

Ana Paula Canel Bluhm

**Modulação da expressão dos genes para
melanopsina, *clock*, *per1*, *per2* e *bmal1* por
melatonina em melanóforos dérmicos do
anfíbio *Xenopus laevis***

São Paulo

2008

Ana Paula Canel Bluhm

**Modulação da expressão dos genes para
melanopsina, *clock*, *per1*, *per2* e *bmal1* por
melatonina em melanóforos dérmicos do anfíbio
*Xenopus laevis***

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Visconti

São Paulo

2008

Bluhm, Ana Paula Canel

B 658m Modulação da expressão dos genes para melanopsina, *clock*, *per1*, *per2* e *bmal1* por melatonina em melanóforos dérmicos do anfíbio *Xenopus laevis*. -- São Paulo : A. P. C. B., 2008. 86 p.

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

1. Melanopsina 2. Genes de Relógio 3. Melatonina I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

LC QP 572.M44

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).
Orientador(a)

“Não é nenhuma novidade que a função principal do sol no centro do nosso sistema solar é fornecer luz. A luz é que faz a vida se mover. É difícil imaginar nosso planeta e nossa vida sem ela.”

(Dr. Carl Bianco, M.D.)

*Minha luz, minha vida, meu amor, minha
paixão.*

*Ao meu marido Raul Kelmani, que
tudo faz para tornar meus sonhos possíveis.*

*À nossa filha Maria Luiza, que veio ao
mundo para alegrar ainda mais a nossa união.*

*A vida sem vocês não teria a menor
graça.*

"Tudo vale a pena, se a alma não é pequena".

Fernando Pessoa

*À minha querida mãe, Regina Helena,
à minha querida avó, Cida, aos meus irmãos
Christovam e Alexandre, e a todos os meus
familiares, que com todo apoio e carinho
tornaram esta trajetória possível.*

*"Sintonize-se com a inteligência interior e esteja certo de
que nada acontece por acaso..."*

C. G. Jung

*A Profa. Dra. Maria Aparecida
Visconti, pelo seu jeito de ser, pela alegria de
viver, pela orientação, pelo apoio, pelo carinho,
pela amizade e por tornar possível a realização
deste trabalho. Enfim, por tudo, principalmente
pela forma de me compreender.*

*À minha grande amiga Telma Pazini,
que me ensinou desde os pequenos procedimentos
deste trabalho, até sábias lições para a vida, pela
sua amizade, pelo seu caráter e pela retidão.
Você me ensinou que pessoas de coração puro,
embora raras, existem. Não existem palavras
capazes de expressar minha gratidão.*

AGRADECIMENT
OS

AGRADECIMENTOS

Várias pessoas fizeram parte deste caminho. Algumas partiram, outras se ausentam temporariamente e outras permanecem, mesmo que estejam longe... A todas, eu digo: **MUITO OBRIGADA!** E, mesmo assim, ainda é muito pouco...

Muito obrigada a todos pela minha formação como pessoa, pela minha formação científica, pelo amadurecimento pessoal e pelo simples convívio. E tenham certeza de que eu faria tudo novamente se fosse preciso, apenas pelo imenso prazer em fazer parte do fascinante mundo da ciência.

A Deus, por tudo o que fez e faz por todos nós.

Aos meus enteados Maira Tatiana, Raul Junior e Soraia Lorene, e à minha "netinha" Sophia, pelo amor, pelo carinho, pela amizade e pelo imenso orgulho demonstrado pelo meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Natália Nour Obeid, aluna exemplar e grande companheira nesta difícil jornada. Este trabalho não teria sido realizado sem sua imensa ajuda.

Às minhas amigas Maira Natali Nassar, Rafaella Lafraia, Cintia Yamashita, Maria Nathália, Tatiana e a todas as outras que eventualmente eu possa ter esquecido.

Aos demais alunos do departamento de Fisiologia, pelos bons momentos e boas risadas da hora do café.

A Dra. Regina P. Markus, pelo carinho e pela confiança.

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências/USP, onde foi realizado este trabalho

A todos os docentes do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências/USP.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências/USP, pelo carinho, pela amizade, pela dedicação, pelo café, ou por um simples "bom dia!". O apoio de todos vocês é muito importante para a realização de cada trabalho desenvolvido por cada pessoa que esteja de passagem nesta casa.

A secretaria de pós-graduação, pela dedicação.

AGRADECIMENTOS

A todos os seres que se entregam à ciência, voluntária ou involuntariamente.

*Aos melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis*.*

A Prof. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci, pela gentileza em ceder espaço e equipamentos para a realização deste trabalho e, principalmente, pela participação ativa no meu crescimento pessoal e profissional.

A FAPESP, a CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro ao projeto.

Enfim, a todos os que passaram pelo meu caminho durante esta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	<i>i</i>
RESUMO	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>vii</i>
INTRODUÇÃO.....	3
OBJETIVOS	26
MATERIAL.....	Erro! Indicador não definido.
Cultura de células	29
Extração de RNA total	30
RT-PCR (Reverse transcriptase-polimerase chain reaction).....	32
Imunocitoquímica.....	32
Western blot.....	33
PCR em tempo real.....	34
Análise dos dados.....	35
RESULTADOS	<u>37</u>
Expressão da proteína melanopsina por imunocitoquímica e <i>Western blot</i>	<u>38</u>
Expressão temporal de <i>Opn4</i> , <i>Clock</i> , <i>Per1</i> , <i>Per2</i> e <i>Bmal1</i>	40
Análise da expressão temporal de <i>Opn4</i> nos regimes 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10 ⁻⁹ M.....	42
Análise da expressão temporal de <i>Clock</i> nos regimes 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10 ⁻⁹ M.....	44
Análise da expressão temporal de <i>Bmal1</i> nos regimes 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10 ⁻⁹ M.....	46
Análise da expressão temporal de <i>Per1</i> nos regimes 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10 ⁻⁹ M.....	48
Análise da expressão temporal de <i>Per2</i> nos regimes 14C:10E, escuro constante e ratamento com melatonina 10 ⁻⁹ M.....	50
DISCUSSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	62

RESUMO

O ritmo diário de atividade é uma característica de todos os organismos vivos, que tem a capacidade de se orientar no tempo e no espaço, e distinguir entre tempo linear e tempo cíclico. O ciclo claro:escuro é um importante indicador circadiano para todos os organismos.

O trabalho do relógio circadiano envolve mecanismos de retroalimentação positiva e negativa dos genes CLOCK e BMAL1 (*brain and muscle Arnt-like protein 1*) que formam um heterodímero, funcionando como fator de transcrição para a expressão dos genes *per* (*period*), *cry* (*cryptochrome*) e o receptor órfão REV-ERB α . Em geral, o ciclo circadiano tem início nas primeiras horas da manhã com a ativação da transcrição de *per* e *cry* por CLOCK/BMAL1. A periodicidade do relógio circadiano resulta da combinação entre retroalimentação transcricional positiva e negativa destes genes.

Hoje já se sabe que os vertebrados, além do relógio central (NSQ) possuem vários relógios, distribuídos pelo corpo, os chamados “relógios periféricos”. A resposta ao estímulo luminoso é resultado da interpretação da informação luminosa por diferentes tipos celulares.

A molécula fotorreceptora de melanóforos dérmicos embrionários de *X. laevis* foi denominada melanopsina (*Opn4/Opn4*). Neste anfíbio, cones e bastonetes, continuam a exibir ritmo circadiano em cultura durante vários dias, e a sua capacidade de se ajustar pelo estímulo luminoso indica a presença do sistema circadiano.

Os objetivos deste projeto foram: verificar qual é o padrão de expressão para *Opn4*, *per1*, *per2*, *bmal1* e *clock* em melanóforos de *X. laevis* submetidos

a diferentes fotofases; verificar se a expressão para *Opn4*, *per1*, *per2*, *bmal1* e *clock* nos melanóforos de *X. laevis* é modulada pela melatonina.

Opn4, *per1*, *per2*, *bmal1* e *clock*

Dados obtidos no presente estudo demonstram que nesta linhagem celular estes genes apresentam um padrão de expressão aparentemente rítmico, quando estas células são expostas a um ciclo claro:escuro (14C:10E), que difere do padrão obtido quando mantidas em regime de escuro constante. Em geral, estas células mantidas em escuro constante durante 5 dias tendem a apresentar aumento de expressão de RNAm para estes genes e, quando mantidas em escuro constante também durante 5 dias, mas com adição de melatonina por 1h, 24 h antes de sua extração, estes níveis de RNAm tendem a diminuir. Porém, quando comparamos as três situações, podemos observar que a adição da melatonina restaura, em geral, o padrão de expressão dos genes analisados em 14C:10E.

O conjunto de resultados, que obtivemos em melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis*, sugere que esta linhagem celular possui características de relógio periférico.

ABSTRACT

[Digite texto]

The daily rhythm of activity is a characteristic of all living organisms, which have the ability of to behave accordingly time and space, and distinguish between linear and cyclic time. The dark:light cycle is an important time cue for all organisms.

The work of circadian clock involves mechanisms of positive and negative feedback of CLOCK and BMAL1 which as a heterodimer act as a transcription factor for the expression of *per* (*period*), *cry* (cryptochrome) and the orphan receptor REV-ERB α . A typical circadian cycle begins in the first hours of daytime, which the activation of the transcription of *per* and *cry* by CLOCK/BMAL1.

It is well known that the vertebrates, besides the central clock (SCN), have several other clocks distributed by the body, the so called “peripheric clock”. The responses to light are the result of the interpretation of light signal by several cell types

The photoreceptor molecule in the dermal melanophores of *X. laevis* was denominated melanopsin (*Opn4/Opn4*). In this amphibian, rods and cones maintain circadian rhythm during several days in culture, and their ability to synchronize by light suggest the presence of a circadian system.

The objectives of this project were: verify the expression pattern for *Opn4*, *per1*, *per2*, *bmal1* e *clock* in dermal melanophores of *X. laevis*, under different photo phases; and verify whether the expression for *Opn4*, *per1*, *per2*, *bmal1* and *clock* were modulated by melatonin.

Our data show that these genes have a rhythmic pattern expression, when these cells are under a 14L:10D, which is different from the pattern

[Digite texto]

exhibited in constant dark. In general, these cells in constant dark have a higher mRNA expression, and in the same condition, but with melatonin applied for 1h, 24h before the data collect, these mRNA levels are lower. However, when we compared these three different experimental conditions, we observed that melatonin resets, in overall, the expression pattern of 14L:10D.

These data, taken together, suggest that *Xenopus laevis* dermal melanophores have characteristics of a peripheral clock.

INTRODUÇÃO

[Digite texto]

A fotoadaptação em mamíferos está envolvida com processos de: (1) controle da iluminação retinal pelo reflexo pupilar luminoso; (2) modulação direta do sistema neuroendócrino pela luz, levando à modulação dos ciclos de atividade e descanso; e (3) o ajuste do sistema circadiano ao ciclo dia: noite (Czeisler et al, 1995; Yamazaki et al, 1999).

