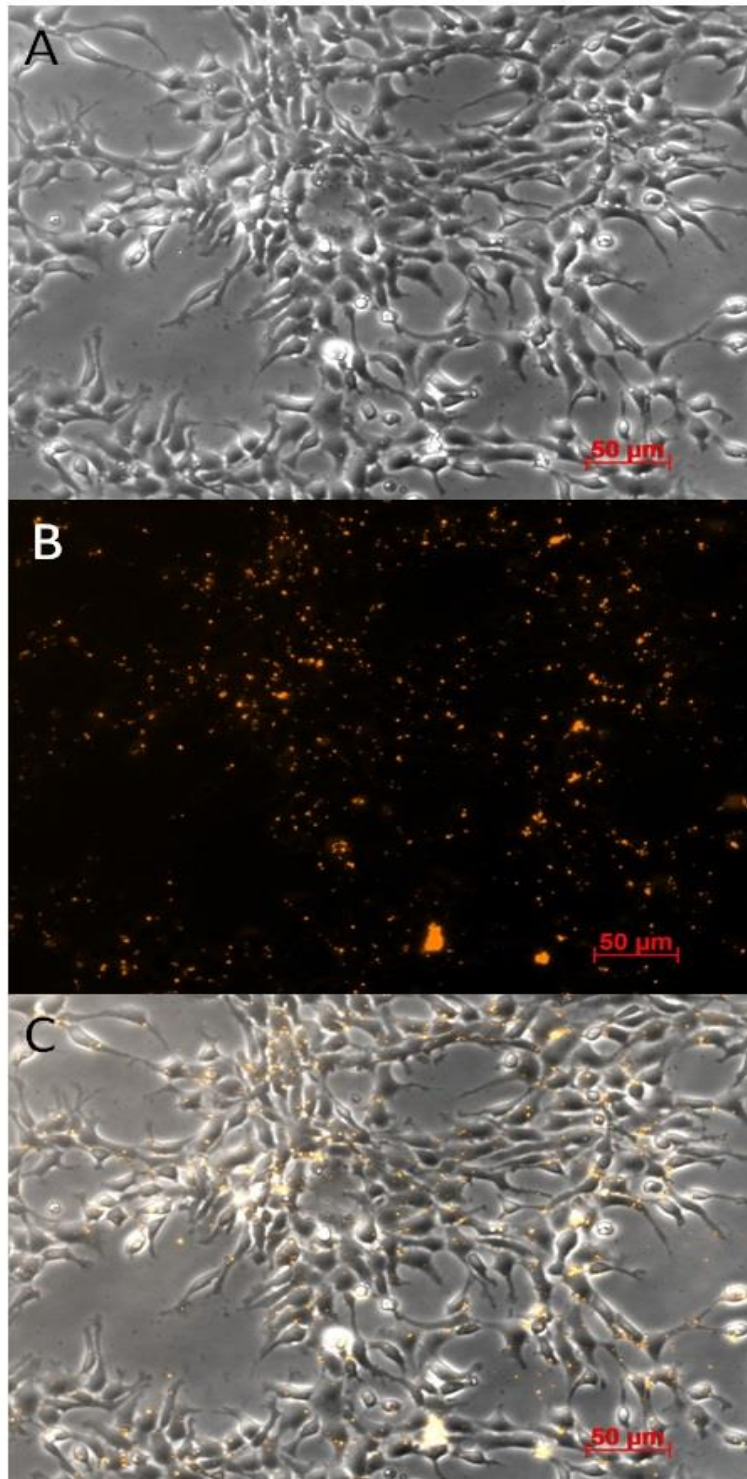


Fig. 24 – Transfecção de células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio* pelo kit químico *GenMute*. As células foram transfectadas com a sequência de siRNA marcado com Cy3 (*opn4m1-1*, Tabela 2). Em A, campo claro; em B, células transfectadas; em C, sobreposição dos campos A e B. As imagens foram registradas 24 horas após a transfecção, em microscópio de fluorescência invertido com aumento de 200x.

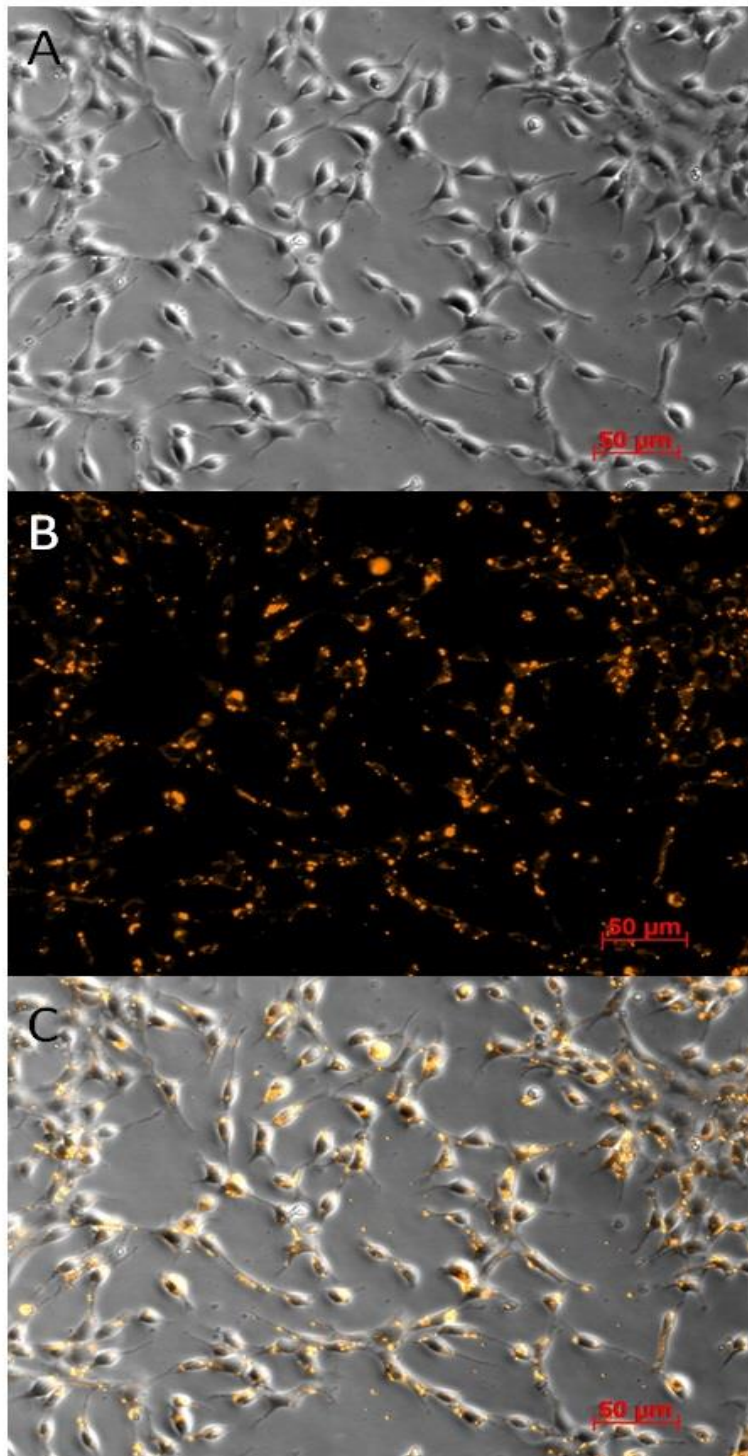


Fig. 25 – Transfecção de células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio* pelo kit químico *GenMute*. As células foram transfectadas com a sequência do siRNA marcado com Cy3 (*opn4m1-1*, Tabela 2). Em A, campo claro; em B, células transfectadas; em C, sobreposição dos campos A e B. As imagens foram registradas 48 horas após a transfecção, em microscópio de fluorescência invertido com aumento de 200x.

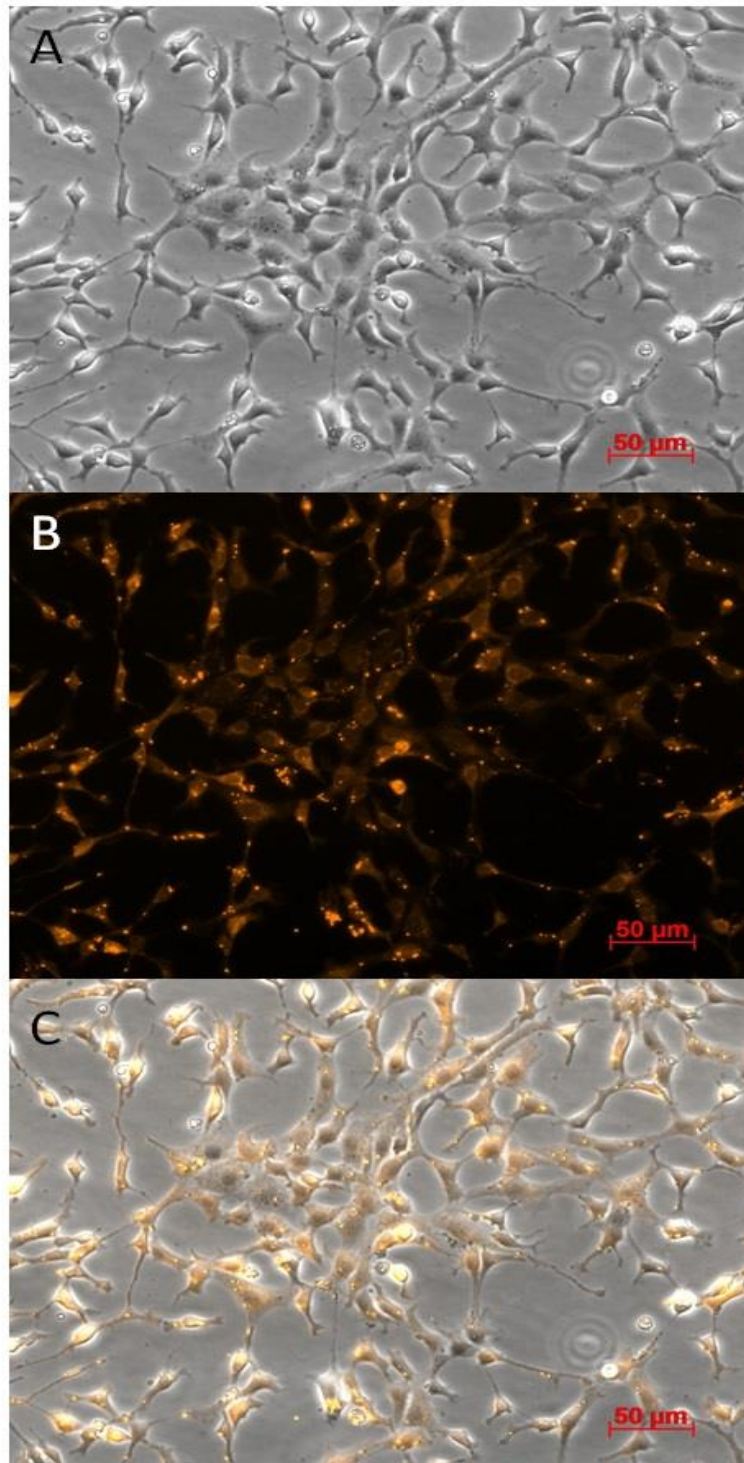


Fig. 26 – Transfecção de células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio* pelo kit químico *GenMute*. As células foram transfectadas com a sequência do siRNA marcado com Cy3 (*opn4m1-1*, Tabela 2). Em A, campo claro; em B, células transfectadas; em C, sobreposição dos campos A e B. As imagens foram registradas 72 horas após a tranfecção, em microscópio de fluorescência invertido com aumento de 200x.

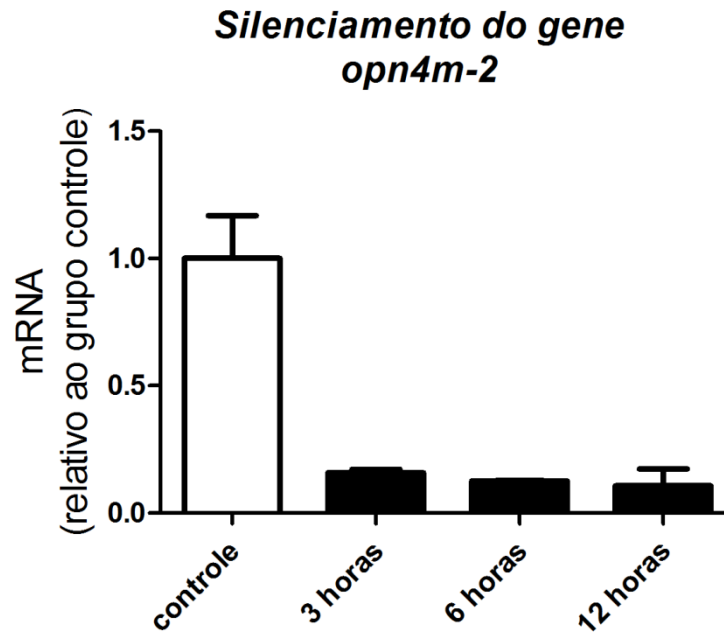


Fig. 27 - PCR quantitativo do gene *opn4m-2* em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram transfectadas com os três siRNAs disponíveis para o gene na concentração de 50 nM cada. O RNA foi extraído 3, 6 e 12 horas depois da transfecção. A barra clara representa o grupo controle, as barras escuras, os grupos transfectados com siRNA. Cada barra corresponde ao valor médio ($n=2$) \pm EPM.

Depois de determinado o silenciamento dos genes da melanopsina, o próximo passo foi a verificação do papel da melanopsina em resposta ao estímulo de luz azul e a sua possível influência sobre os genes de relógio. Os experimentos foram conduzidos de forma semelhante aos experimentos de estimulação por luz azul, sendo que a única diferença foi a transfecção dos siRNAs, que ocorreu 24 h antes da estimulação por luz azul. Nesse experimento, as células foram transfectadas com todas as seis sequências de siRNA disponíveis para os dois genes da melanopsina.

A análise da expressão dos genes *per2* e *cry1a* demonstrou que a presença dos siRNAs foi capaz de inibir completamente o aumento provocado pela luz azul (Fig. 28). Apesar do resultado aparentemente positivo, a presença dos siRNAs diminuiu a

RESULTADOS

expressão dos genes *per2* e *cry1a* abaixo do nível de expressão do grupo controle ($p < 0,0431$ e $p < 0,0294$, respectivamente). Esse resultado indicou a possibilidade de que os siRNAs estivessem atuando de forma inespecífica, silenciando outros genes além dos genes da melanopsina. Esse fato foi comprovado pela análise da expressão de outros genes na presença dos siRNAs como *per1b*, *cry1b* e do receptor de cortisol de *D. rerio*, os quais foram igualmente silenciados pelos siRNAs utilizados (dados não mostrados).

Pulso de Luz Azul + siRNA

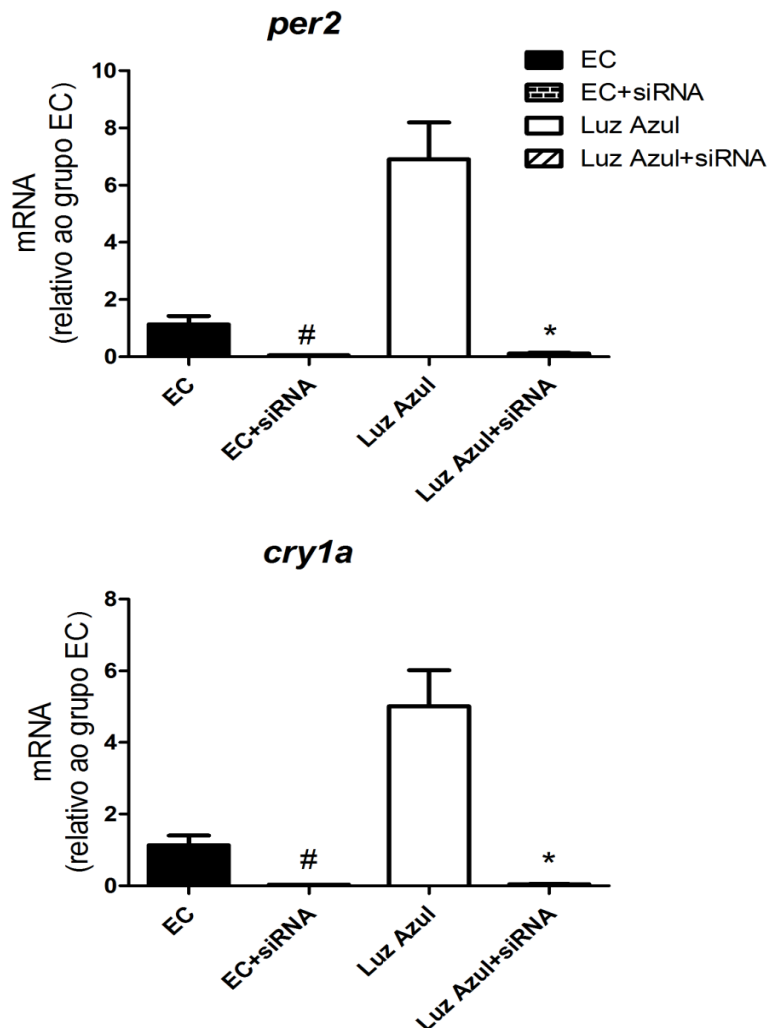


Fig. 28 – PCR quantitativo dos genes *per2* e *cry1a* em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. As células foram estimuladas com luz azul (450-475 nm, 87,85 a 95,17 $\mu\text{watts}/\text{cm}^2$) por 10 min na presença ou na ausência dos seis siRNA disponíveis para os genes *opn4m-1* e *opn4m-2*, na concentração individual de 50 nM. O RNA total foi extraído 2 horas após o estímulo. Cada barra representa o valor médio ($n=3-6$) \pm EPM. (*) indica diferença significativa entre o grupo Luz Azul e o grupo Luz Azul+siRNA (teste *t*, $p<0,0061$ e $p<0,0079$ para *per2* e *cry1a* respectivamente). (#) indica diferença significativa entre o grupo EC e o grupo EC+siRNA (teste *t*, $p<0,0431$ e $p<0,0294$ para *per2* e *cry1a* respectivamente).

Estabelecimento da Linhagem ZEM-2S *per1:luc*

A tentativa do estabelecimento de uma linhagem transfectada estável de células ZEM-2S tinha como principal objetivo sua utilização no *Lumycicle*, uma tecnologia nova no país, estabelecida em nosso laboratório, pela qual se pode medir em tempo real e por longos períodos a expressão de qualquer gene, neste caso o gene de relógio *per1*. Para realizar a transfecção do plasmídeo *zfp_{er1}:luc* diversos métodos foram utilizados, como eletroporação, nanotubos de carbono e *kits* químicos.

Os resultados demonstraram que em células ZEM-2S a quantidade de DNA plasmidial transfectada tem influência direta na transfecção. A concentração de 8 µg resultou numa eficiência de transfecção de 58%, enquanto que as transfeções com 1, 2 e 4 µg obtiveram valores de 13,5%, 22% e 43% respectivamente (Fig. 29). Apesar desse resultado, a concentração escolhida para transfecção de *zfp_{er1}:luc* foi de 4 µg, dada a disponibilidade que tínhamos do plasmídeo.

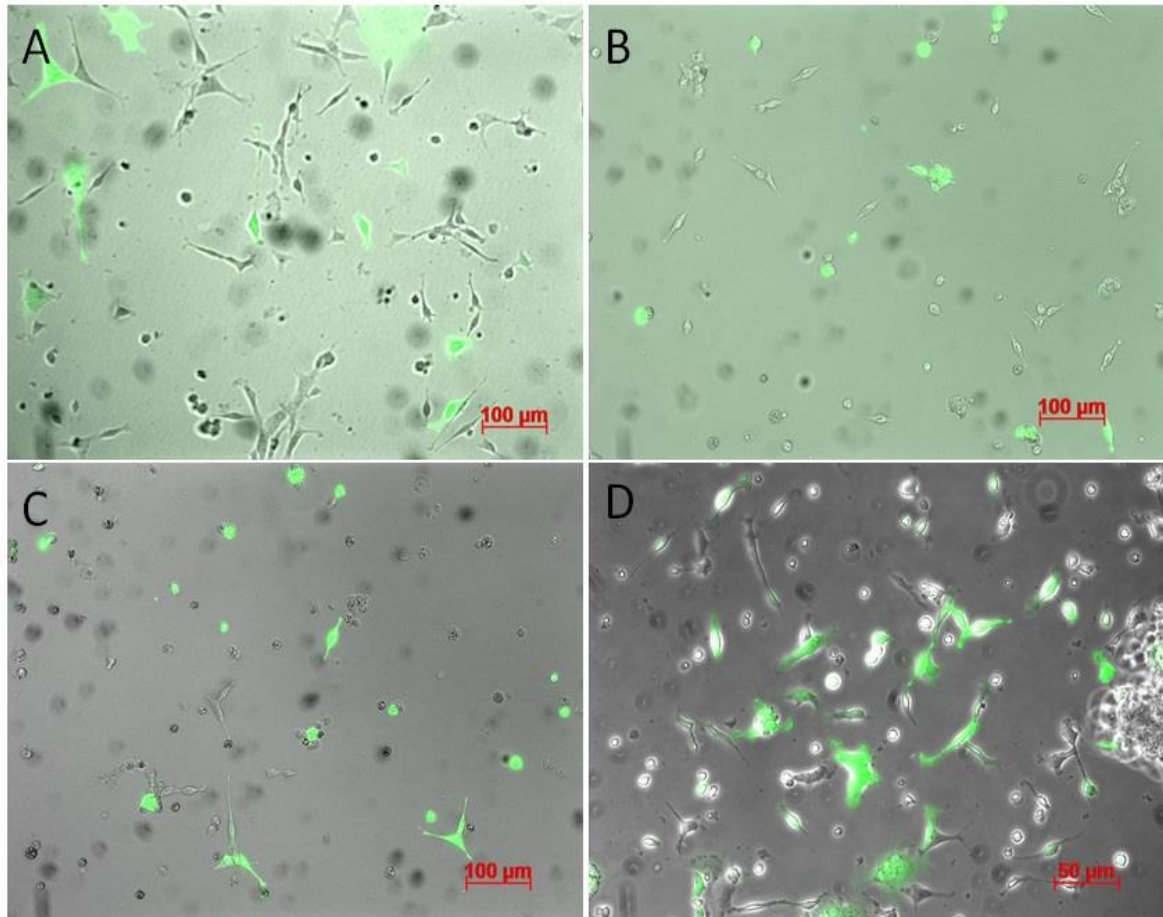


Fig. 29 – Comparação da eficiência da transfecção por eletroporação em células ZEM-2S. As marcações verdes indicam as células transfectadas. Em A, B, C e D, transfecção com 1, 2, 4 e 8 μg do plasmídeo *pmaxGFP* respectivamente. A eficiência da transfecção foi determinada pela razão entre o número total de células e o número de células transfectadas. A contagem foi realizada em no mínimo 3 campos e as imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência em aumentos de 100x e 200x.