Os esforços em esclarecer o funcionamento do sistema circadiano levaram à descoberta de uma pequena população de células intrinsecamente fotorreceptivas (ipRGCs) capazes de expressar melanopsina (Opn4), um fotorreceptivo pertencente à crescente família das opsinas (atualmente existem mais de 800 tipos de opsinas identificadas). Este achado desencadeou uma série de estudos que nos proveu uma grande riqueza de conhecimento a respeito das respostas fóticas adaptativas de diversos organismos, além da demonstração da conservação da função da melanopsina e dos genes de relógio biológico nos mais diversos organismos estudados até o momento (Hattar et al, 2002; Nayak et al, 2007).

O ritmo diário de atividade é uma característica de todos os organismos vivos, que possuem a capacidade de se orientar no espaço e no tempo, podendo distinguir entre o tempo linear e o tempo cíclico (Edmunds, 1988). Por exemplo, organismos simples como os protozoários são capazes de distinguir entre períodos de claro e escuro, orientando-se de acordo (Noel, 1985).

A expressão “*tão certo quanto a noite vir após o dia*” reflete a estabilidade de alguns ciclos ambientais. A Terra gira em torno do seu eixo aproximadamente a cada 24 horas, e em torno do sol aproximadamente a cada 365 dias, submetendo plantas e animais a um ritmo diário extremamente previsível de condições de luz e temperatura, conforme as estações do ano.

[Digite texto]

Contudo, quando um organismo é isolado de seu ambiente (por exemplo, na ausência de luz, alimento, temperatura e sons), a maioria destes ritmos persiste por um período denominado “*livre-curso*”, que geralmente é próximo, mas não exatamente, de 24 horas. (Moore-Ede *et al.*, 1982)

Estes ritmos podem ser exógenos ou endógenos. Ritmos exógenos são atribuídos a fatores puramente externos, enquanto os ritmos endógenos são expressos mesmo quando animais ou células são mantidas em condições ambientais constantes, apresentando um componente intrínseco do animal. Estes mecanismos foram identificados e seu funcionamento foi comprovado tanto em eucariontes quanto em procariontes. Este “relógio interno” permite antecipação e ajuste destes organismos frente às oscilações ambientais cíclicas. Portanto, o organismo pode promover ajustes fisiológicos, morfológicos e/ou comportamentais, para melhor “enfrentar” as condições externas às quais está submetido (Moore-Ede *et al.*, 1982; Marques *et al.*, 1999).

O fato de o ritmo ser endógeno, por si só, não garante ao organismo sua adaptação ao meio ambiente. É fundamental que esses ritmos estejam sincronizados com os ciclos geofísicos, garantindo que cada atividade ou função de fato coincidam com a condição (ões) imposta(s) pelo ambiente. A harmonização entre ritmicidade biológica e ciclos ambientais é que define adaptação temporal. Assim, se há oscilação, em uma espécie devem existir indivíduos capazes de responder a essas oscilações. Essa relação de fase estável entre o ritmo biológico e o ciclo ambiental (sincronização) é dada através do arrastamento, e os agentes de arrastamento são conhecidos como *Zeitgebers*. Para um melhor ajuste ao meio é necessária ainda plasticidade nos

[Digite texto]

ritmos, permitindo respostas rápidas a estímulos ambientais. Esse ajuste fino é dado pelo mascaramento do ritmo (*Marques et al, 1999*).

A Cronobiologia identifica diversos e diferentes tipos de ritmos, em cada célula viva, nos mais diferentes organismos e nas mais diversas escalas de tempo, que se manifestam em períodos que abrangem desde milissegundos (disparo neuronal), até anos, como é o caso do bambu chinês, por exemplo, que possui um ciclo de vida de cerca de 100 anos (*Marques et al, 1999; Moser et al, 2006*).

Os ritmos circadiano (*circa* = cerca; *diem* = dia), cujo período varia de 20 a 28 horas e circanual (cerca de 365 dias), interagem com o nosso ambiente, enquanto outros interagem com o circadiano ou com algum outro ritmo corporal. É o caso dos ritmos ultradianos e infradianos. O ciclo ultradiano não está relacionado a um fenômeno ambiental conhecido, porém está bem caracterizado (respiração, batimentos cardíacos, disparos neuronais). É considerado, por muitos autores, como uma pulsação do sistema fisiológico, oscilando de forma mais rápida que o ritmo diário, porém acoplado ao ritmo circadiano. Este ciclo modula, por exemplo, a fase R.E.M. do sono, que em humanos saudáveis possui duração aproximada de 1 hora em indivíduos que mantêm seus horários de sono e vigília aproximados, todos os dias. Já os ciclos infradianos possuem ritmos de diferentes durações, relacionados a processos fisiológicos mais lentos e duradouros (*Marques et al, 1999; Moser et al, 2006*). Por exemplo, o ciclo circasseptano possui a duração aproximada de 7 dias, relacionado ao processo de produção de plaquetas em mamíferos (Radha & Halberg, 1987), ou à ocorrência de rejeição de órgãos transplantados

[Digite texto]

(DeVecchi *et al.*, 1979), ou ainda ao ciclo de oviposição de 7 dias em insetos cavernícolas (Marques *et al.*, 1999).

Ou seja, enquanto os ritmos circa- e infradiano possibilitam aos organismos vivos a antecipação das influências do movimento da Terra em torno de seu eixo (circadiano) e do Sol (circannual), os ritmos ultradianos organizam a inter-relação entre os diferentes sistemas orgânicos (Moser *et al.*, 2006).

Os ritmos circadianos são características marcantes encontradas nos seres vivos, pois representam manifestações evidentes de adaptação. A organização temporal é um mecanismo eficiente, capaz de fazer com que a inter-relação entre funções de polaridade oposta possa ocorrer com a eficiência necessária para a sobrevivência dos organismos (Moore-Ede *et al.*, 1982; Moser *et al.*, 2006). O ciclo circadiano resulta da variação da luz durante cada dia, consistindo em um dos muitos ritmos observados nos organismos ou em cada célula do nosso corpo (Aschoff, 1960; Pittendrigh, 1960; Moore-Ede *et al.*, 1982; Marques *et al.*, 1999).

Entende-se por organização circadiana o modo como o sistema circadiano é unificado fisiologicamente, e pelos princípios e regras que determinam as interações entre seus componentes. A organização circadiana se estende tanto amplamente quanto profundamente dentro da fisiologia e do comportamento dos organismos multicelulares. No núcleo do sistema, que regula e controla os diversos ritmos que podem ser medidos em vertebrados, são encontradas três estruturas que, unidas por suas interconexões, formam um “eixo circadiano” central comum a todos os vertebrados, inclusive os mais

[Digite texto]

ancestrais. Essas estruturas são as retinas, o complexo pineal (pineal e o olho/órgão parietal), e o núcleos supraquiasmáticos (NSQs) (Menaker *et al.*, 1997).

Os fotopigmentos visuais dos vertebrados pertencem à família das opsinas. As opsinas clássicas estão presentes nas células fotorreceptoras, como a rodopsina, encontrada nos bastonetes, responsáveis pela visão noturna, e três diferentes opsinas específicas para cada tipo de cone, que são responsáveis pela visão diurna (cores), pois apresentam sensibilidade para diferentes espectros luminosos, azul, verde e vermelho (Lucas *et al.*, 1999; Terakita, 2005). Cada cone possui um desses pigmentos, o que o torna sensível àquela cor específica. O olho humano pode perceber quase qualquer graduação de cor em que o vermelho, o verde e o azul estiverem misturados.

As opsinas são classificadas em tipo 1 e tipo 2, e mesmo pertencendo a famílias distintas, exibem muitas semelhanças, pois ambas fazem parte da família dos “receptores acoplados à proteína G” (GPCRs), ou seja, são proteínas de sete domínios transmembrânicos, porém estas famílias diferenciam-se por ativar diferentes cascatas de sinalização (Terakita, 2005).

São proteínas muito antigas, relacionadas à captação da energia e da informação luminosa, sendo encontradas em organismos com diferentes graus de complexidade. Além disso, o tamanho de cada família de opsinas está crescendo rapidamente, conforme os pesquisadores investigam organismos não tradicionalmente pesquisados e em biomas pouco explorados (Terakita, 2005). Graças às novas técnicas de sequenciamento genético, o número conhecido de opsinas do tipo 1, por exemplo, está atualmente por volta de 800. Já as opsinas tipo 2 são encontradas somente em eucariotos (Spudich, 2006; Fernald, 2006; Mccarren & DeLong, 2007).

[Digite texto]

A inexistência de uma relação filogenética entre os dois tipos de opsinas levou a comunidade científica à hipótese de que o mecanismo fundamental para detecção luminosa, via opsinas associadas ao retinaldeído, surgiu e foi explorado independentemente duas ou mais vezes pelos seres vivos (Fernald, 2006).

Os genes ancestrais das opsinas tipo 1 provavelmente surgiram nos primórdios da vida na Terra, antes do aparecimento dos olhos, e antes da divergência entre procariotos e eucariotos. Isto significa que o mecanismo de transporte de íons, que usa energia luminosa em associação com as opsinas tipo 1, precede a evolução da fotossíntese como meio de utilizar a energia luminosa.

Os fotorreceptores eram classificados como fotorreceptores de vertebrados (ciliares) e fotorreceptores de invertebrados (rabdômicos). Essa classificação baseava-se nas diferentes vias de sinalização, morfologia e especialização das células fotorreceptoras encontradas exclusivamente em vertebrados e em invertebrados. Recentemente esse conceito foi alterado, pois fotorreceptores rabdômicos foram encontrados em vertebrados, assim como fotorreceptores ciliares foram encontrados em invertebrados (Provencio *et al.*, 1998; Arendt *et al.*, 2004; Isoldi *et al.*, 2005).

Cada tipo de receptor está associado a proteínas G diferentes em sua via de sinalização: A proteína $G_{\alpha t}$ (transducina) é encontrada em fotorreceptores ciliares de vertebrados; a proteína $G_{\alpha o}$ em fotorreceptores ciliares do molusco *Pecten*; e a proteína G_q em fotorreceptores rabdômicos de vertebrados e invertebrados. Fotorreceptores ciliares produzem potenciais de membrana hiperpolarizantes através de uma cascata que se inicia com uma

[Digite texto]

fosfodiesterase. Já os fotorreceptores rabdoméricos são despolarizantes e utilizam uma cascata que se inicia com a fosfolipase C (Gärtner & Towner, 1995; Vought *et al.*, 2000).

A rodopsina é uma opsina conjugada a um cromóforo retinal não protéico derivado da vitamina A (retinaldeído), que controla a sensibilidade à luz de diferentes comprimentos de onda, e que pode assumir diferentes conformações isoméricas. Os cones também possuem pigmentos visuais formados por 11-*cis*-retinal, que é o cromóforo que se liga covalentemente às opsinas, tanto de cones como de bastonetes, para formar fotopigmentos funcionais, e uma opsina, que varia, conferindo a este fotorreceptor a capacidade de absorver a energia luminosa em diferentes comprimentos de onda. A rodopsina sofre decomposição quando é exposta à luz, porque esta causa uma alteração física em sua porção 11-*cis*-retinal, modificando-a para *trans*-retinal, precisando ser recomposta para reiniciar o processo quando for exposta à luz novamente (Takahashi *et al.*, 1980; Rollag *et al.*, 2003).

Pesquisas buscando identificar qual, ou quais, o(s) fotopigmento(s) envolvido(s) nas aferências do oscilador, demonstram que a maioria dos fotopigmentos presentes na retina está envolvida apenas com a visão, seja noturna ou diurna. Porém evidências mostram um novo grupo de moléculas fotoativas, presentes na camada interna da retina de mamíferos, e também em outras regiões encefálicas como a glândula pineal e regiões profundas do encéfalo de vertebrados não mamíferos, que participam da fotorrecepção circadiana (Takahashi *et al.*, 1980; Foster *et al.*, 1991; Provencio *et al.*, 1998; Cashmore *et al.*, 1999; Provencio *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2003; Rollag *et al.*, 2003; Chaurasia *et al.*, 2005; Isoldi *et al.*, 2005).

[Digite texto]

No início da década de 1990, estudos a respeito da ação da luz em melanóforos dérmicos da rã *Xenopus laevis* mantidos em cultura, demonstraram que a luz era capaz de provocar um grande aumento intracelular de AMPc durante o primeiro minuto de irradiação, e que esta elevação era inibida pela ação do hormônio melatonina. Surgia, então, um candidato a fotorreceptor na pele deste anfíbio, que aparentava expressar uma grande fotossensibilidade, pois a exposição destas células à luz dispersava os melanosomos de forma semelhante à luz do sol. Além disso, o espectro de ação desta resposta à luz era semelhante ao de outras opsinas fotossensíveis. Estes dados mostravam que a resposta fótica das células pigmentares, proveniente da pele deste anfíbio, pode ser mediada por mecanismos dependentes de AMPc, sugerindo que um membro da família das opsinas estaria envolvido neste processo. Porém, esta opsina não era a rodopsina (Daniolos *et al*, 1990; Nayak *et al*, 2007).

Esta opsina foi inicialmente identificada em melanóforos dérmicos do anfíbio *Xenopus laevis*, tendo sido denominada melanopsina (*OPN4*) por causa de sua origem (Provencio *et al.*, 1998) e, subseqüentemente, a melanopsina também foi encontrada na retina e em um pequeno grupo de células ganglionares intrinsecamente fotorreceptivas (ipRGCs) de mamíferos. Estas células projetam-se predominantemente para o núcleo pré-tectal olivar (OPN), importante para a fotorrecepção circadiana e o reflexo da pupila à luz, e para os núcleos supraquiasmáticos. Além disso, a melanopsina é necessária para a detecção luminosa pelas ipRGCs. Uma melanopsina ortóloga à melanopsina de *Xenopus laevis* foi posteriormente identificada em camundongo (Provencio *et al*, 2000; Berson *et al*, 2002; Hattar *et al.*, 2002; Lucas *et al*, 2003).

[Digite texto]

Em estudos posteriores, verificou-se que a *OPN4* é expressa na retina de todas as classes de vertebrados examinados até o momento, de teleósteos a mamíferos, inclusive o homem (Provencio *et al.*, 1998; Rollag *et al.*, 2003). Ainda, a seqüência predita para este peptídeo revela grande homologia com opsinas de invertebrados, particularmente de cefalópodes (Provencio *et al.*, 1998; Terakita, 2005; Isoldi *et al.*, 2005).

Assim como outras opsinas, a melanopsina possui um resíduo lisina no sétimo domínio transmembrânico, necessário para a formação de uma base de *Schiff* com o 11-*cis*-retinaldeído. A melanopsina assemelha-se muito com as opsinas de invertebrados, tanto que segrega junto com essas opsinas em análise cladística de seqüências de nucleotídeos (Terakita, 2005). Essa estrutura molecular é bem demonstrada pelo resíduo aromático tirosina, no sítio onde retinaldeído estabiliza a base de *Schiff*. A maioria das opsinas de vertebrados apresenta um resíduo ácido neste sítio, geralmente glutamato (Terakita, 2005).

Além de estar presente na retina, a melanopsina é expressa em células pigmentares, intermediando foto-respostas de proliferação (Im *et al.*, 2006) e de dispersão de melanossomos (Moriya *et al.*, 1996; Rollag, 1996; Isoldi *et al.*, 2005). Até o momento não se conhecem os mecanismos de regulação da melanopsina, ou de outras opsinas como a rodopsina, em células pigmentares de vertebrados. Dados de estudos anteriores de nosso laboratório demonstram a modulação de rodopsina em células pigmentares de *Carassius auratus* (eritroforoma GEM-81) por α -MSH (Im *et al.*, 2006).

O sistema circadiano é organizado hierarquicamente por osciladores localizados fora do oscilador principal, denominados *osciladores periféricos*

[Digite texto]

(Davidson et al, 2003b). Estes podem ser arrastados por um ciclo ambiental diferente do *Zeitgeber* que arrasta o ritmo de atividade ou repouso de uma espécie. Os osciladores periféricos podem ou não estar acoplados uns aos outros, porém, estão ligados aos núcleos supraquiasmáticos. Desta forma, sua expressão está conectada e depende da estrutura temporal do organismo, ainda que eles estejam auto-sustentados e, portanto, suficientes para a geração da oscilação da célula ou tecido em que estão localizados (Moore-Ede et al., 1982; Davidson et al, 2003b em Tu et al, 2006).

Em contraste com o conhecimento a respeito dos NSQs, os relógios periféricos foram menos investigados, mas já se sabe que ocorrem de peixes a mamíferos. Está bem estabelecido hoje que há diversos osciladores em tecidos periféricos (Yamazaki *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2002; Bartell *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2005; Davidson *et al.*, 2005).

Como o marca-passo central isolado expressa ritmo sustentado, persistente por trinta ciclos ou mais, enquanto ritmos periféricos se atenuam em poucos dias (Yamazaki *et al.*, 2000), aceitava-se a hierarquia do central sobre o 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 próprios (Yoo *et al.*, 2004). É notável que a expressão circadiana, observada em tecidos periféricos, pode ser ativada diretamente por exposição à luz tanto em organismos íntegros como em alguns tipos celulares em cultura (Balsalobre *et al.*, 1998; Whitmore *et al.*, 2000; Carr & Whitmore, 2005), ou por outros sincronizadores como alimento (Costa *et al.*, 2005; Davidson *et al.*, 2005).

[Digite texto]

Os núcleos supraquiasmáticos (NSQs) estão conectados à retina por uma via monossináptica, o trato retino-hipotalâmico, que permite a percepção do ciclo claro/escuro, enquanto os relógios periféricos são reajustados pelo oscilador central através de sinais neuro-hormonais, por sinais metabólicos e alimentação (Moore-Ede et al., 1982; Levi & Schibler, 2007).

Ratos cegos por degeneração da retina são capazes de manter a habilidade de ajustar os seus ritmos circadianos ao ciclo claro/escuro externo, e apresentam reflexo pupilar ativo em resposta à luz, além de apresentar supressão de melatonina por exposição à luz. Estas respostas dependem da melanopsina expressa exclusivamente nas ipRGCs (Tu et al, 2006). Outras células de vertebrados que apresentam uma resposta funcional quando expostas à luz e, portanto, podem servir como fotorreceptoras extra-retinais são os melanóforos (Zatz *et al.*, 1988), neurônios (Oliver e Bayle, 1982) e miócitos iridiais (Barr, 1989).

A expressão funcional de fotorreceptores extra-retinais é mais comum nos vertebrados ectotérmicos e em aves do que em mamíferos, e também é idade-dependente, sendo mais freqüente em animais mais jovens (Rollag, 1996). Nestes animais, existem fotorreceptores especializados localizados em diversas áreas do cérebro. Estas células respondem à luz que penetra a pele, o crânio e o tecido cerebral. Nesses animais, os olhos não são necessários para a sincronização do ciclo claro/escuro, mas sua presença aumenta a sensibilidade da sincronização (Menaker, 2003). Adicionalmente, as retinas de todas as classes de vertebrados contêm relógios circadianos endógenos que controlam vários aspectos de sua fisiologia, tais como: sensibilidade ao

[Digite texto]

estímulo luminoso, síntese de neuro-hormônios, vias de sinalização intracelular e expressão gênica (Green & Besharse, 2004).

A investigação genética das bases moleculares dos ritmos circadianos em eucariotos tiveram início com as pesquisas pioneiras de rastreamento genético dos pesquisadores Ronald Konopka e Seymour Benzer, que levaram ao descobrimento do *locus* gênico de *per* (*period*) em *Drosophila* (Konopka et al., 1971; Bargiello et al., 1984; Zehring et al., 1984; Lowrey e Takahashi, 2004) e levaram, posteriormente, pesquisadores a procurarem por homólogos em vertebrados, notadamente mamíferos. A maioria dos genes de relógio descoberta em *Drosophila* encontra uma cópia homóloga em mamíferos, cujas similaridades foram identificadas tanto nos osciladores dos insetos, como nos osciladores dos mamíferos (Brown & Schibler, 2001; Tauber *et al.*, 2004).

Os genes de relógio podem ter se desenvolvido há cerca de 3,8 bilhões de anos, em uma época em que, apesar da duração do ano ser de aproximadamente 365 dias, a rotação da Terra em torno do seu eixo seria de apenas quatro horas diárias (Krasinsky, 2002; revisto em Tauber *et al.*, 2004; Lowrey & Takahashi, 2004). Os fósseis mais antigos datam desta época e representam organismos que notavelmente sobreviveram, como a cianobactéria *Synechococcus*, que aparentemente pouco se modificou ao longo destes bilhões de anos (Kondo et al., 1994). Isto faz com que este organismo seja de grande interesse em estudos evolutivos, incluindo a evolução dos genes de relógio, além do fato de que pode representar a única ligação direta com o mundo ancestral (Schopf, 1994; 2000; e 2006). Há evidências de um grupo de genes ancestrais encontrados em

[Digite texto]

cianobactérias *Synechococcus*, *kaiA*, *kaiB* e *kaiC*, que são capazes de gerar um programa circadiano transcricional, com uma série de alças negativa e positivamente auto-reguladas (Kondo et al., 1994; Golden & Canales, 2003).

Ao mesmo tempo em que as cianobactérias necessitavam da luz para obtenção de energia, esta poderia ser deletéria, pois a irradiação UV causava danos severos ao DNA, mais do que nos dias de hoje. É proposto que uma das forças seletivas envolvidas na evolução da ritmicidade circadiana foi a junção do efeito do ciclo claro/escuro e do aumento do nível de oxigênio no início da evolução dos eucariotos. A ritmicidade circadiana possibilitou aos organismos um mecanismo de proteção para minimizar os efeitos deletérios resultantes da exposição foto-oxidativa diurna (Paietta, 1982; Lowrey & Takahashi, 2004).