Apesar do processo de transfecção ter se mostrado eficiente, não obtivemos sucesso no crescimento dos clones transfectados. Aparentemente mesmo com o gene de resistência, as células não sobreviveram por mais de 15 dias sob a ação da geneticina. Em decorrência desse fato, embora novos experimentos tenham sido conduzidos, variando-se a concentração e a proporção entre os plasmídeos *zfper1:luc* e *pcDNA* na

RESULTADOS

tentativa de aumentar a sobrevivência das células ao processo de eletroporação e aumentar sua resistência à geneticina, não obtivemos sucesso.

Outras metodologias testadas como transfecção por nanotubos de carbono e *kits* químicos foram consideradas ineficientes para transfecção de DNA plasmidial em células ZEM-2S.

Discussão

Melanopsina e Relógios Periféricos

Durante anos, o *zebrafish* foi usado como modelo em muitas áreas do conhecimento e, na última década, a sua utilização se expandiu à nova área dos relógios periféricos. A discussão sobre relógios periféricos ganhou ainda mais importância pelas crescentes evidências de que o sistema circadiano pode agir de forma recíproca, onde os relógios periféricos e central interagem para promover uma resposta comportamental adequada. Nos mamíferos, por exemplo, a disponibilidade de alimentos exerce um efeito de arrastamento poderoso sobre o comportamento (Stokkan *et al.*, 2001) e pode reduzir a ativação dos NSQs ocasionada pelas células da retina, promover a desorganização transitória dos estímulos de saída (eferentes) dos NSQs, e reduzir a sensibilidade ao estímulo dos NSQs em regiões hipotalâmicas responsáveis pela integração da informação homeostática e circadiana (Blum *et al.*, 2012). Também já foi demonstrado que cultura de células podem ser sincronizadas independentemente de um oscilador central, fibroblastos de camundongo foram sincronizados por choque de soro (Balsalobre *et al.*, 1998) e células de *D. rerio* foram sincronizadas por luz (Whitmore *et al.*, 2000). Dois trabalhos mostraram que células em cultura agem como populações, onde cada célula individual tem seu ritmo próprio na ausência de um estímulo, resultando em um tamponamento do ritmo populacional. Porém quando estimuladas, todas as células assumem a mesma fase de oscilação, sincronizando toda a população e dando origem aos ritmos observados. Novamente na ausência de estímulo, o ritmo populacional é perdido gradualmente, o que explica a perda de ritmo nos relógios periféricos quando colocados em condições constantes (Welsh *et al.*, 2004; Carr & Whitmore, 2005). Esses trabalhos evidenciam a precisa comunicação que deve existir entre osciladores centrais e periféricos na manutenção da homeostase do organismo. Em organismos como *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* e *Xenopus laevis*, nos quais os

relógios periféricos são sincronizados por luz, o impacto dessa regulação pode ser ainda maior, o que torna o estudo sobre o mecanismo de funcionamento dos relógios periféricos uma questão de grande importância.

A melanopsina já foi encontrada nos relógios periféricos de organismos como *Gadus morhua* (Bellingham *et al.*, 2006), *Xenopus laevis* (Provencio *et al.*, 1998) e *Gallus gallus* (Lima *et al.*, 2006) e nossos resultados detectaram a presença das duas proteínas codificadas pelos genes *opn4m-1* e *opn4m-2* em células de *Danio rerio*, o que por si só já evidenciaria que a melanopsina desempenha uma função relevante nessas células. Mas curiosamente, quando se trata desse fotopigmento, o fato que mais chama atenção está relacionado com a sua distribuição nas células. A proteína Opn4m-1 se apresenta distribuída ao longo da membrana celular e regiões próximas ao núcleo, o que é típico e esperado de um fotopigmento, o qual, na membrana, exerce sua função de captação do fóton de luz e, próximo ao núcleo, encontra-se, provavelmente, dentro de cisternas do aparelho de Golgi. Contudo algo completamente diferente é visto para a proteína Opn4m-2, a qual se encontra claramente concentrada na região do núcleo. A presença de um fotopigmento no núcleo ou na membrana nuclear é algo que até o momento não foi descrito na literatura e, caso esses dados sejam confirmados por experimentos de competição para determinar a especificidade do anticorpo primário à melanopsina, esse será um achado extremamente interessante e a sua função será alvo de intensos debates. Hoje se sabe que o peixe *Danio rerio* possui cinco genes que codificam a melanopsina (Davies *et al.*, 2011) e resultados recentes obtidos pelo nosso grupo através de PCR quantitativo indicam que os outros três genes *opn4m-3*, *opn4x-1* e *opn4x-2* também são expressos em células ZEM-2S, muito embora com níveis de expressão relativamente mais baixos. Logo, novas análises são necessárias para

detecção e localização das proteínas Opn4m-3, Opn4x-1 e Opn4x-2 para formação de um quadro completo acerca da melanopsina em células ZEM-2S de *D. rerio*.

Fototransdução

Nesta tese, demonstramos que a melanopsina é um possível candidato para mediar as foto-respostas em relógios periféricos de *Danio rerio*. Nesse sentido, um passo importante foi a determinação do comprimento de onda a ser aplicado para estimulação das células. A melanopsina é um fotopigmento que tem seu pico de absorção máxima próximo de 480 nm, contudo diversos experimentos em mamíferos mostraram que esse pico pode variar de 420 a 500 nm dependendo da metodologia utilizada (para revisão ler Hankins *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2012). A estimulação das células na faixa de 450-475 nm foi determinada através de resultados anteriores do nosso laboratório, que demonstraram que a dispersão máxima de melanossomos em melanóforos de *Xenopus laevis*, em resposta à luz, ocorre entre 450 e 470nm (Isoldi *et al.*, 2005). Contudo, um trabalho mais recente demonstrou que o pico de absorção para as cinco melanopsinas de *Danio rerio* varia entre 470-484 nm (Davies *et al.*, 2011). Apesar dessa diferença entre os dados da literatura e a faixa de comprimento de onda utilizada em nossos experimentos, é improvável que o comprimento de onda utilizado (450-475 nm) não estimule a melanopsina, já que aqueles autores mostram que a curva de absorção para as melanopsinas cobre a gama de 400 a 550 nm. Corroborando ainda o comprimento de onda utilizado em nossos experimentos, Cavallari e colaboradores associaram a melanopsina com a sincronização de células de *D. rerio* utilizando luz azul com pico espectral em 468 nm (Cavallari *et al.*, 2011). A intensidade do pulso de luz também foi um fator levado em conta em nossos experimentos. Experimentos preliminares mostraram que a estimulação com intensidades de 13.000 lux por 10 min,

assim como a estimulação prolongada de uma hora com intensidade de 650 lux (dados não mostrados), não alteram de forma significativa o aumento da expressão dos genes *per2* e *cry1a* vistos através da estimulação com o pulso de 10 min e intensidade de 650 lux. Na literatura, trabalhos que utilizaram intensidades luminosas muito altas foram alvo de críticas por exporem as células a uma condição considerada estressante e não fisiológica (Tamai *et al.*, 2007). Por esse motivo optamos por utilizar intensidades mais baixas, que diminuiriam as chances de uma possível participação do estresse oxidativo nas respostas observadas.

Outro passo fundamental foi a escolha dos genes de relógio avaliados durante o experimento. Baseamo-nos em dados anteriormente publicados pelo nosso grupo, os quais demonstraram que a expressão dos genes *per1* e *cry1b* pode ser sincronizada aos ciclos de claro e escuro (Farhat *et al.*, 2009). A literatura mostra que o peixe *Danio rerio* possui quatro genes “*per*”, *per1a*, *per1b*, *per2* e *per3*, e seis genes “*cry*”, *cry1a*, *cry1b*, *cry2a*, *cry2b*, *cry3* e *cry4*. Todos esses genes são arrastados por luz, mas dois deles, *per2* e *cry1a*, são diretamente induzidos por luz (Vatine *et al.*, 2011), motivo pelo qual foram incluídos em nossas análises. De fato, os dados que obtivemos estão de acordo com a literatura: os genes *per1b* e *cry1b* foram levemente modulados pelo pulso de luz azul, enquanto que os genes *per2* e *cry1a* apresentaram aumentos expressivos. O papel fisiológico do rápido aumento desses genes em resposta a luz permanece elusivo, todavia alguns trabalhos mostraram que os genes *per2* e *cry1a* possuem um papel fundamental na sincronização do relógio em resposta a luz. O gene *per2*, por exemplo, parece estar envolvido com o início da sincronização por luz da glândula pineal (Ziv & Gothilf, 2006), enquanto que o gene *cry1a* seria um elemento chave na sincronização por luz em células em cultura (Tamai *et al.*, 2007) em *Danio rerio*, o que estaria também de acordo com os nossos resultados, haja visto o rápido aumento na expressão

de *cry1a* uma hora após a estimulação. Mas independente do papel que esses genes exercem, como a luz é capaz de alterar as suas expressões nas células ZEM-2S de *D. rerio*?

O fotopigmento responsável pela captação da luz em relógios periféricos de *D. rerio* continua em debate no meio científico. O aumento da expressão dos genes *per2* e *cry1a* em decorrência do pulso de luz azul é uma evidência de que é a melanopsina que está intermediando esse processo, já que a luz azul coincide com seu espectro de absorção. Porém, a luz azul não exclui alguns dos outros candidatos a "fotopigmento circadiano" em relógios periféricos de *D. rerio* citados no início deste trabalho, no caso, outras opsinas com espectro de absorção na faixa do azul, como a Tmt (Moutsaki *et al.*, 2003; Cavallari *et al.*, 2011); Crys, que também são ativados pelo espectro azul (Withmore *et al.*, 2000; Cermakian *et al.*, 2003; Tamai *et al.*, 2005), e o mecanismo de estresse oxidativo (Hirayama *et al.*, 2007). Assim, no intuito de excluir possíveis candidatos, passamos a avaliar a via de sinalização que leva a alteração da expressão dos genes *per2* e *cry1a* pelo pulso de luz azul.