O fenômeno da ritmicidade circadiana, que é amplamente distribuída em eucariotos, permitiu a sincronização de processos biológicos ao ciclo claro/escuro diário. Este tipo de organização temporal levou os organismos a desempenhar atividades particulares (moleculares a comportamentais), em um horário “apropriado” do dia. A ritmicidade circadiana é parte de uma contínua oscilação biológica de variação da periodicidade, e, provavelmente, tenha derivado da modificação da oscilação celular existente durante a evolução destes seres (Paietta, 1982).

Este fato foi reconhecido por Colin Pittendrigh, em 1965, que elaborou a sua teoria do “*escape from light*”, um fator crítico que teria desencadeado a evolução dos relógios biológicos no período pré-cambriano. Esta idéia foi atualizada em termos moleculares por Gehring &

[Digite texto]

Rosbash (2003), que incidiram irradiação UV sobre organismos primitivos marinhos, demonstrando experimentalmente a teoria de Pittendrigh.

Duas hipóteses podem ser levadas em conta para a teoria da evolução dos genes de relógio: a primeira é o envolvimento direto das enzimas fotolases, que podem reparar os danos causados pelos raios UV. As fotolases são ativadas pela incidência de luz azul, que é um comprimento de onda que pode penetrar em águas mais profundas do que os comprimentos de onda maiores. Aliada a essas enzimas, temos a migração vertical para regiões mais profundas do oceano, que talvez constitua o primeiro comportamento circadiano rítmico, já no pré-Cambriano, quando um dia ainda tinha menos do que 20h (Gehring & Rosbash, 2003).

A segunda é a hipótese de que a migração vertical tenha co-evoluído com a fotorrecepção, e as fotolases tenham levado à seleção dos primeiros genes de relógio, os criptocromos (*Cry*). Os genes *Cry* existentes nos dias de hoje possuem várias funções em plantas e animais, seja através da percepção da informação luminosa para os relógios, seja como componente intrínseco destes. A descoberta de que uma molécula fotorreceptora presente em plantas é essencial para o relógio biológico de camundongos foi um marco nas pesquisas a respeito destes (van der Horst *et al*, 1999; Whitmore & Sassone-Corsi, 1999; Tauber *et al.*, 2004)

O NSQ e os relógios periféricos funcionam através de um circuito transcricional de genes de relógio, que geram padrões rítmicos de expressão gênica controlados pelo relógio, envolvidos na expressão de proteínas, no metabolismo, ou em alguma função dependente de uma célula ou um órgão (Reppert & Weaver, 2002; Okamura *et al*, 2002; Levi & Schibler, 2007).

[Digite texto]

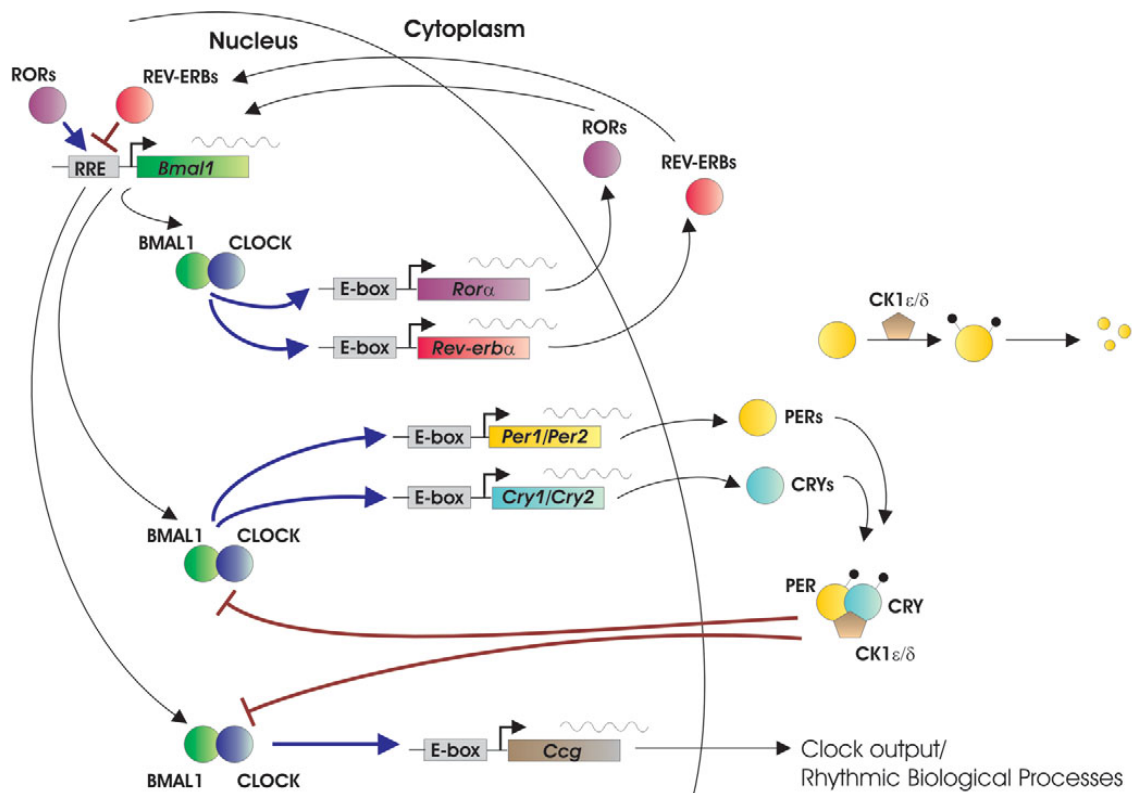
Análises moleculares e genéticas identificaram diversos genes de relógio, que formam uma alça de retroalimentação positiva e negativa de transcrição e tradução bem conservada em cada organismo. Em mamíferos, os fatores de transcrição CLOCK e BMAL1 agem como reguladores positivos, enquanto três proteínas PER (PER1, PER2 e PER3) e duas proteínas CRY (CRY1 e CRY2), operam como reguladores negativos (Reppert & Weaver, 2002; Hirota & Fukada, 2004).

O braço positivo deste circuito é o heterodímero formado pelas proteínas CLOCK:BMAL1 (Fig. 1), que produzem a ativação rítmica de transcrição, que atua como a força motriz por trás da maquinaria do relógio circadiano (Ko & Takahashi, 2006). Este complexo liga-se a elementos E-box da região promotora dos genes *Per* 1-2 e *Cry* 1-2, induzindo a sua transcrição. As proteínas PER e CRY traduzidas no citoplasma são transportadas para o núcleo e inibem a ativação da transcrição dependente de CLOCK:BMAL1, resultando na diminuição de seus próprios transcritos. Concomitantemente, a degradação regular das proteínas PER e CRY no citoplasma leva ao reinício da ativação e à inibição do ciclo de expressão gênica mediado via E-box, permitindo as oscilações circadianas dos níveis de RNAm e proteína de *Per* e *Cry* (Hirota e Fukada, 2004; Ko & Takahashi, 2006). A fosforilação das proteínas PER e CRY pela CK ϵ —desencadeia a formação do complexo CRY:PER (Lowrey *et al*, 2000; Lee *et al*, 2001; Vanselow *et al*, 2006).

O heterodímero CLOCK:BMAL1 também induz a transcrição dos genes *Rev-erba* e *Rora*, que interagem com os elementos Rev-erb/Ror (RREs) no promotor de *Bmal1* (Fig. 1), reprimindo e direcionando a sua transcrição, respectivamente. Existem, ainda, outros reguladores protéicos negativos que

[Digite texto]

interagem com o complexo CLOCK:BMAL1 via E-boxes em seus promotores, que podem bloquear a expressão gênica circadiana pela eventual formação de um heterodímero não funcional com BMAL1, conseqüentemente inibindo a expressão de todos os outros genes, ou desempenhando alguma função induzida por luz nos núcleos supraquiasmáticos, por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido. Quando a proteína REV-ERB α está ausente, o gene *Bmal1* (e possivelmente também o gene *Clock*) é liberado, podendo formar novamente o fator de transcrição CLOCK/BMAL1, reiniciando um novo ciclo circadiano (Preitner *et al*, 2002; Honma *et al*, 2002; Albrecht e Eichele, 2003; Green e Besharse, 2004; Hirota e Fukada, 2004).



[Digite texto]

Fig. 1. Rede de alças de retroalimentação de transcrição e tradução que constitui o relógio circadiano dos mamíferos. Extraído de Ko & Takahashi, 2006.

A demonstração de que o mecanismo molecular do relógio circadiano consiste em uma série de genes de relógio e de seus produtos protéicos que juntos participam de um mecanismo de retroalimentação positiva e negativa também foi confirmada em outros organismos (Lee et al., 2000; Gery et al., 2006; Ko e Takahashi, 2006). Em *Drosophila* e ratos, por exemplo, organismos que divergem em 600-700 milhões de anos em relação ao um ancestral comum, muitos dos genes envolvidos com o relógio circadiano são ortólogos (Young & Kay, 2001; Ko e Takahashi, 2006). Este ciclo leva cerca de 24 horas para se completar, e constitui um relógio circadiano molecular, sendo que a geração deste ciclo é governada por modificações pós-transcripcionais, como fosforilação e ubiquitinação. Estes processos contribuem significativamente para a precisão do relógio circadiano dos mamíferos, por afetar a estabilidade e a translocação nuclear destas proteínas do relógio (Ko e Takahashi, 2006).

As proteínas caseína quinase 1 epsilon (CK1 ϵ) e caseína quinase 1 delta (CK1 δ) são fatores críticos na regulação da taxa de síntese proteica circadiana. Mais recentemente, uma pequena proteína modificadora relacionada a ubiquitina esta relacionada à degradação protéica de BMAL1 também foi descrita como outro nível de regulação pós-tradução (30; Ko e Takahashi, 2006). A importância da regulação pós-tradução, dentro do mecanismo do relógio circadiano, é apoiada pelo fato de que uma mutação ocorrida nas caseínas quinase ϵ e δ pode gerar efeitos dramáticos no período circadiano. Estas mutações geram alterações nas atividades destas

[Digite texto]

quinases, podendo ocasionar a ocorrência de períodos menores nos mamíferos (Ko e Takahashi, 2006). Uma mutação na proteína CLOCK produz um heterodímero CLOCK:BMAL1 funcionalmente defeituoso, que induz um ritmo molecular notavelmente abrupto. Esta observação sugere que as proteínas CLOCK e BMAL1 são componentes críticos do relógio molecular (Ko & Takahashi, 2006).

Diferentes estudos sobre a natureza do oscilador circadiano demonstram uma verdadeira sinergia funcional entre os núcleos supraquiasmáticos (NSQs), a glândula pineal e os olhos, em que o funcionamento do sistema depende da interação de todos os seus componentes, que, em geral, é uma alça de retroalimentação do tipo inibitória (Golombek & Roblero, 2003). Os centros hormonais, como os próprios NSQs ou a hipófise, estão envolvidos na regulação circadiana, tanto quanto os genes de relógio (Moser *et al.*, 2006).

A glândula pineal dos vertebrados contém fotorreceptores que permitem a produção e liberação noturna de melatonina, que exerce sua ação específica através de GPCRs, com a sincronização de ciclos claro/escuro. Este hormônio atua na regulação de diversos processos fisiológicos e comportamentais, incluindo respostas circadianas e sazonais, algumas respostas retinianas, cardiovasculares e imunológicas.

Em anfíbios, répteis e aves, a pineal atua como um eficiente fotorreceptor juntamente com os olhos laterais, sendo os pinealócitos estruturas semelhantes aos fotorreceptores da retina (Golombek & Roblero, 2003). O órgão parietal de peixes e lagartos é importante para a percepção de

[Digite texto]

amanhecer e entardecer e possui pigmentos não retinianos, como parapinopsina e parietopsina (Terakita *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2006).

A melatonina, hormônio derivado da serotonina descrito por Lerner *et al.* (1958) como a substância que produzia alteração de cor da pele de anfíbios, é liberada pela glândula pineal no período de escuro. Esta molécula também marca o período do escuro em plantas, organismos unicelulares, bactérias e invertebrados (Hardeland & Poeggeler, 2003). Em vertebrados a melatonina também é sintetizada pela retina, onde exerce uma ação parácrina participando de processos adaptativos da visão noturna (Tosini e Fukuhara, 2003). Mais recentemente foi verificado que células imunocompetentes da medula (Tan *et al.*, 1999), sangue periférico (Carrillo-Vico *et al.*, 2004) e colostro (Pontes *et al.*, 2005), também sintetizam esta molécula e, neste caso, a ação não está ligada à marcação do ciclo claro/escuro ambiental, mas sim a diferentes funções celulares locais. Além disso, a melatonina é encontrada em altas concentrações na bile de vários mamíferos incluindo o homem, e essas concentrações chegam a ser de duas a três vezes maiores do que a concentração noturna da melatonina no sangue (Reiter *et al.*, 2000).

A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano que é captado da circulação e transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através da ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1), cuja atividade está aumentada em duas vezes no período de escuro. O 5-HTP é descarboxilado pela enzima 5-HTP descarboxilase, formando a serotonina. A serotonina, por sua vez é metabolizada a N-acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT), e posteriormente a NAS é utilizada como substrato para a enzima hidroxindol-O-metiltransferase

[Digite texto]

(HIOMT) dando como produto final a melatonina (Simonneaux e Ribelayga, 2003).

O passo limitante na síntese de melatonina é a conversão de serotonina à N-acetilserotonina. Esta conversão ocorre apenas no período de escuro e é interrompida no final da noite, ou quando existe um pulso de luz durante o período de escuro. Durante o período de escuro a atividade da enzima N-acetiltransferase está aumentada em até 100 vezes. Este aumento pode ser devido ao aumento da transcrição gênica, como ocorre em roedores (Roseboom *et al.*, 1996), ou à diminuição da degradação da proteína, que é sintetizada continuamente, como ocorre nos ungulados (Schomerus *et al.*, 2000). Independente do tipo de mecanismo intrínseco que controla o aumento noturno da atividade da N-acetilserotonina, o sinal que ativa este mecanismo é o aumento da liberação de noradrenalina a partir de uma via simpática controlada pelos núcleos supraquiasmáticos, que são a sede do relógio biológico (Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Em 1998, Dubocovich classificou os sítios de ligação para a melatonina, de acordo com as diferenças no perfil farmacológico, em ML-1 (receptor de alta afinidade) e ML-2 (receptor de baixa afinidade). Três tipos de receptores de alta afinidade foram identificados em vertebrados (Ebisawa *et al.*, 1994; Reppert *et al.*, 1994; Reppert *et al.*, 1995a; Reppert *et al.*, 1995b): Mel_{1a}, Mel_{1b} e Mel_{1c}. As propriedades de ligação com o ligante e os mecanismos de sinalização destes receptores (Mel_{1a} em ovelha, humano e galinha doméstica, Mel_{1b} em humanos e Mel_{1c} em galinha doméstica e *X. leavis*) são muito similares. Apesar destas semelhanças, o receptor Mel_{1c} foi clonado em *D. rerio*, *X. leavis*, galinha doméstica, mas não o foi em humanos (Reppert *et al.*, 1995b). Weaver e

[Digite texto]

colaboradores (1996) observaram em hamster da Sibéria que o gene do receptor Mel_{1b} não pode codificar uma proteína (receptor) funcional, devido à presença de mutações *non sense* na região codificadora do receptor. Com a clonagem dos subtipos de receptores houve a necessidade de um sistema de classificação e nomenclatura, que foi proposto pela “Internacional Union of Pharmacology” (IUPHAR) para os receptores de melatonina encontrados em mamíferos. Assim, os receptores de alta afinidade Mel_{1a} e Mel_{1b} foram renomeados como MT₁ e MT₂, respectivamente; o sítio de baixa afinidade ML-2 foi definido como MT₃; Mel_{1c} não foi considerado na nova nomenclatura (Shiu & Pang, 1998).

Em teleósteos e anfíbios, a melatonina ainda exerce uma função no controle da coloração da pele do animal, através da ação sobre os cromatóforos (Wainwright & Wainwright, 1978; Kasal *et al.*, 1979; Binkley, 1983; Filadelfi & Castrucci, 1996; Durgan *et al.*, 2006; Butler *et al.*, 2008).

Diversas espécies de vertebrados, como peixes, aves e mamíferos, incluindo humanos, apresentam controle dos ritmos circadianos modulados pela melatonina. Alguns estudos mostram que a administração exógena de melatonina é capaz de sincronizar estes ritmos (Bell-Pedersen *et al.*, 2005). Culturas de células de pineal podem mostrar ritmos diários na atividade da *N*-acetiltransferase (NAT), e na secreção de melatonina. Esses ritmos podem ser iniciados por ciclos de claro/escuro de 24 h em peixes, lagartos e aves (Underwood, 1990; Barrett & Takahashi, 1997; Murakami *et al.*, 1994; Nakahara *et al.*, 1997).

A ação inibitória da melatonina sobre os NSQs se dá *via* receptor MT₁ promovendo um aumento do RNAm de *Per* (Masson-Pévet *et al.*, 1994;

[Digite texto]

McNamara *et al.*, 2001; Poirel *et al.*, 2002; 2003). Também na *pars tuberalis*, *Per1*, *Per2* e *Rev-erb- α* só são rítmicos na ausência de melatonina, que por sua vez, aumenta a expressão de *Cry* e deprime a expressão máxima dos outros genes do relógio (Johnston *et al.*, 2006).

Em melanócitos dérmicos de anfíbios, causa agregação dos melanossomos (Rollag, 1988), apresentando-se como um potente agente clareador da pele, possuindo, também, atividade inibitória ou excitatória no sistema reprodutor, no crescimento e metamorfose (Filadelfi & Castrucci, 1996). Daniolos e colaboradores (1990), trabalhando com melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis*, observaram que 75 % das células mantidas em cultura por um longo período agregam seus melanossomos em resposta a melatonina. Desses 75%, todas dispersam seus melanossomos em resposta ao MSH e 70 % dispersam quando iluminados com luz visível, sendo atingida a dispersão máxima após 15 a 20 minutos de iluminação. Os níveis de AMPc aumentam rapidamente durante o primeiro minuto de iluminação e atingem um platô no nível máximo após cerca de 5 minutos.

Entre os teleósteos, em particular, vários estudos têm demonstrado sua efetividade como agente agregante em células pigmentares, inclusive em eritróforos de *Carassius auratus*, com diferenças entre as espécies em termos de sensibilidade a melatonina (Fujii *et al.*, 1993; Fujii & Oshima, 1994; Filadelfi & Castrucci, 1996).

Muitas espécies animais realizam adaptação cromática em resposta a estímulos ambientais, como luz, cor do substrato e interações intra e interespecíficas. Essas mudanças de coloração auxiliam no mimetismo, termorregulação, comunicação social e expressão de comportamentos como

[Digite texto]

agressividade e reprodução (Bagnara & Hadley, 1973; Oliveira et al, 1996; Fujii, 2000). As células pigmentares tegumentares, ou cromatóforos, originam-se da crista neural embrionária (Bagnara & Hadley, 1973), e são classificadas de acordo com a cor e os pigmentos que apresentam. Os mais conspícuos são os melanóforos, pretos ou pardos, com grânulos de melanina chamados melanossomos (Fujii & Oshima, 1986; Oliveira et al, 1996; Fujii, 1993).

As mudanças de coloração envolvem mecanismos que induzem variação na quantidade de pigmentos e/ou de células pigmentares, ou a translocação de grânulos de pigmentos ao longo dos processos dendríticos destas células, característica de crustáceos e vertebrados ectotérmicos. Nas aves e mamíferos a variedade de cromatóforos vista nos demais vertebrados não é mais encontrada, pois nesses animais somente encontramos células pigmentares com melanina, denominadas melanócitos. (Bagnara & Hadley, 1973; Oliveira et al, 1996; Fujii, 2000).

Vertebrados ectotérmicos apresentam cromatóforos capazes de ajustar a cor do animal, envolvendo a migração rápida de pigmentos dentro dessas células. Esse processo é regulado por sistemas hormonais e neurais. Sabe-se que há diversos hormônios e neurotransmissores envolvidos na modulação de mudança de cor em animais, tais como α -MSH, MCH, melatonina, catecolaminas e, mais recentemente, prolactina e endotelinas. Porém, cromatóforos de inúmeras espécies respondem diretamente à luz (Bagnara & Hadley, 1973; Kitta *et al*, 1993; Fujii *et al*, 1993; Filadelfi *et al*, 1996; Oliveira et al, 1996; Fujita & Fujii, 1997; Camargo *et al*, 1999; Oshima & Gotto, 2000; Ramanzini, 2001; Filadelfi *et al*, 2004).

[Digite texto]

Como já mencionado anteriormente, a molécula fotorreceptora de melanóforos dérmicos embrionários de *X. laevis* é a melanopsina (OPN4). Além disso, esses melanóforos oriundos da crista neural embrionária apresentam dispersão dos grânulos de pigmentos pelo citoplasma quando são expostos à luz (Daniolos *et al.*, 1990). Estas características indicam que essa linhagem celular é potencialmente um modelo biológico para a investigação dos mecanismos envolvidos na percepção de luz e ritmos em relógios periféricos.

Os melanóforos de *Xenopus laevis*, possuem uma importância histórica especial na pesquisa sobre a melatonina. A primeira evidência de que a glândula pineal conteria uma substância biologicamente ativa, proveio de um trabalho realizado por McCord & Allen (1917), que demonstraram que o extrato de glândula pineal bovina, aplicado à pele de *Xenopus laevis* levava ao clareamento do animal. Esta resposta é mediada pelo movimento dos grânulos de melanina contidos nos melanossomos de seus melanóforos dérmicos (Sugden *et al*, 2004).

Muitos anos depois, os melanóforos deste anfíbio desempenharam um papel de vital importância nas pesquisas conduzidas por Lerner e colaboradores (1958; 1960), que fizeram uso da resposta de clareamento dérmico deste animal para monitorar o isolamento do princípio contido na glândula pineal, identificada como melatonina.