Como o foco principal deste trabalho era avaliar a melanopsina, optamos por analisar a via de sinalização desencadeada por esse fotopigmento. Como dito anteriormente, a melanopsina possui maior homologia com as opsinas de invertebrados do que com opsinas de vertebrados, e envolve a ativação de uma proteína Gq/G₁₁ e a consequente ativação da via dos fosfoinosítídeos em mamíferos e em melanóforo de *Xenopus laevis*. Após a foto-estimulação da melanopsina, e ativação da proteína Gq, o passo subsequente nessa via é a ativação da PLC. Diversos estudos já relataram a importância dessa enzima na via de sinalização da melanopsina em mamíferos (Graham *et al.*, 2008), aves (Contín *et al.*, 2006), anfíbios (Isoldi *et al.*, 2005) e em *Amphioxus* (Nasi & Del Pilar Gomez, 2009). Nossos dados, corroborando a literatura, demonstram

que a presença de inibidor de PLC, U-73122, bloqueia a resposta evocada pela luz, confirmando a importância fundamental da PLC na fotoativação dos genes de relógio em células ZEM-2S. O inibidor utilizado neste experimento tem um amplo espectro de ação, inibindo inespecificamente todas as isoformas da PLC. Atualmente, a isoforma proposta para participar da via de sinalização da melanopsina é a PLC β_4 , devido a sua alta expressão na retina de mamíferos quando comparada a outras isoformas, devido a semelhança entre ela e a enzima PLC β norpA em *Drosophila* e por que o nocaute dessa enzima aboliu a fotoresposta em um subtipo de células ganglionares positivas para melanopsina na retina de comundongos (Hughes *et al.*, 2012). Além de PLC, vários estudos têm demonstrado que a ativação melanopsina leva a um aumento transitório no cálcio intracelular (Sekaran *et al.*, 2003; Panda *et al.*, 2005; Melyan *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2005; Isoldi *et al.*, 2005). A concentração de cálcio citoplasmático é fortemente regulada pela célula, e dois tipos de receptores medeiam a liberação de cálcio a partir do retículo endoplasmático: inositol 1,4,5 trisfosfato (IP₃) e receptores rianodina (Berridge *et al.*, 2002). IP₃, assim como o diacilglicerol (DAG), são produtos da clivagem do fosfolípido de membrana fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) pela PLC, e o seu papel na liberação de cálcio em resposta à luz foi demonstrado em alguns estudos (Isoldi *et al.*, 2005; Kumbalasiri *et al.*, 2007). Contudo, a participação desses dois componentes na via de sinalização da melanopsina permanece indefinida, pois a aplicação de análogos de DAG ou de inibidores de IP₃ em células ganglionares fotossensíveis da retina de mamíferos (pRGCs) não promoveu a despolarização dessas células, ou bloqueou a resposta, respectivamente, indicando que esses componentes não são necessários na fototransdução (Graham *et al.*, 2008). Estes dados sugerem que o aumento do cálcio intracelular ocorra através da abertura de canais TRPs, e que esses sejam regulados pela diminuição de PIP₂ na membrana, ou pela liberação de ácidos

graxos provenientes da clivagem de DAG (Hughes *et al.*, 2012). A inibição do aumento de expressão dos genes *per2* e *cry1a* por BAPTA-AM demonstrou a relevância do aumento da concentração citosólica de cálcio para a foto-resposta em células ZEM-2S. Além disso, experimentos preliminares realizados pelo nosso grupo em microscopia confocal comprovaram o aumento citoplasmático transitório de cálcio nessas células. Porém através dessas metodologias não pudemos avaliar se o cálcio sinalizador para esta resposta advém de estoques intracelulares ou do espaço extracelular e novos experimentos seriam necessários para determinar a participação do DAG, IP₃ e mesmo dos canais TRPs nessas células.

Outra enzima que provamos desempenhar um importante papel na ativação dos genes de relógio em nosso modelo é a PKC. A PKC compreende uma grande família de proteínas, que se subdivide em três sub-famílias: (i) PKC clássica (cPKC), ativada por cálcio, diacilglicerol, fosfatidilcolina e ésteres de forbol; (ii) nova PKC (nPKC), ativada pelos mesmos compostos da cPKC, mas insensível ao cálcio, (iii) PKC atípica (aPKC), ativada apenas por fosfatidil serinas (Nishizuka, 1988). Em células ZEM-2S, o papel dessa enzima foi demonstrado pela presença do inibidor não específico de PKC, Ro 31-8220, que bloqueou o aumento da expressão dos genes *per2* e *cry1a* em resposta ao estímulo de luz azul. Entre todas as isoformas de PKC, a mais provável de participar da ativação dos genes de relógio é PKCzeta. Em camundongos, o silenciamento do gene da PKCzeta (*Prkcz*) gerou um comportamento semelhante ao fenótipo de animais nocautes para melanopsina (Peirson *et al.*, 2007), e a sua presença já foi relatada no sistema nervoso central de *Danio rerio* (Patten *et al.*, 2007).

A análise desses três componentes, PLC, cálcio e PKC, indica que o aumento da expressão dos genes *per2* e *cry1a* induzido por luz azul ocorre através da via dos fosfoinositídeos. Se somarmos estes dois resultados, estimulação em espectro de

absorção específico (azul) e a via da PLC desencadeada por esse estímulo, novamente a melanopsina pode ser colocada como um forte candidato na indução dos genes de relógio *per2* e *cry1a* em células ZEM-2S nas condições experimentais avaliadas. Outros possíveis candidatos seriam a *va-opsin* (*vertebrate ancient opsin*) e a *tmt-opsin* (*teleost multiple tissue opsin*), sendo que esta última já foi proposta como o possível fotopigmento a intermediar a sincronização por luz em relógios periféricos de *D. rerio* (Moutsaki *et al.*, 2003; Cavallari *et al.*, 2011). Porém, estudos filogenéticos têm demonstrado que estas duas opsinas apresentam maior semelhança com opsinas de vertebrados (Terakita, 2005; Davies *et al.*, 2010), o que sugere uma via de sinalização envolvendo ativação de transducina (G_i/G_0), fosfodiesterase e hidrólise de nucleotídeos cíclicos. De fato, foi recentemente demonstrado que a família das opsinas *opn3*, que inclui a opsina *tmt*, atua através da proteína G_i/G_0 no teleósteo *Takifugu rubripes* e no mosquito *Anopheles stephensi* (Koyanagi *et al.*, 2013). No entanto, a questão sobre o “fotopigmento circadiano” em tecidos periféricos de *D. rerio* parece ser mais complexa do que parece. Outros trabalhos com células dessa espécie demonstraram que a ativação do promotor do gene *per2* pode ocorrer em outros comprimentos de onda, tais como verde (530nm) e vermelho (657 nm) (Cavallari *et al.*, 2011; Mracek *et al.*, 2013). Desta maneira a participação destas e de outras opsinas na modulação dos genes de relógio, sob luz branca ou outros comprimentos de onda, não pode ser descartada.

Esses resultados, porém, ajudam a esclarecer uma questão antiga a respeito da existência de Crys fotossensíveis em *D. rerio*. Os dados expostos aqui são uma forte evidência de que os Crys fotossensíveis não participam das respostas observadas no modelo testado. A hipótese dos Crys atuando como fotorreceptores em *D. rerio* está baseada no fato de que essas proteínas são os fotorreceptores circadianos primários em *Drosophila* (Emery *et al.*, 1998; Stanewsky *et al.*, 1998; Ceriani *et al.*, 1999) e, apesar

de absorverem luz no espectro azul, nossos dados diferem do mecanismo de ação conhecido dessas proteínas. Em *Drosophila*, a proteína Cry sofre uma mudança conformacional após a absorção do fóton de luz pela flavina que a compõe, após o que interage com a proteína Timeless (Tim) e outros componentes que, em conjunto, vão promover a proteólise de Tim, resultando no ajuste dos genes de relógio ao estímulo luminoso (Ortzuk *et al.*, 2014). Dessa maneira, a proteína Cry age como um fotopigmento que atua diretamente na maquinaria dos genes de relógio sem a necessidade de uma via de sinalização. Por outro lado, em células ZEM-2S de *D. rerio*, a luz aparentemente atua através de uma cascata de sinalização, no caso, a via dos fosfoinosítídeos, para modular a expressão dos genes de relógio, fazendo com que o mecanismo de ajuste dos relógios através dos Crys seja improvável.

Todavia os resultados apresentados aqui não excluem o mecanismo de estresse oxidativo, que continua sendo perfeitamente plausível. Em 1993, Pittendrigh propôs a teoria conhecida como “fuga da luz”, a qual coloca luz e temperatura como as principais pressões seletivas na evolução da organização circadiana. Logo, não seria surpresa se opsinas (ou outros mecanismos de detecção luminosa) e o mecanismo de estresse oxidativo coexistissem num mesmo sistema circadiano, e mesmo convergissem para uma mesma resposta (ver discussão abaixo).

***Crosstalks* com a Via de Sinalização de Fosfoinosítídeos**

Outro ponto importante que buscamos avaliar nesta tese é como a via de sinalização desencadeada pela melanopsina seria capaz de levar às alterações vistas nos genes de relógio. As vias de sinalização de fotorreceptores ciliares e rabdoméricos foram principalmente estudadas, e por motivos óbvios, em células excitáveis, onde o evento final da ativação dessas vias de sinalização por luz é o fechamento de canais

dependentes de nucleotídeos cíclicos ou a abertura de canais TRPs, com a consequente hiperpolarização ou despolarização celular, respectivamente. Mas como essas vias de sinalização, e mais especificamente a via dos fosfoinosítídeos demonstrada aqui, seriam capazes de modular fatores de transcrição para os genes de relógio? A resposta para essa pergunta poderia estar na interação dessa via de sinalização com outras vias, num processo conhecido como *crosstalk*. Contudo, até o momento, não há nenhum registro de um possível *crosstalk* ligando a via de sinalização ativada pela melanopsina com outras vias que levariam ao ajuste dos genes de relógio. Assim, propusemo-nos a investigar três importantes vias, cuja influência parece ser determinante na geração dos ritmos nos NSQs de mamíferos, que são as vias de AMPc/PKA, NO/GMPc e MAPKs.

No NSQ, o AMPc parece ser um importante segundo mensageiro que desencadeia a expressão de genes do relógio. Esse nucleótido cíclico ativa PKA que é capaz, entre outros efeitos, de catalisar a fosforilação de CREB (*cAMP response element binding protein*) em vários modelos (Golombeck & Rosenstein, 2010). O conteúdo de AMPc flutua no NSQ (Prosser & Gillette, 1991; Ferreyra & Golombeck, 2000) e a utilização de seu análogo permeável *in vitro* induz mudanças de fase quando aplicadas durante o dia subjetivo (Prosser & Gillette, 1989). Mais recentemente, foi proposto que o AMPc parece ser não só um componente da sinalização que leva ao arrastamento, mas também parte do próprio mecanismo molecular do relógio circadiano (O'Neill *et al.*, 2008). A possível interação entre a via dos fosfoinosítídeos e a via de AMPc/PKA foi avaliada em melanóforos de *X. leavis* (Isoldi *et al.*, 2010). Esse estudo demonstrou que a luz age negativamente sobre a via AMPc/PKA, e que essa inibição se daria através do aumento dos níveis intracelulares de cálcio, ativação de calcineurina (fosfatase PP2B) e inibição de adenilil ciclase; e/ou através da ativação de PKC, fosforilação de proteínas de ancoramento (AKAPs) associadas a PKA e desestabilização

do seu ancoramento à membrana celular. A avaliação dessa via de sinalização em células ZEM-2S, contudo, obteve resultados contraditórios. Ao quantificarmos o conteúdo de AMPc gerado após o pulso de 10 min de luz azul, pudemos verificar que sua concentração foi reduzida pelo estímulo luminoso, indicando que esse nucleotídeo cíclico não seria necessário para o aumento de expressão dos genes de relógio *per2* e *cry1a*. Entretanto, quando utilizamos o inibidor de adenilil ciclase, que inibe a produção de AMPc, o aumento ocasionado na expressão dos genes *per2* e *cry1a* pelo pulso de luz azul foi bloqueado. Resultados similares foram reportados em um estudo realizado com células Z3 de *D. rerio* (Cermakian *et al.*, 2003), nas quais a inibição de PKA reduziu o aumento da expressão do gene *per2* pelo estímulo luminoso, enquanto que a adição de forskolina, um ativador de adenilil ciclase, não teve efeito sobre sua expressão. Fica claro que o papel do AMPc no ajuste dos genes de relógio em tecidos periféricos de *D. rerio* permanece pouco claro e novos experimentos se fazem necessários para o esclarecimento dessa questão.