Os melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis* também tiveram participação ativa nas pesquisas a respeito dos receptores para melatonina, pois foram a fonte para a primeira identificação e clonagem de um receptor com alta afinidade pela melatonina, através de uma biblioteca de cDNA dos

[Digite texto]

melanóforos dérmicos deste anfíbio. Este trabalho desencadeou o ressurgimento do interesse nos prováveis papéis fisiológicos deste hormônio, que persiste até os dias atuais (Ebisawa *et al*, 1994; Sugden *et al*, 2004).

OBJETIVOS

[Digite texto]

1. Considerando a existência de *Opn4* e genes de relógio em diversos tipos celulares de *Xenopus laevis* e sua regulação propusemo-nos, no presente estudo, a determinar se os melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis* apresentam características de relógio periférico, através da análise do padrão de expressão temporal de *Opn4*, e dos genes de relógio *Per1*, *Per2*, *Bmal1* e *Clock* nestas células, submetidas ao regime 14hC:10hE e ao escuro constante.

2. Considerando que o papel fisiológico da melatonina em retina de *Xenopus laevis* já está bem estabelecido, porém não em melanóforos dérmicos destes animais, propusemo-nos a verificar se a expressão gênica de *Opn4*, e dos genes de relógio *Per1*, *Per2*, *Bmal1* e *Clock* nestas células é modulada por este hormônio.

[Digite texto]

MATERIAL &

MÉTODOS

Cultura de células

Melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis* (cedidos pelo Dr. Mark Rollag, *Uniformed Services University of Health Sciences*, USA) foram mantidos em meio L-15 60%, galactose 480mg/L, insulina/transferrina/selênio 5mg/L, uridina 4mg/L, L-glutamina 87,6mg/L, L-asparagina 25mg/L, CaCl₂ 152mg/L, MgCl₂ 49,6mg/L, MgSO₄ 51,7mg/L, aminoácidos não essenciais de MEM 0,4X, aminoácidos essenciais de MEM 0,2X, solução de vitaminas de MEM 0,3X, suplemento de hipoxantina-timidina 2X, penicilina/estreptomicina 0,05%, 10% de soro fetal bovino não-inativado (todos da Gibco, EUA), e α -MSH 10⁻⁶ M, em pH 7,5, em estufa úmida a 25 °C. O meio de cultura foi trocado semanalmente e as células subcultivadas (1:3) quando atingiam a confluência nos frascos. Para tanto foram removidas com solução de Tripsina/EDTA (ácido etileno diamino tetraacético) e transferidas a novos frascos.

Cultura de células para extração de RNA total

Para a realização dos ensaios experimentais, a concentração de soro fetal bovino das células mantidas conforme descrito acima foi reduzida para 2% e o α -MSH foi retirado do meio de cultura. As células foram semeadas em placas de 6 poços, em duplicata (2x 10⁶/poço), e incubadas durante 9 dias em regime de escuro constante ou fotoperíodo 14h claro (650 LUX) por 10h escuro (14C:10E), sendo coletadas de 3 em 3 horas (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 ZT) no 10º dia, sendo que a hora zero de cada experimento corresponde à hora em que a luz acende (9h). Todos os experimentos

[Digite texto]

foram montados no mesmo horário (15h). O mesmo procedimento foi utilizado para a análise de todos os genes.

Nos períodos em que as células estavam em escuro, as mesmas foram coletadas com o auxílio de uma lâmpada vermelha.

Ensaio hormonal

Para a realização dos ensaios hormonais, a concentração de soro fetal bovino das células mantidas em cultura foi reduzida para 2% e o α -MSH foi retirado do meio de cultura. As células foram semeadas em placas de 6 poços, em duplicata, e incubadas durante 8 dias em regime de escuro constante. No 9º dia, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas 2 vezes com solução salina livre de cálcio e magnésio (PBSA). Foi adicionado meio de cultura experimental contendo solução de melatonina (Calbiochem) diluída em etanol (MERCK) para concentração final 10^{-9} M, sob luz vermelha. As células foram coletadas de 3 em 3 horas no 10º dia, respeitando os horários dos experimentos descritos no item anterior. Todos os experimentos foram montados no mesmo horário (15h). O mesmo procedimento foi utilizado para a análise de todos os genes.

Extração de RNA total

O meio das garrafas contendo as células para a realização dos ensaios foi removido, e foi adicionado 1mL de TRIzol (Invitrogen) nas células em regime de escuro, em regime 14C:10E ou ensaios hormonais.

O lisado foi mantido durante 5 min sob temperatura ambiente, sendo a seguir seu conteúdo transferido para tubo *ependorf*. Foram então acrescentados 200 μ L de 1-bromo-3-cloropropano (BCP –Sigma Aldrich) às

[Digite texto]

amostras, seguido de agitação vigorosa por 15 s. As amostras permaneceram por 10 min a temperatura ambiente, sendo então centrifugadas a 12000 x g por 15 min, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, ao qual foram adicionados 650 µL de isopropanol (Sigma Chem. Co.), a fim de precipitar o RNA. As amostras ficaram por 10 min a temperatura ambiente, seguindo-se uma centrifugação a 12000 x g por 35 min, a 4°C. O sobrenadante foi removido e as amostras colocadas imediatamente no gelo. O *pellet* foi lavado com 1,3 mL de etanol (MARCA) 75% e novamente centrifugado a 12000 x g por 15min, a 4°C. Após esta lavagem, as amostras permaneceram incubadas sob a temperatura de -80°C para precipitação, durante, pelo menos, 1 hora. Após este período, o etanol 75% foi descartado e novamente procedeu-se à lavagem com 1,3 mL de etanol 75%. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o excesso de etanol evaporado a temperatura ambiente, por cerca de 15 min.

O RNA foi então ressuspenso em 25 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (H₂O DEPC, Ambion Inc.), e tratado com DNase conforme instruções do fabricante (*DNA-free*TM, número de catálogo 1906, Ambion Inc.). Resumidamente, a cada amostra foi adicionado 10% de volume do tampão para DNase I e 1 µL de DNase I. A seguir, as amostras foram incubadas por 30 min a 37°C. Foram acrescentados 10% do volume de reagente de inativação, seguindo-se 2 min de incubação a temperatura ambiente. As amostras foram, então, centrifugadas a 10.000 x g por 2 min, a fim de precipitar o reagente de inativação com a DNase.

A concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro (GeneQuant Pro, Biochrom Ltd.), sendo 1 µg utilizado para transcrição reversa.

[Digite texto]

RT-PCR (Reverse transcriptase-polimerase chain reaction)

Em tubos *Eppendorf* de 0,2 mL, foram colocados 0,5 μ L de *primers* *randômicos* (Invitrogen), 1 μ g de RNA e H₂O DEPC (q.s.p.) para 12 μ L. Essa mistura foi agitada e incubada a 70°C por 10 min. Os tubos foram então colocados no gelo, e a cada um foram adicionados 2 μ L de tampão de PCR 10X (Applied Biosystems), 2 μ L de MgCl₂ 25 mM, 1 μ L de solução de dNTPs 10 mM e 2 μ L de DTT 0,1 M (Invitrogen). Os tubos foram incubados a 42°C por 3 min. Ao final, 1 μ L de SuperScript II RT (Invitrogen) foi adicionado a cada tubo, e as amostras incubadas a 42°C por 50 min. A reação foi finalizada por uma incubação a 70°C por 15 min. As amostras de cDNA foram mantidas a 8°C até sua utilização.

Imunocitoquímica

Dois anti-soros para *Xenopus*, UF056 e UF057, foram obtidos de coelhos inoculados com o peptídeo correspondente à sequência de 15 aminoácidos N-terminal, adicionada de uma cisteína e conjugado com a proteína antigênica *keyhole limpet* hemocianina (Covance Research Products, Denver, PA, EUA).

Os melanóforos de *Xenopus laevis* foram semeados em lâminas de 8 poços e, após um período de 24h, foram fixados em 4% de paraformaldeído, a 4°C durante 4 horas. Após lavagens em PBS (10min, 3X), sob agitação a 4°C, as células foram incubadas com 1,5% de soro de jumento em PBS, a 4°C. Após novas lavagens em PBS (10min, 3X) sob agitação, as lâminas foram incubadas com os anti-soros primários anti-melanopsina de *X. laevis* 1:500 em solução incubadora (1g de albumina bovina, 0,25g carragenina, 300 μ L de Triton X-100 em 100 mL de PBS), durante 16 a 20h, a 4°C.

[Digite texto]

Após este período, foram novamente lavadas três vezes em PBS, sob agitação e temperatura ambiente, e então incubadas com anticorpo secundário anti-coelho, conjugado a Cy3 (feito em jumento, Jackson Laboratories, EUA) 1:500, na solução de incubação, durante 1h, protegidas de luz, à temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram novamente lavadas por três vezes em PBS e montadas em meio aquoso Vectashield contendo DAPI (Vector Laboratories, EUA), cobertas com lamínulas e seladas com esmalte transparente. As imagens foram obtidas em fotomicroscópio de fluorescência Zeiss Axiophot, digitalizadas e coloridas usando-se Adobe Photoshop.

Western blot

Para a realização de *Western blot*, os melanóforos de *Xenopus laevis* foram semeados como descrito anteriormente. Após lise com 300 µl de tampão de extração *Phosphosafe* (Novagen) contendo inibidores de protease (Roche), a concentração de proteínas foi determinada com o kit BCA de ensaio de proteína (Pierce, Rockford, IL, EUA), e a mistura de tampão de amostra (Invitrogen) e 30 µg de proteína foi desnaturada por calor (70°C, 10 min) e colocada para correr em gel 10% NuPAGE Tris-Bis (Invitrogen, EUA). A eletroforese foi feita a 200 V e 100 mA por 50 min. Após transferência (30 V, 170 mA) para membranas PDVF, o blot foi revelado usando-se o kit *WesternBreeze* de imunodeteção cromogênica (Invitrogen). Brevemente, os sítios não-específicos foram bloqueados (1 h) e as membranas incubadas *overnight* a 4°C em uma mistura de anti-melanopsina de *X. laevis*, 1:500, e o controle anti-β-actina 1:1000 (Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA). As membranas foram então lavadas (5 min, 4X) com a solução de lavagem do kit, incubadas no anticorpo secundário anti-coelho conjugado a fosfatase alcalina por 1 h a temperatura ambiente, lavadas novamente (5 min, 4X), e colocadas em uma solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-1-fosfato e

[Digite texto]

substrato de azul de nitro tetrazólio (BCIP/NBT) para fosfatase alcalina até que as bandas apareçam. Após lavagem em água, as membranas foram secas ao ar, e digitalizadas.

PCR em tempo real

As reações de PCR quantitativo foram realizadas com pares de primers específicos para a espécie (Tab. 3), desenhados com o programa *Primer Express* (ABI; síntese por IDT). Foram preparadas soluções contendo os primers (300 nM para *OPN4*, *Clock* ou *Per*, e 50 nM para RNA 18S), iQ Sybr Green Supermix 2X (100 mM de KCl, 40 mM de Tris-HCl, 1,6 mM de dNTPS, iTaq DNA polimerase 50 U/mL e 6 mM de MgCl₂, BioRad Laboratories) e H₂O MilliQ autoclavada (q.s.p.) para volume final de 23 µL/poço. Essa solução foi aliquoteada (cada alíquota suficiente para 2 poços) em tubos *epENDORF*, e o cDNA de cada amostra foi adicionado ao tubo correspondente. As soluções já com cDNA foram então distribuídas em placas de 96 poços, em duplicata (23 µL/poço). Controles negativos foram incluídos nos ensaios, contendo água MilliQ autoclavada ao invés do cDNA. Todos os ensaios foram realizados em um termociclador iCycler (BioRad Laboratories), nas seguintes condições: 1 x 95°C por 7min; 50x 95°C por 10s, 60°C por 1min.

Tabela 3. Primers específicos para PCR em tempo real para genes de *Xenopus laevis*

<i>Seletividade</i>	<i>Primer</i>	<i>Seqüência</i>
18S	<i>Forward</i>	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'
	<i>Backward</i>	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'

[Digite texto]

<i>OPN4</i>	<i>Forward</i>	5'-TCTTGGAATTAAGGAGGAAAAGTG-3'
	<i>Backward</i>	5'-TGCTGCCTGCTGATTATGTGA-3'
<i>Clock</i>	<i>Forward</i>	5'-TCCCCTTCCCTGTGCAA-3'
	<i>Backward</i>	5'-GTGTCAGTCCTGTGATGGGATAAC-3'
<i>Per1</i>	<i>Forward</i>	5'-TGAAGGCCCTTAAAGAGCTAAAGA-3'
	<i>Backward</i>	5'-TTGCCAGTGTGCCAGACTTG-3'
<i>Per2</i>	<i>Forward</i>	5'-AAGGAACTGGGAGAGACTCATACT-3'
	<i>Backward</i>	5'-AAACACAGTCTGTCACTTCCGTTACT-3'
<i>Bmall</i>	<i>Forward</i>	5'-TCCCACGTGCAACGCC-3'
	<i>Backward</i>	5'-CGGGCCATGCGCAG-3'

Análise dos dados

A análise dos dados foi realizada pela comparação entre número de cópias dos poços referentes aos vários pontos temporais, obtidos passando-se uma reta denominada limiar que cruza essas porções. Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta (C_T), foi encontrado o ΔC_T que é a diferença desse valor para o gene de interesse e para o RNA 18S. A seguir, foram subtraídos os valores encontrados para cada poço da média dos poços onde a expressão foi menor (calibrador), obtendo-se o $\Delta\Delta C_T$. Esse valor foi colocado como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), obtendo-se assim o número de vezes que o gene estava expresso nos diferentes pontos. Esses valores foram expressos em porcentagem. Os valores em porcentagem obtidos em cada experimento foram analisados em conjunto, representando o número de experimentos (n) realizados.

[Digite texto]

Eventuais diferenças temporais intra-grupo foram analisadas por anova seguida de *Newman-Keuls*. Os diferentes tratamentos foram analisados por anova seguida de *Bonferroni*.

[Digite texto]

RESULTADOS

[Digite texto]

Expressão da proteína melanopsina por imunocitoquímica e *Western blot*

Utilizando-se os anticorpos específicos anti-melanopsina de *Xenopus laevis*, confirmamos a presença da proteína melanopsina pela imunorreatividade apresentada pelos melanóforos de *X. laevis* (Fig.3). Na presença de soro obtido antes da inoculação do coelho (controle negativo), não há marcação imunopositiva.

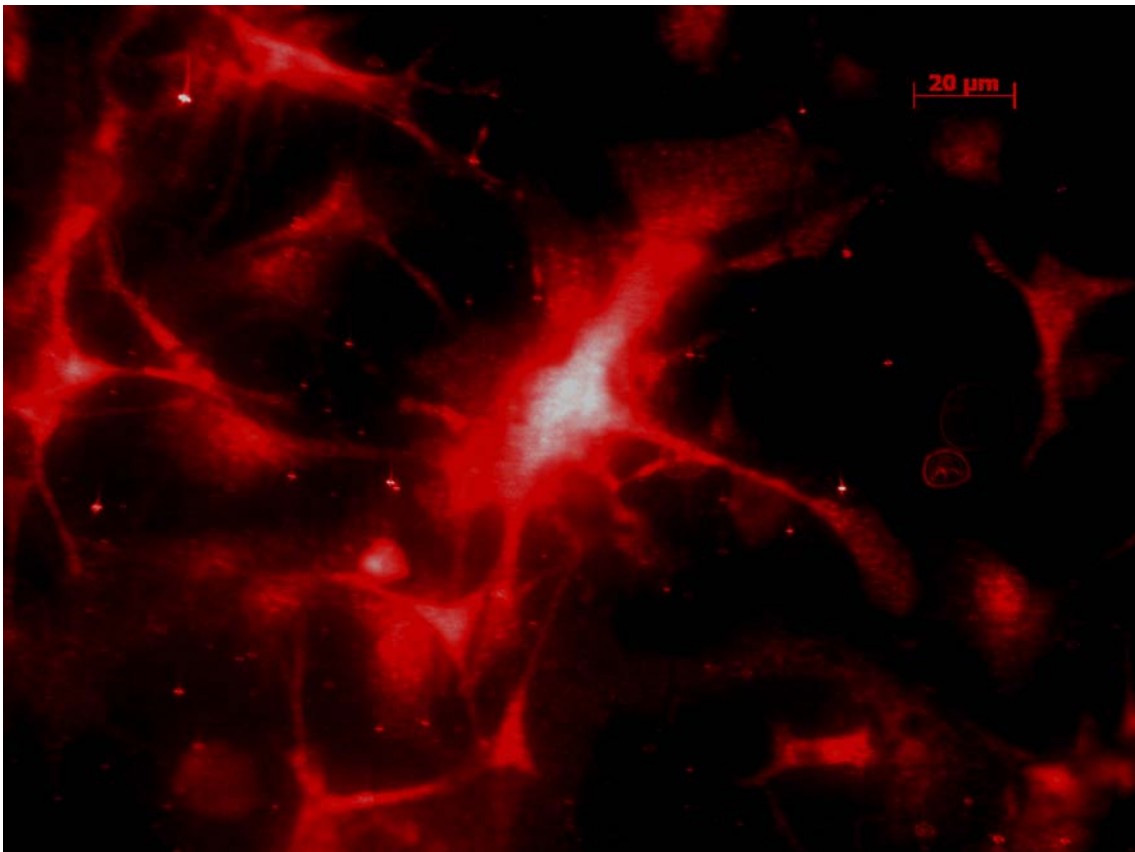


Fig.3. Melanóforos embrionários de *Xenopus laevis* imunorreativos para o anticorpo anti-melanopsina de *Xenopus laevis* (1:500). O anticorpo secundário foi marcado com Cy3 (diluição 1:500).

[Digite texto]

A proteína melanopsina foi também identificada em extrato de proteína total por Western blot (Fig.4), fornecendo ferramenta ideal para avaliar o efeito de luz e hormônios sobre a tradução protéica da melanopsina em melanóforos de *X. laevis*. Anticorpos anti-actina disponíveis comercialmente marcam a actina dessa espécie.

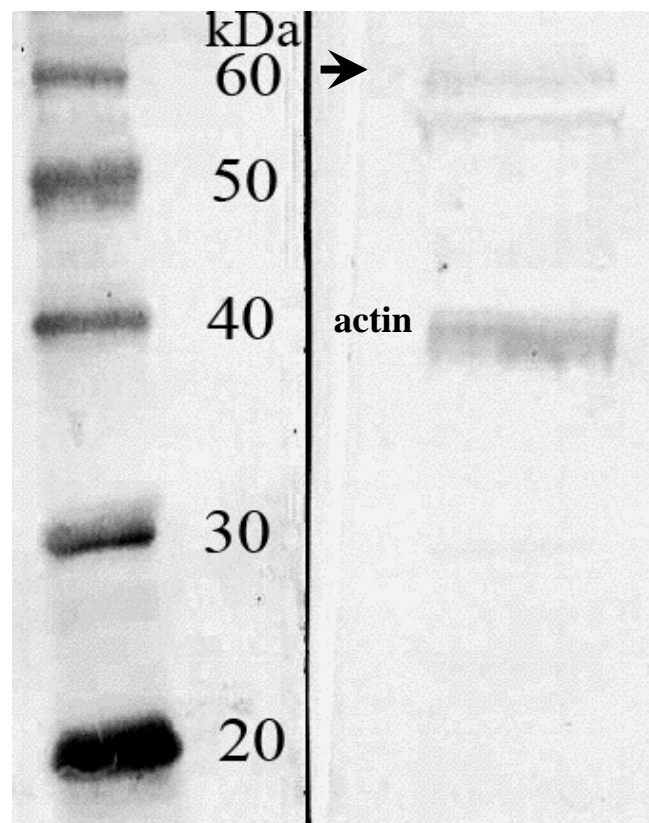


Fig.4 . *Western blot* para melanopsina em melanóforos de *Xenopus laevis*, na presença de anticorpo anti-melanopsina de *Xenopus laevis* (1:500). A seta aponta a banda positiva.

[Digite texto]

Expressão temporal de *Opn4*, *Clock*, *Per1*, *Per2* e *Bmal1*

Ensaio para acompanhar a expressão do gene da *Opn4* foram realizados na ausência e na presença de α -MSH, e em condições de soro fetal bovino reduzido de 10% para 2% durante 1 a 8 dias. Os resultados destes testes (não mostrados) levaram à conclusão de que a retirada do hormônio do meio de cultura e/ou a redução do soro leva a um aumento na expressão de *Opn4*, em regime de escuro constante, nos primeiros dias. Porém, os níveis de RNAm com a retirada de ambos parecem se estabilizar após 4 a 5 dias. Com base nestes dados, optamos por retirar o α -MSH do meio de cultura para a análise dos genes investigados, com a finalidade de padronizar as condições experimentais.

Para chegarmos ao protocolo definitivo do presente estudo, vários experimentos foram realizados, tendo sido necessário um longo período de padronização para nossos ensaios. Em primeiro lugar, os melanóforos são células muito sensíveis e de difícil manutenção, tendo sido trabalhosa a etapa de adaptação à manutenção e a realização da parte experimental.

Várias foram, também, as tentativas para a padronização da quantidade de células que deveria ser semeada para que pudéssemos realizar uma extração de RNA total suficiente para a confecção do cDNA por RT-PCR. Estas células precisam de um longo tempo de adaptação desde a semeadura, até o dia da extração do RNA (cerca de 10 dias).

Além disso, enfrentamos problemas graves relacionados ao equipamento iCycler da BioRad. Através da realização de vários experimentos e testes com PCR em tempo real, observamos que o equipamento não estava

[Digite texto]

operando corretamente. Em um único experimento, as duplicatas ou triplicatas de uma mesma amostra, que haviam sido preparadas juntas e adicionadas a poços diferentes da placa de corrida, apresentavam resultados completamente diferentes.