Por outro lado, vários estudos têm sugerido que a ativação dos genes de relógio pode resultar da ativação da via do NO/GMPc. Em 2005, Isoldi e colaboradores, observaram um aumento de 4 vezes na concentração de GMPc em melanóforos de *Xenopus laevis*, quando estes foram estimulados por luz branca. Curiosamente, esse nucleotídeo cíclico não participa da dispersão de pigmento induzida por luz, pois a utilização de YC-1, um ativador de guanilil ciclase, ou do análogo de GMPc, 8-bromo-GMPc, não produziram quaisquer efeitos sobre os melanóforos de *Xenopus*, permanecendo obscuro o papel do GMPc nas foto-respostas nesse modelo. Nosso grupo supôs que esse aumento poderia estar relacionado ao ajuste dos genes de relógio nos tecidos periféricos desse animal, e essa hipótese encontra suporte em estudos farmacológicos e eletrofisiológicos realizados nos NSQs de mamíferos, que

demonstraram a importância de outros componentes dessa via, como a da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) na resposta circadiana à luz, bem como sua associação com CaMK II (Golombeck & Ralph, 1994; Golombeck & Ralph, 1995; Ding *et al.*, 1994; Wanabe *et al.*, 1995; Fukushima *et al.*, 1997; Melo *et al.*, 1997; Ferreyra *et al.*, 1998; Agostino *et al.*, 2004). De forma semelhante, nossas investigações mostraram que as enzimas NOS e CaMK II atuam na regulação dos genes de relógio, já que a presença dos respectivos inibidores L-NAME e KN-93, reduziu significativamente o aumento da expressão de *per2* e *cry1a*. Os experimentos realizados em microscopia confocal mostraram um grande aumento na produção de NO, entre 5 e 13 vezes, após a estimulação de luz azul por 10 segundos, indicando que essa molécula possa ter um papel importante nas células ZEM-2S. Contudo há que se fazerem algumas ressalvas quanto a esse experimento, como já foi discutido anteriormente, já que outros comprimentos de onda além do azul são capazes de ativar os genes de relógio em células de *D. rerio*. Assim, o laser verde utilizado para o monitoramento poderia ter estimulado as células ao invés do pulso de luz azul. Além disso, é necessária a realização de novos experimentos com a utilização de inibidores e doadores de NO para que não reste dúvida que o aumento observado se refere à produção de NO.

Tradicionalmente, a via do NO/GMPc envolve a produção de NO pela NOS, ativação da guanilil ciclase, aumento nos níveis de cGMP e a ativação da proteína quinase G (PKG). Nossa expectativa era de que essa via fosse a responsável pelo ajuste dos genes de relógio nos tecidos periféricos de *D. rerio*, no entanto, o aumento de GMPc, promovido pelo YC-1 em células ZEM-2S não levou ao aumento da expressão dos genes *per2* e *cry1a*, o que é uma forte evidência de que a expressão desses genes não é aumentada através da ativação de PKG.

Outra possibilidade da participação do NO na sinalização pela luz azul seria através de um mecanismo menos tradicional, com o NO atuando por uma via independente de GMPc. De fato, já foi demonstrado que em células neuronais, o NO pode estar envolvido com a alteração da expressão de genes, por induzir a fosforilação de ERK através de Ras, de um modo independente de GMPc (Yun *et al.*, 1998). Foi sugerido que essa interação poderia propiciar a via através da qual a luz, pela indução da produção de NO, ativaria a via da MAPK no NSQ (Obrietan *et al.*, 1999).

Interessantemente, outra enzima envolvida com a ativação de genes do relógio em células ZEM-2S é a MAPK. MAPKs são ativadas por uma variedade de estímulos como fatores de crescimento, citocinas, oncogenes e condições de estresse, e são conhecidas por regularem processos celulares, tais como a expressão de genes, diferenciação e proliferação (Krishna & Narang, 2008). Além disso, as MAPKs desempenham um importante papel na formação dos ritmos circadianos no NSQ (Chansard *et al.*, 2007; Akashi *et al.*, 2008). Foi demonstrado em diversos estudos que a inibição de ERK-2 promove o bloqueio da resposta circadiana à luz (Obrietan *et al.*, 1998; Butcher *et al.*, 2002; Butcher *et al.*, 2003; Dziema *et al.*, 2003), e os três membros da família das MAPKs, ERK1/2, p38 e JNK, exibem variações diurnas e circadianas em sua atividade no NSQ (Pizzio *et al.*, 2003). Em *D. rerio*, o papel das MAPKs no ajuste dos genes de relógio por estímulos luminosos já havia sido investigado (Cermakian *et al.*, 2003; Hirayama *et al.*, 2009; Mracek *et al.*, 2013). Nossos dados estão de acordo com os dois primeiros trabalhos, que mostram que a via das MAPKs atua de forma positiva sobre os genes de relógio quando estimulados por luz branca, pois a sua inibição impede o aumento da expressão desses genes. Nossos resultados com o inibidor de MAPK, PD-98059, mostraram uma drástica inibição do aumento da expressão dos genes *per2* e *cry1a*. Em contraste, o último trabalho citado acima mostra que o aumento

das expressões dos genes *per2* e *cry1a*, quando estimulados por luz azul, se torna ainda mais proeminente e sustentado quando o inibidor de MAPK é utilizado. Embora nem todos esses estudos estejam em concordância, em conjunto eles demonstram que a MAPK possui um papel fundamental no ajuste dos genes de relógio em *Danio rerio*.

Pelo que foi discutido acima, aparentemente três vias de sinalização, AMPc/PKA, NO e MAPK, participam, graças a *crosstalks* com a via dos fosfoinositídeos, do ajuste dos genes de relógio decorrentes do pulso de luz azul em células ZEM-2S de *D. rerio*, com destaque para as duas últimas devido a aparente controvérsia encontrada nas investigações da via AMPc/PKA. No NSQ de mamíferos, o principal candidato a integrar os sinais advindos dessas diferentes vias é a fosforilação do fator de transcrição CREB/CRE, a qual pode ser ativada por múltiplas quinases como PKA (Gonzalez & Montminy, 1989), CaMK (Sheng *et al.*, 1991) e MAPK (Xing *et al.*, 1996). Os argumentos a favor da integração das vias de NO e MAPK vêm de estudos provando que a integridade dessas duas vias é essencial na fosforilação de CREB nos NSQs (Ding *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 1997; Obrietan *et al.*, 1999), e da demonstração de que a produção de NO é fundamental para a atividade de fosforilação das ERK em culturas primárias de córtex neural (Yun *et al.*, 1998). Nossos resultados também apontam para uma interação entre as vias do NO e das MAPK e, assim como foi sugerido anteriormente, apontam para uma sinalização pela qual a produção de NO induzida por luz pode ativar a via das MAPK e, conseqüentemente, levar ao ajuste dos genes de relógio pela ativação de CREB.

É importante notar que as semelhanças observadas entre as vias de sinalização nos NSQs de mamíferos e em células ZEM-2S de *D. rerio* podem refletir um mecanismo preservado no ajuste dos genes de relógio na evolução dos vertebrados. A conservação desse mecanismo é obviamente crítica na função celular e demonstra a

necessidade de melhor entendermos os mecanismos que sustentam e modificam a expressão dos genes de relógio nos tecidos periféricos. A Fig. 30 mostra o mecanismo proposto neste trabalho para a modulação de genes de relógio por luz azul, através da fotoativação da melanopsina, nas células ZEM-2S de *Danio rerio*.

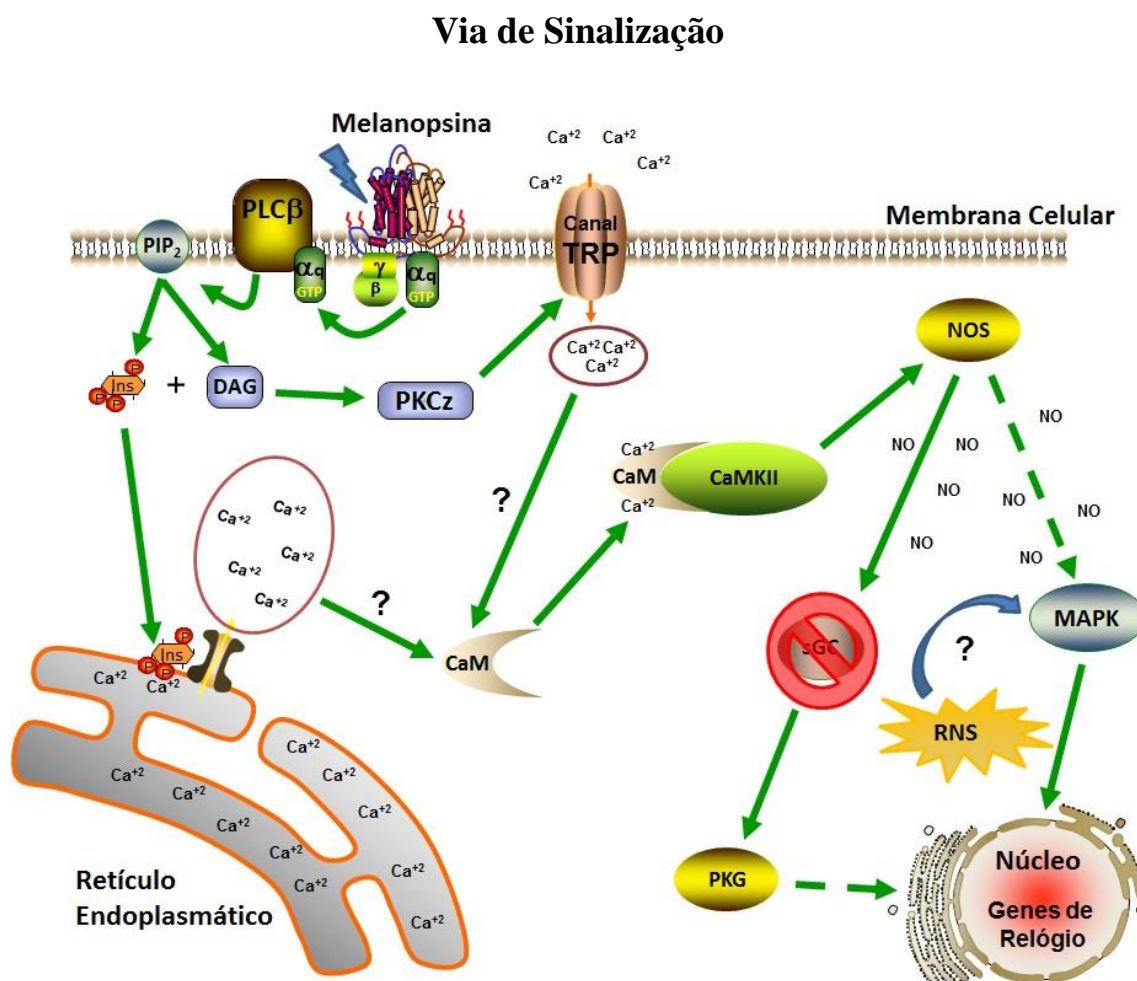


Fig. 30 – Esquema da via de sinalização desencadeada pela ativação da melanopsina por luz azul e o *crosstalk* proposto para modulação dos genes de relógio em células ZEM-2S de *D. rerio*. Linhas contínuas indicam etapas comprovadas neste trabalho e/ou na literatura; linhas tracejadas indicam etapas ainda não comprovadas.

Estresse Oxidativo e Opsinas

Por muitos anos pesquisadores vêm procurando pela molécula fotorreceptora que torna as células de *Danio rerio* sensíveis à luz e, mais do que isso, o fotorreceptor responsável pela sincronização dos genes de relógio aos estímulos luminosos. Após demonstrarmos que os Crys fotossensíveis são candidatos improváveis a intermediar essa resposta, ainda restam evidências que suportam duas possibilidades, o estresse oxidativo e as opsinas. Grande parte das evidências que mostram o estresse oxidativo como o agente sincronizador dos genes de relógio por luz coloca as oxidases contendo flavinas, por exemplo, NADPH e acyl-CoA oxidase, como o provável fotorreceptor (Hirayama *et al.*, 2007; Uchida *et al.*, 2010). Através desse sistema, o fóton absorvido por essas enzimas levaria à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação da via das MAPKs e regulação dos genes de relógio, porém a participação efetiva dessas oxidases na fotorrecepção ainda não foi comprovada. Embora nossos resultados coloquem uma opsina como candidato a intermediar a sincronização em células ZEM-2S, a hipótese anterior não deve ser excluída. Na realidade, esse dois mecanismos aparentemente convergem para uma mesma via de sinalização, nesse caso, a via das MAPKs (Cermakian *et al.*, 2003; Hirayama *et al.*, 2007). A diferença entre esses dois mecanismos pode residir nas moléculas que ativam a via das MAPKs: no estresse oxidativo a ativação é feita através de ROS (Hirayama *et al.*, 2007; Uchida *et al.*, 2010), enquanto que na via de sinalização proposta neste trabalho a ativação se daria através de espécies reativas de nitrogênio (RNS). Um grande número de trabalhos vem demonstrando que as RNS, assim como as ROS, podem atuar nas cascatas de sinalização através de modificações pós-transcricionais, fornecendo um controle da conformação espacial e temporal de proteínas, o que resultaria em um ajuste fino da sua atividade (para revisão ler Hess *et al.*, 2005; Martinez-Ruiz *et al.*, 2011). A relevância

fisiológica para dois sistemas separados pode ser justificada pelos níveis de irradiância ao qual *Danio rerio* está exposto. Em águas turvas ou profundas, ou ainda no amanhecer e entardecer, dada a baixa taxa de irradiância, por exemplo, as opsinas poderiam oferecer um melhor sistema de detecção para a sincronização por luz, haja visto que um único fóton é capaz de ativá-las (Terakita, 2005; Davies *et al.*, 2010). Neste cenário, o estresse oxidativo seria mais efetivo em condições de altos níveis de irradiância, reforçando a sincronização e ativando os sistemas de fotorreativação e de reparo de DNA.

Transfecção em Células ZEM-2S e Silenciamento de Melanopsinas

Os dados obtidos nos experimentos com pulso de luz e a análise da via de sinalização desencadeada por ele certamente colocam a melanopsina como um forte candidato a intermediar a sincronização dos relógios periféricos de *Danio rerio*, porém a prova inequívoca do envolvimento da melanopsina nesse processo, só seria possível através do silenciamento de seus genes. O silenciamento não só comprovaria seu envolvimento, como nos permitiria analisar funcionalmente os diferentes genes da melanopsina. Para que fosse possível tal análise, seria imprescindível a transfecção de forma eficiente dos siRNAs desenhados com base nos dois genes da melanopsina conhecidos em *zebrafish* no momento da idealização deste projeto. Diversos métodos foram testados pelo nosso grupo, até que pudéssemos chegar a dois métodos com eficiências satisfatórias. Isso se deve ao fato de que os reagentes de transfecção vendidos comercialmente, em sua maioria foram desenvolvidos e testados em células de mamíferos, e a sua otimização em células de outras classes de vertebrados pode configurar uma tarefa extremamente árdua. Nossos resultados demonstraram que, dentre as metodologias utilizadas, duas, nanotubos de carbono (NTC) e o *kit* químico

GenMute, foram extremamente eficientes na transfecção de siRNA em células ZEM-2S de *Danio rerio*, algo que normalmente não se esperaria. Os dois tipos de NTCs, *single-wall* e *multi-wall*, foram capazes de transfectar praticamente 100% das células testadas. Na literatura, já foi demonstrado que as partículas *single-wall* são eficientes na transfecção de células de mamíferos difíceis de transfectar, como neurônios e cardiomiócitos (Ladeira *et al.*, 2010), assim como são também consideradas as células de *D. rerio*. Apesar dos NTCs *single-wall* serem considerados um método de transfecção mais eficiente, a transfecção com o NTC *multi-wall* também se mostrou extremamente eficiente, fazendo o uso das nanopartículas na transfecção de células de *zebrafish* um método bastante promissor.

Contudo o método escolhido para introdução dos siRNAs em células ZEM-2S foi o da transfecção química, por uma simples questão de disponibilidade, já que a obtenção e o envio dos nanotubos de carbono eram muita vezes demorados. A transfecção com o *kit* químico foi monitorada por um período de 24 a 72 horas, onde pudemos observar que o complexo formado entre os agentes químicos e o siRNA foi gradualmente incorporado pela célula, e que a eficiência desse método é praticamente 100% assim como a transfecção por NTCs. Contudo os dados obtidos em nossos experimentos de PCR em tempo real demonstraram que, em apenas 3 horas após a transfecção, os genes da melanopsina já haviam sido silenciados. Com o intuito de verificar a participação da melanopsina ortóloga de mamíferos (*opn4m*) utilizamos todas as três sequências de siRNA disponíveis para os genes *opn4m-1* e *opn4m-2*, pois verificamos através de análises bioinformáticas que possivelmente esses siRNAs seriam capazes de silenciarem as três *opn4ms* de *D. rerio*, *opn4m-1*, *opn4m-2* e *opn4m-3*.

Nossos resultados mostraram que o silenciamento nas células ZEM-2S de *D. rerio* está ocorrendo de forma inespecífica, pois foram silenciados outros genes além

dos genes da melanopsina, como os genes de relógio *per1b*, *per2*, *cry1a* e *cry1b*, assim como o gene do receptor de glicocorticóide. A questão sobre a eficiência de siRNA em *D. rerio* parece controversa e permanece não resolvida no meio científico (Sifuentes-Romero *et al.*, 2011). Curiosamente, os trabalhos que argumentam contra o silenciamento por siRNA nessa espécie apontam sempre para o mesmo problema, a inespecificidade do silenciamento. Um dos possíveis motivos pode ser a ativação do sistema interferon (IFN), que é uma resposta imune inata das células de vertebrados em resposta a infecções virais (Sifuentes-Romero *et al.*, 2011). Já foi demonstrado que sequências longas de RNA de interferência, acima de 30 pares de base, assim como a concentração utilizada, podem levar à ativação desse sistema (para revisão ler Dorsett & Tuschl, 2004; Sifuentes-Romero *et al.*, 2011). O problema em células ZEM-2S pode ter sido decorrente da concentração de siRNA utilizada, 50 nM, a qual foi indicada pelo protocolo do fabricante. Logo, novos experimentos são necessários para avaliar a influência da concentração dos siRNAs em células ZEM-2S de *D. rerio*.

A principal dificuldade encontrada nesta tese foi o estabelecimento de uma linhagem transfectada estável a partir das células ZEM-2S, pois os dois métodos citados acima foram absolutamente ineficientes na transfecção do plasmídeo *per1:luc*. O único método que se mostrou eficiente foi a transfecção por eletroporação e nossos resultados demonstraram que sua eficiência varia de acordo com a quantidade de DNA transfectado. Apesar de ser um método de transfecção relativamente eficiente, o principal problema associado a essa técnica estava relacionado à sobrevivência das células. As imagens utilizadas na determinação da eficiência da técnica também revelam que muitas vezes apenas um pequeno grupo de células sobrevivia ao processo de eletroporação, o que foi uma dificuldade adicional no estabelecimento da linhagem ZEM-2S *per1:luc*. Por esse motivo, optamos por deixar as células em descanso por um

período de dois dias a uma semana para que se recuperassem da eletroporação. A seleção das células transfectadas decorreu de acordo com os dados obtidos pela curva de mortalidade, ou seja, com uma concentração de 900 µg/mL de geneticina, porém ao término de 15 dias nenhuma célula sobreviveu ao tratamento. A geneticina e o plasmídeo de resistência, *pcDNA*, utilizados nesse experimento são específicos para mamíferos, e esse pode ter sido um dos motivos pelo qual a seleção dos clones não foi bem sucedida. Isso se torna mais evidente pelo fato de que células B16 F10 de melanoma murino foram submetidas à mesma estratégia de transfecção em nosso laboratório e uma linhagem transfectada estável foi obtida sem maiores problemas. Além disso, como mencionado anteriormente, outros experimentos foram realizados variando-se a concentração do plasmídeo de resistência e a concentração do antibiótico, mas até o momento não conseguimos estabelecer a linhagem transfectada estável a partir da linhagem ZEM-2S.

Conclusão

Os dados apresentados neste trabalho colocam a melanopsina como o principal candidato para a captura do sinal luminoso que leva, em última instância, à sincronização dos genes de relógio em tecidos periféricos de *Danio rerio*. Essa afirmação é embasada em três fatos: (1) a detecção das proteínas Opm4m-1 e Opm4m-2 nas células ZEM-2S; (2) o pulso de luz azul, que corresponde ao espectro de absorção da melanopsina, estimula a expressão de genes de relógio; (3) a via de sinalização desencadeada pela luz azul, no caso, a via dos fosfoinosítídeos, corresponde à via de sinalização ativada pela fotoativação da melanopsina em outros sistemas, ao mesmo tempo em que descarta a participação de candidatos como Crys fotossensíveis e de opsinas como a Va-opsina e a Tmt-opsina, já que estas disparam a foto-sinalização por outras vias. Além disso, mostramos que a via de sinalização da melanopsina faz *crosstalks* com a via do NO e das MAPKs propiciando a porta pela qual a via dos fosfoinosítídeos poderia modular o promotor dos genes *per2* e *cry1a*.

Contudo nossos dados não descartam a possibilidade da participação de outras opsinas na percepção da luz branca e de outras cores do espectro, como verde e vermelho. Ainda, não fica excluída a possibilidade da existência de uma opsina com características semelhantes às da melanopsina na sincronização por luz azul, fazendo com que os ensaios com RNA de interferência sejam fundamentais para responder essa questão e outras a respeito das possíveis diferenças de funcionalidade entre os genes da melanopsina.

Adicionalmente, os resultados apresentados aqui fornecem importantes informações sobre o mecanismo de sincronização nos relógios periféricos de *Danio rerio*, reforçando a ideia de que células em cultura são um ótimo modelo para análises genéticas dos mecanismos que os modulam, e contribuem com novos dados que

servirão como base para um melhor entendimento da relação dinâmica entre osciladores centrais e periféricos.

Resumo

A melanopsina foi descoberta em 1998 por Ignacio Provencio e colaboradores em melanóforos de *Xenopus laevis*. Desde sua descoberta, esse fotopigmento surgiu como um possível candidato a intermediar os fenômenos de sincronização nos vertebrados. Nos mamíferos, a melanopsina é encontrada num pequeno subgrupo de células ganglionares da retina, conhecido como células ganglionares retinianas intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs) e o seu papel como fotopigmento responsável pela percepção luminosa, que leva à sincronização das espécies dessa classe aos ciclos de claro e escuro, já foi estabelecido. A melanopsina está presente na retina de todas as classes de vertebrados estudadas até o momento mas, em contraposição a essa afirmação, a sua estrutura tem maior semelhança com opsina de invertebrados do que com opsina de vertebrados, sugerindo que sua fototransdução ocorra através da via dos fosfoinositídeos. Essa hipótese foi confirmada por diversos trabalhos na literatura e estudos posteriores demonstraram que, em vertebrados não mamíferos, a melanopsina é codificada por dois genes: um ortólogo ao de mamíferos, *Opn4m*, e um ortólogo ao de *X. laevis*, *Opn4x*, levantando diversas questões a respeito da funcionalidade dessa opsina.

Nosso grupo vem estudando esse fotopigmento nos tecidos periféricos de vertebrados desde 2001, sendo que foi pioneiro em demonstrar, em melanóforos de *Xenopus laevis*, que a dispersão dos grânulos de melanina se dá através da fotoativação da melanopsina que desencadeia a cascata de fosfoinositídeos. E estudos mais recentes vêm colocando a melanopsina como um dos possíveis fotopigmentos responsáveis pela sincronização de relógios periféricos em organismos como peixes e anfíbios. Nesse sentido, a linhagem de células ZEM-2S do peixe teleósteo *Danio rerio* é um ótimo modelo para o estudo das vias de fototransdução em relógios periféricos. Já foi demonstrado que essa linhagem de células é responsiva a estímulos luminosos, exibindo

uma proliferação diferencial frente a diferentes regimes de claro e escuro, e ativando a expressão de genes de relógio como *clock*, *per1* e *cry1b*, que conhecidamente são responsáveis por sincronizar os ritmos biológicos ao fotoperíodo ambiental. Nossos experimentos de imunocitoquímica detectaram a presença das duas proteínas codificadas pelos genes *opn4m-1* e *opn4m-2* da melanopsina, e mostraram uma significativa diferença na distribuição das proteínas Opn4m-1 e Opn4m-2. Análises de PCR quantitativo mostraram que um pulso de luz azul de 10 min é capaz de alterar a expressão dos genes de relógio *per1b*, *per2*, *cry1a* e *cry1b*, e que essa alteração ocorre através da via dos fosfoinosítídeos em células embrionárias ZEM-2S de *Danio rerio*. Em adição mostramos que para promover a alteração dos genes de relógio, a via dos fosfoinosítídeos interage com outras vias de sinalização como a via do óxido nítrico (NO) e a via das proteína quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Esses dados sugerem que a melanopsina seja um dos principais candidatos a intermediar os processos de sincronização nessas células, pois a somatória dos resultados de detecção da melanopsina, estimulação dentro de seu espectro de absorção e ativação da via dos fosfoinosítídeos, a coloca a frente de outras opsinas como *vertebrate ancient opsin* (Va-opsin) e *teleost multiple tissue opsin* (Tmt-opsin) e de outros candidatos como Crys fotossensíveis e mecanismos de estresse oxidativo. No curso deste trabalho também conseguimos definir metodologias eficientes de transfecção de RNA de interferência e de DNA plasmidial em células ZEM-2S de *D. rerio*, que são ferramentas fundamentais nos estudos de expressão gênica nesse modelo.

Abstract

Melanopsin was discovered in 1998 by Ignacio Provencio and colleagues in *Xenopus laevis* melanophores. Since its discovery, this photopigment has emerged as a possible candidate to mediate synchronization in vertebrates. In mammals the melanopsin is found in a subset of retinal ganglion cells, known as intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) and their role as the photopigment responsible for photoentrainment in mammals has already been established. Melanopsin is present in the retina of all vertebrate classes studied to date, nevertheless, its structure is more similar to invertebrate than to vertebrates opsins, suggesting that their phototransduction pathway occurs through the phosphoinositide pathway. This hypothesis has been confirmed by several studies in the literature. Later studies showed that melanopsin is encoded by two genes in non-mammalian vertebrates, *Opn4m* orthologous to mammalian and *Opn4x* orthologous to *X. laevis*, raising new questions about the functionality of this opsin.

Our group has studied this photopigment in vertebrate peripheral tissues since 2001 and, in *Xenopus laevis* melanophores, we demonstrated that pigment granule dispersion occurs through photoactivation of melanopsin and triggering of phosphoinositide pathway. More recent studies have put melanopsin as a possible photoreceptor responsible for peripheral clocks entrainment in organisms like fish and amphibians. In this context, the ZEM-2S cell line of the teleost fish *Danio rerio* is a good model to study the mechanism of phototransduction in peripheral clocks. It has been previously demonstrated that this cell line is responsive to light stimuli, exhibiting a differential proliferation when submitted to different light/dark regimes and activating the expression of clock genes such as *clock*, *per1* and *cry1b*, known to synchronize the biological rhythms to environmental photoperiod. Our immunocytochemistry experiments detected the presence of two proteins encoded by the melanopsin genes

ABSTRACT

opn4m-1 and *opn4m-2*, and showed a significant difference in the distribution of proteins Opn4m-1 Opn4m-2. Quantitative PCR analyses showed that a 10-min blue light pulse is able to change the expression of the clock genes *per1b*, *per2*, *cry1b* and *cry1a*, and that this change occurred through the phosphoinositide cascade in embryonic ZEM-2S cells of *D. rerio*. In addition we showed that, to promote the change in clock gene expression, the phosphoinositide pathway interacts with other signaling pathways such as the nitric oxide (NO) and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways. These data suggest that melanopsin is a major candidate to mediate the photoentrainment in these cells, because taken together, the detection of melanopsin, stimulation within its absorption spectrum and activation of the phosphoinositide cascade, puts it ahead of other opsins, as the *vertebrate ancient opsin* (Va-opsin) and *teleost multiple tissue opsin* (Tmt-opsin), and other candidates, as photosensitive Crys and mechanisms of oxidative stress. In the course of this work, we could also define efficient methods for transfection of interference RNA and plasmidial DNA in ZEM-2S cells of *D. rerio*, which are fundamental tools in studies of gene expression in this model.

Bibliografia

- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, et al. (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci*, 22: 350-356.
- Agostino PV, Ferreyra GA, Murad AD, Watanabe Y, Golombek DA. (2004) Diurnal, circadian and photic regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase II and neuronal nitric oxide synthase in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Neurochem Int*, 44: 617-625
- Akashi M, Hayasaka N, Yamazaki S, Node K. (2008) Mitogen-activated protein kinase is a functional component of the autonomous circadian system in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, 28: 4619-4623.
- Albrecht U, Eichele G. (2003) The mammalian circadian clock. *Cur Opin Gen Dev*, 13: 271-277.
- Arendt D. (2003) Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol*, 47: 563-571.
- Arshavsky VY, Lamb TD, Pugh EN Jr. (2002) G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol*, 64: 153-187.
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93: 929-937.
- Bartell PA, Miranda-Anaya M, Menaker M. (2004) Period and phase control in a multioscillatory circadian system (*Iguana iguana*). *J Biol Rhythms*, 19: 47-57.
- Bass J, Takahashi JS. (2010) Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 330: 1349-1354.
- Bellingham J, Chaurasia SS, Melyan Z, Liu C, Cameron MA, et al. (2006) Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *PLoS Biol*, 4(8): e254.
- Bellingham J, Foster RG. (2002) Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell Tissue Res*, 309: 57-71.
- Bellingham J, Whitmore D, Philp AR, Wells DJ, Foster RG. (2002) Zebrafish melanopsin: Isolation, tissue localisation and phylogenetic position. *Brain Res Mol Brain Res*, 107: 128-136.
- Berridge G, Cramer R, Galione A, Patel S. (2002) Metabolism of the novel Ca^{2+} - mobilizing messenger nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate via a $2'$ -specific Ca^{2+} - dependent phosphatase. *Biochem J*, 365: 295-301.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295: 1070-1073.

- Bilotta J, Saszik S. (2001) The zebrafish as a model visual system. *Int J Dev Neurosci*, 19: 621-629.
- Blum ID, Lamont EW, Abizaid A. (2012) Competing clocks: metabolic status moderates signals from the master circadian pacemaker. *Neurosci Biobehav Rev*, 36: 254-270.
- Buhr ED, Takahashi JS. (2013) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*, 217: 3-27.
- Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS. (2010) Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330: 379-385.
- Butcher GQ, Lee B, Obrietan K. (2003) Temporal regulation of light-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol*, 90: 3854-3863.
- Butcher GQ, Doner J, Dziema H, Collamore M, Burgoon PW, et al. (2002) The p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway couples photic input to circadian clock entrainment. *J Biol Chem*, 277: 29519-29525.
- Carr AJ, Whitmore D. (2005) Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. *Nat Cell Biol*, 7: 319-321.
- Carter-Dawson LD, LaVail MM, Sidman RL. (1978) Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 17: 489-498.
- Cavallari N, Frigato E, Vallone D, Frohlich N, Lopez-Olmeda JF, et al. (2011) A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biol*, 9: e1001142.
- Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Mas P, Petti AA, et al. (1999) Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science*, 285: 553-556.
- Cermakian N, Pando MP, Thompson CL, Pinchak AB, Selby CP, et al. (2002) Light induction of a vertebrate clock gene involves signaling through blue-light receptors and MAP kinases. *Curr Biol*, 12(10): 844-848.
- Chakraborty C, Hsu CH, Wen ZH, Lin CS, Agoramoorthy G. (2009) Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Curr Drug Metab*, 10: 116-124.
- Chansard M, Molyneux P, Nomura K, Harrington ME, Fukuhara C. (2007) c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 modulates the period of mammalian circadian rhythms. *Neuroscience*, 145: 812-823.

- Chaurasia SS, Rollag MD, Jiang G, Hayes WP, Haque R, et al. (2005) Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (Opn4): Differential regulation of expression in pineal and retinal cell types. *J Neurochem*, 92: 158–170.
- Contin MA, Verra DM, Guido ME. (2006) An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells. *FASEB J*, 20(14): 2648-2650.
- Costa A, Castanon-Cervantes O, Menaker M, Piccione G, Caola G. (2005) Daily rhythm of lactate dehydrogenase in the rat (*Rattus norvegicus*) carrying a Per1-luciferase transgene: assessment on serum and liver. *Vet Res Commun*, 29 suppl. 2: 183-186.
- Czeisler CA, Shanahan TL, Klerman EB, Martens H, Brotman DJ, et al. (1995) Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med*, 332: 6–11.
- Davidson AJ, London B, Block GD, Menaker M. (2005) Cardiovascular tissues contain independent circadian clocks. *Clin Exp Hypertens*, 27: 307-311.
- Davies WI, Zheng L, Hughes S, Tamai TK, Turton M, et al. (2011) Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. *Cell Mol Life Sci*, 68(24): 4115-4132.
- Davies WL, Hankins MW, Foster RG. (2010) Vertebrate ancient opsin and melanopsin: divergent irradiance detectors. *Photochem Photobiol Sci*, 9: 1444-1457.
- Ding JM, Faiman LE, Hurst WJ, Kuriashkina LR, Gillette MU. (1997) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci*, 17: 667-675.
- Ding JM, Chen D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA, et al. (1994) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science*, 266: 1713-1717.
- Dorsett Y, Tuschl T. (2004) siRNA: Application in functional genomics and potentials as therapeutics. *Nature*, 3: 318-329.
- Dunlap JC. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96: 271-290.
- Dziema H, Oatis B, Butcher GQ, Yates R, Hoyt KR, et al. (2003) The ERK/MAP kinase pathway couples light to immediate-early gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 17: 1617-1627.

- Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M. (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, 95: 669-679.
- Farhat FP, Martins CB, Lima LH, Isoldi MC, Castrucci AM. (2009) Melanopsin and clock genes: regulation by light and endothelin in the zebrafish ZEM-2S cell line. *Chronobiol Int*, 26: 1090-1119.
- Ferreira GA, Golombek DA. (2000) Cyclic AMP and protein kinase A rhythmicity in the mammalian suprachiasmatic nuclei. *Brain Res*, 858: 33-39.
- Ferreira GA, Cammarota MP, Golombek DA. (1998) Photic control of nitric oxide synthase activity in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Brain Res*, 797: 190-196.
- Foster RG, Kreitzman L. (2004) Rhythms of life: the biological clocks that control the daily lives of every living thing. New Haven, Conn: Yale University Press. ISBN 0-300-10969-5, pp 60-81.
- Foster RG. (1998) Shedding light on the biological clock. *Neuron*, 20: 829-832.
- Foster RG, Soni B. (1998) Extraretinal photoreceptors and their regulation of temporal physiology. *Rev Repr*, 3: 145-150.
- Foster, R.G, Argamaso S, Coleman S, Colwell CS, Lederman A, et al. (1993) Photoreceptors regulating circadian behavior: a mouse model. *J Biol Rhythms*, 8: 17-25.
- Foster RG, Provencio I, Hudson D, Fiske S, De Grip W, et al. (1991) Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol A*, 169: 39-50.
- Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Muñoz M, et al. (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*, 284: 502-504.
- Frigato E, Vallone D, Bertolucci C, Foulkes NS. (2006) Isolation and characterization of melanopsin and pinopsin expression within photoreceptive sites of reptiles. *Naturwissenschaften*, 93: 379-385.
- Fukushima T, Shimazoe T, Shibata S, Watanabe A, Ono M, et al. (1997) The involvement of calmodulin and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the circadian rhythms controlled by the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, 227: 45-48.

- Golombek DA, Rosenstein RE. (2010) Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev*, 90: 1063-1102.
- Golombek DA, Ralph MR. (1995) Circadian responses to light: the calmodulin connection. *Neurosci Lett*, 192: 101-104.
- Golombek DA, Ralph MR. (1994) KN-62, an inhibitor of Ca²⁺/calmodulin kinase II, attenuates circadian responses to light. *Neuroreport*, 5: 1638-1640.
- Gonzalez GA, Montminy MR. (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, 59: 675-680
- Gonzalez-Nunez V, Rodriguez RE. (2009) The zebrafish: a model to study the endogenous mechanisms of pain. *ILAR J*, 50: 373-386.
- Gotter AL, Manganaro T, Weaver DR, Kolakowski LF Jr, Possidente B. (2000) A timeless function for mouse Timeless. *Nat Neurosci*, 3: 755-756.
- Graham DM, Wong KY, Shapiro P, Frederick C, Pattabiraman K, et al. (2008) Melanopsin ganglion cells use a membrane-associated rhabdomic phototransduction cascade. *J Neurophysiol*, 99(5): 2522-2532.
- Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. (2005) Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*, 20: 391-403.
- Hankins MW, Peirson SN, Foster RG. (2008) Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci*, 31: 27-36.
- Hardie RC, Raghu P. (2001) Visual transduction in Drosophila. *Nature*, 413: 186-193.
- Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(2): 150-166.
- Hirayama J, Miyamura N, Uchida Y, Asaoka Y, Honda R, et al. (2009) Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment in zebrafish. *Cell Cycle*, 8(17): 2794-2801.
- Hirayama J, Cho S, Sassone-Corsi P. (2007) Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(40): 15747-15752.
- Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. (2011) Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest*, 121: 2133-2141.
- Hughes S, Hankins MW, Fosre RG, Peirson SN. (2012) Melanopsin phototransduction: Slowly emerging from the dark. *Progr Brain Res*, 199: Chapter 2. ISSN: 0079-6123.

- Isoldi MC, Provencio I, Castrucci AM. (2010) Light modulates the melanophore response to alpha-MSH in *Xenopus laevis*: an analysis of the signal transduction crosstalk mechanisms involved. *Gen Comp Endocrinol*, 165(1): 104-110.
- Isoldi MC, Rollag MD, Castrucci AM, Provencio I. (2005) Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 1217-1221.
- Konopka RJ, Benzer S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68: 2112-2116.
- Koyanagi M, Terakita A. (2014) Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential. *Biochim Biophys Acta*, 1837: 710-716.
- Koyanagi M, Takada E, Nagata T, Tsukamoto H, Terakita A. (2013) Homologs of vertebrate Opn3 potentially serve as a light sensor in nonphotoreceptive tissue. *Proc Natl Acad Sci, USA* 110 (13): 4998-5003.
- Krishna M, Narang H. (2008) The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci*, 65: 3525-3544.
- Kumbalasiri T, Rollag MD, Isoldi MC, Castrucci AM, Provencio I. (2007) Melanopsin triggers the release of internal calcium stores in response to light. *Photochem Photobiol*, 83: 273-279.
- Ladeira MS, Andrade VA, Gomes ERM, Aguiar CJ, Moraes ER, et al. (2010) Highly efficient siRNA delivery into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. *Nanotechnology*, 21: 12pp.
- Lima LHRG, Scarparo AC, Isoldi MC, Visconti MA, Castrucci AML (2006) Melanopsin in chicken melanocytes and retina. *Biol Rhythm Res*, 37: 393-404.
- Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, et al. (2003) Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science*, 299: 245-247.
- Martínez-Ruiz A, Cadenas S, Lamas S. (2011) Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med*, 51(1): 17-29.
- Melo L, Golombek DA, Ralph MR. (1997) Regulation of circadian photic responses by nitric oxide. *J Biol Rhythms*, 12: 319-326.
- Melyan Z, Tattelin EE, Bellingham J, Lucas RJ, Hankins MW. (2005) Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature*, 433: 741-745.

- Moutsaki P, Whitmore D, Bellingham J, Sakamoto K, David-Gray ZK, et al. (2003) Teleost multiple tissue (tmt) opsin: a candidate photopigment regulating the peripheral clocks of zebrafish? *Brain Res Mol Brain Res*, 112: 135–145.
- Mracek P, Pagano C, Fröhlich N, Idda ML, Cuesta IH, et al. (2013) ERK signaling regulates light-induced gene expression via D-Box enhancers in a differential, wavelength-dependent manner. *PLoS One*, 8(6): e67858.
- Nasi, E, Del Pilar Gomez, M. (2009) Melanopsin-mediated light-sensing in amphioxus: A glimpse of the microvillar photoreceptor lineage within the deuterostomia. *Commun Integrat Biol*, 2: 441–443.
- Newman LA, Walker MT, Brown RL, Cronin TW, Robinson PR. (2003) Melanopsin forms a functional short-wavelength photopigment. *Biochemistry*, 42(44):12734-12738.
- Nishizuka Y. (1988) The heterogeneity and differential expression of multiple species of the protein kinase C family. *Biofactors*, 1: 17-20.
- Obrietan K, Impey S, Smith D, Athos J, Storm DR. (1999) Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Chem*, 274: 17748-17756.
- Obrietan K, Impey S, Storm DR. (1998) Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat Neurosci*, 1: 693-700.
- Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. (2002) Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res*, 309: 47-56.
- O'Neill JS, Maywood ES, Chesham JE, Takahashi JS, Hastings MH. (2008) cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science*, 320: 949-953.
- Ozturk N, Selby CP, Zhong D, Sancar A. (2014) Mechanism of photosignaling by *Drosophila* cryptochrome: role of the redox status of the flavin chromophore. *J Biol Chem*, 289(8): 4634-4642.
- Panda S, Nayak SK, Campo B, Walker JR, Hogenesch JB, et al. (2005) Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science*, 307: 600-604.
- Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, et al. (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, 301: 525-527.
- Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, et al. (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109: 307-320.

- Pando MP, Morse D, Cermakian N, Sassone-Corsi P. (2002) Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell*, 110: 107-117.
- Patten SA, Sihra RK, Dhami KS, Coutts CA, Ali DW. (2007) Differential expression of PKC isoforms in developing zebrafish. *Int J Dev Neurosci*, 25: 155-164.
- Peirson SN, Oster H, Jones SL, Leitges M, Hankins MW, et al. (2007) Microarray analysis and functional genomics identify novel components of melanopsin signaling. *Curr Biol*, 17(16): 1363-1372.
- Pittendrigh CS. (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol*, 55: 16-54.
- Pizzio GA, Hainich EC, Ferreyra GA, Coso OA, Golombek DA. (2003) Circadian and photic regulation of ERK, JNK and p38 in the hamster SCN. *Neuroreport*, 14: 1417-1419.
- Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA. (1997) Independent photoreceptive circadian clocks throughout Drosophila. *Science*, 278 (5343): 1632-1635.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110: 251-60.
- Prosser RA, Gillette MU. (1991) Cyclic changes in cAMP concentration and phosphodiesterase activity in a mammalian circadian clock studied in vitro. *Brain Res*, 568: 185-192.
- Prosser RA, Gillette MU. (1989) The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset in vitro by cAMP. *J Neurosci*, 9: 1073-1081.
- Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. (2002) Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature*, 415: 493.
- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD. (1998) Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 340-345
- Qiu X, Kumbalasisri T, Carlson SM, Wong KY, Krishna V, et al. (2005) Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature*, 433: 745-749.
- Ralph MR, Foster RG, Davies FC, Menaker M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247: 975-978.

- Ralph MR, Menaker M. (1988) A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*, 241: 1225-1227.
- Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, et al. (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science*, 298: 2211-2213.
- Sangoram AM, Saez L, Antoch MP, Gekakis N, Staknis D. (1998) Mammalian circadian autoregulatory loop: a Timeless ortholog and m Per1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1- induced transcription. *Neuron*, 21: 1101-1113.
- Sekaran S, Foster RG, Lucas RJ, Hankins MW. (2003) Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons. *Curr Biol*, 13: 1290-1298.
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, et al. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 288: 1013-1019.
- Sheng M, Thompson, MA, Greenberg ME. (1991) CREB a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, 252: 1427-1430.
- Sifuentes-Romero I, Milton SL, García-Gasca A. (2011) Post-transcriptional gene silencing by RNA interference in non-mammalian vertebrate systems: Where do stand? *Mutation Res*, 728: 158-171.
- Sineshchekov OA, Jung KH, Spudich JL. (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 8689-8694.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. (2008) The behavior and ecology of zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev*, 83: 13-34.
- Spudich JL, Yang CS, Jung KH. (2000) Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16:365-392.
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, et al. (1998) The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, 95: 681-692.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*, 291: 490-493.
- Tamai TK, Young LC, Whitmore D. (2007) Light signaling to the zebrafish circadian clock by Cryptochrome 1a. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(37): 14712-14717.

- Tamai TK, Carr AJ, Whitmore D. (2005) Zebrafish circadian clocks: cells that see light. *Biochem Soc Trans*, 33 (5): 962-966.
- Terakita A. (2005) The opsins. *Genome Biol*, 6: 213.
- Tu DC, Owens LA, Anderson L, Golczak M, Doyle SE, et al. (2006) Inner retinal photoreception independent of the visual retinoid cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 10426-10431.
- Uchida Y, Hirayama J, Nishina H. (2010) A common origin: signaling similarities in the regulation of the circadian clock and DNA damage responses. *Biol Pharm Bull*, 33(4): 535-544.
- Van der Horst MA, Hellingwerf KJ. (2004) Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc Chem Res*, 37(1): 13-20.
- Vatine G, Vallone D, Gothilf Y, Foulkes NF. (2011) It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett*, 585(10): 1485-1494.
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. (1996) Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, 273: 959-963.
- Watanabe A, Ono M, Shibata S, Watanabe S. (1995) Effect of a nitric oxide synthase inhibitor, N-nitro-L-arginine methylester, on light-induced phase delay of circadian rhythm of wheel-running activity in golden hamsters. *Neurosci Lett*, 192: 25-28.
- Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA. (2004) Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol*, 14: 2289-2295.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert MS. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phase circadian firing rhythms. *Neuron*, 14: 697-706.
- Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. (2000) Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature*, 404: 87-91.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, et al. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288: 682-685.

- Yan EC, Kazmi MA, Ganim Z, Hou JM, Pan D, et al. (2003) Retinal counterion switch in the photoactivation of the G protein-coupled receptor rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 9262–9267
- Young MW, Kay SA. (2001) Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet*, 2: 702-715.
- Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 5339-5346.
- Yun HY, Gonzalez-Zulueta M, Dawson VL, Dawson TM. (1998) Nitric oxide mediates N-methyl-D-aspartate receptor-induced activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5773-5778.
- Zhang EE, Kay SA. (2010) Clocks not winding down: unravelling circadian networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 764-776.
- Ziv L, Gothilf Y. (2006) Period2 expression pattern and its role in the development of the pineal circadian clock in zebrafish. *Chronobiol Int*, 23(1-2): 101-112.