Foram então realizados testes que demonstraram que o iCycler da empresa BioRad não era capaz de realizar PCR em tempo real quando havia a presença de mais de uma sonda presente em uma mesma reação, ou seja, o aparelho não era capaz de realizar reações múltiplas no mesmo poço, cujos resultados fossem confiáveis e reproduzíveis, já que a presença de mais de uma sonda por poço levava a resultados diferentes, dependendo da combinação dos fluoróforos utilizados.

Devido à obtenção de resultados insatisfatórios com a utilização das *probes*, optou-se por realizar os PCRs em tempo real com a presença do fluoróforo SYBR Green (BioRad, EUA), dispensando o uso de sondas.

Além desse problema, a máquina por diversas vezes ficou parada, por defeito de fabricação e/ou incompetência da assistência técnica, aqui e no exterior. Decidimos iniciar os experimentos temporais e de efeito da melatonina em paralelo, pois o tempo que nos restava era curto.

Quando iniciamos os experimentos com a adição de melatonina, que deveria permanecer em contato com as células 24 horas antes da extração, notamos que as mesmas acabavam morrendo, aparentando ser por algum tipo de contaminação. Como a “contaminação” atingia apenas as células que haviam entrado em contato com a melatonina, desconfiamos que nosso problema não fosse devido a uma contaminação realmente, mas, devido à sensibilidade dos melanóforos, os mesmos não estavam agüentando um

[Digite texto]

contato tão longo com a solução de melatonina. Realizamos, então, diversos testes, diminuindo o tempo de exposição para 12 e depois para 6 horas, até chegar a pulsos de 1 hora, tendo sido este o tempo escolhido por não afetar as células de forma nociva.

Análise da expressão temporal de *Opn4* nos regimes 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10^{-9} M

De acordo com a os dados obtidos em regime fotoperiódico de 14hC:10hE, a *Opn4* apresenta um aumento estatisticamente significativo da expressão do RNAm às 6h.

Em condição de escuro constante, a expressão de *Opn4* aumenta significativamente em 0 e 12h, reduzindo-se gradual e significativamente entre 3-9h e 15-21h. Em comparação à condição de 14C:10E, observa-se de modo geral um aumento dos níveis de expressão relativa.

Quando as células são submetidas à condição de escuro constante, tratadas com melatonina 10^{-9} M, durante uma hora, 24 h antes do início da extração de RNAm, observa- um aumento significativo da expressão relativa do RNAm às 12h. Entretanto, comparada à condição de escuro constante, observa-se que a melatonina, de modo geral, atenuou a expressão relativa do RNAm de *Opn4* (Fig 5).

[Digite texto]

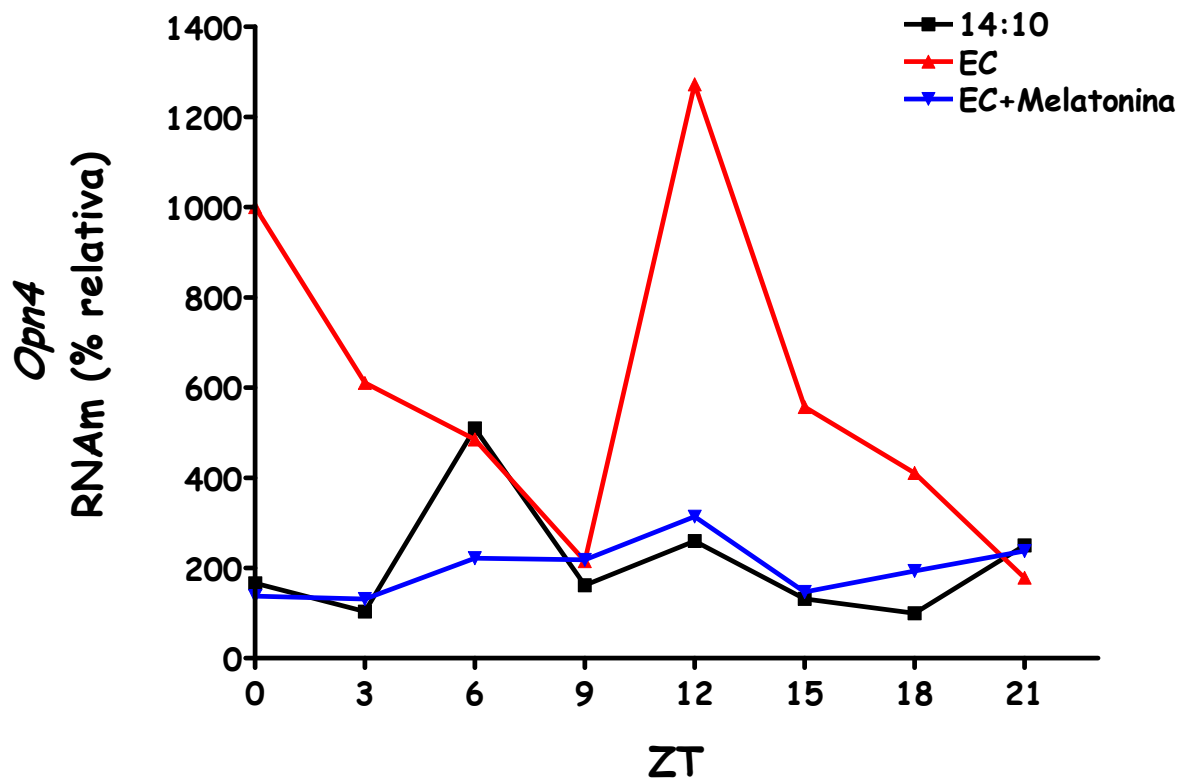


Fig.5 . Expressão relativa de *Opn4* em 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10^{-9} M(n= 3-5).

[Digite texto]

Análise da expressão temporal de *Clock* nos regimes 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10^{-9} M

De acordo com os dados obtidos em regime fotoperiódico de 14hC:10hE, a expressão relativa do gene *Clock* apresenta um aumento estatisticamente significativo da expressão do RNAm às 12h.

Em condição de escuro constante, a expressão de *Clock* aumenta significativamente a 0h, apresentando uma redução significativa entre 3-9h e 18-21h. Em comparação à condição de 14C:10E, observa-se de modo geral um aumento dos níveis de expressão relativa do RNAm de *Clock*, com exceção do horário das 12h, que, em regime 14C:10E possui expressão mais elevada.

Quando as células são submetidas à condição de escuro constante e tratadas com melatonina 10^{-9} M, durante uma hora, 24 h antes do início da extração de RNAm, observa-se um aumento da expressão relativa do RNAm às 21h. Porém, comparando-se à condição de escuro constante, observa-se que a melatonina, de modo geral, aumentou a expressão relativa do RNAm de *Clock*, com exceção do horário das 12h (Fig. 6).

[Digite texto]

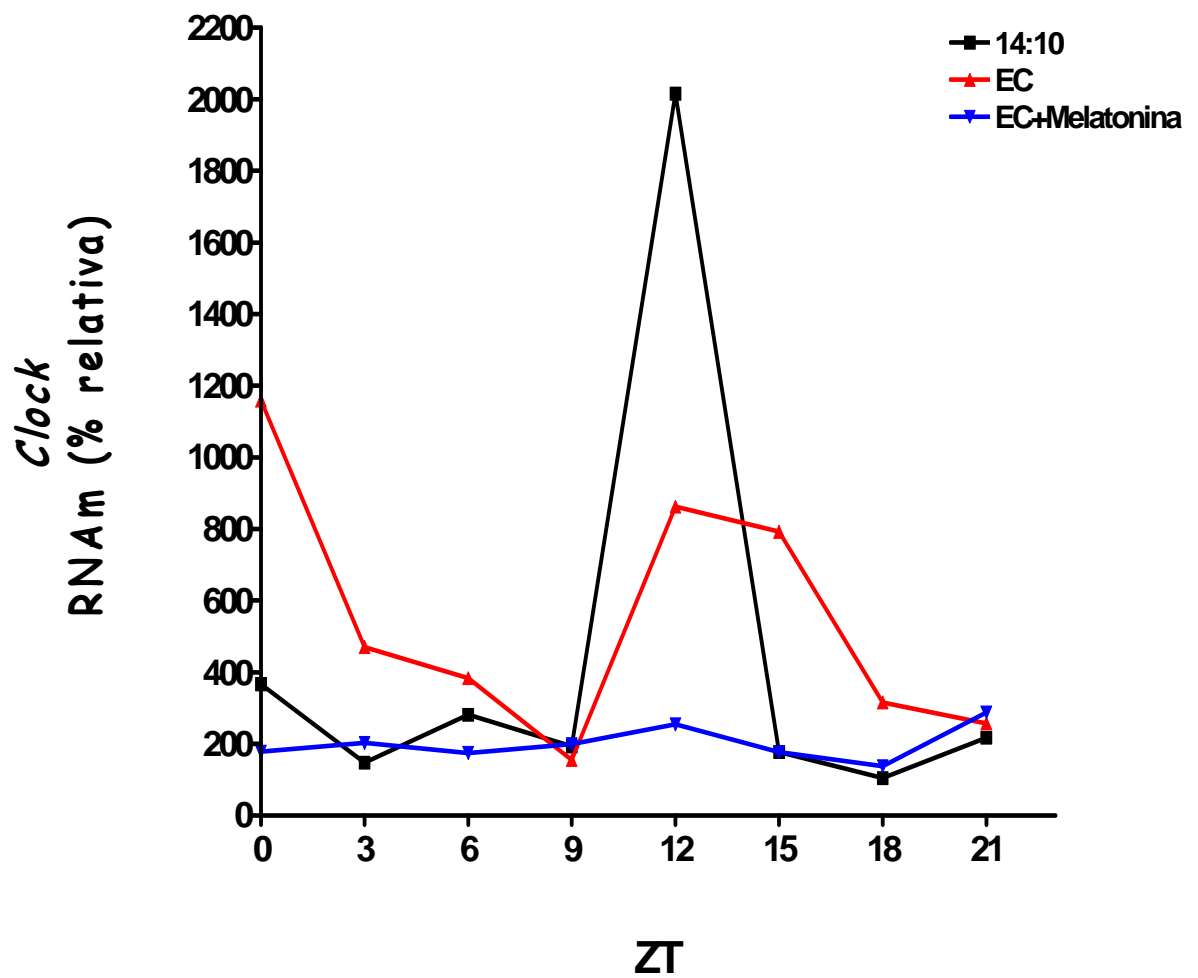


Fig.6 . Expressão relativa de *Clock* em 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10^{-9} M(n= 3-5).

[Digite texto]

Análise da expressão temporal de *Bmal1* nos regimes 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10^{-9} M

De acordo com os dados obtidos em regime fotoperiódico de 14hC:10hE, a expressão relativa do gene *Bmal1* apresenta uma diminuição estatisticamente significativa da expressão do RNAm entre 3-9h.

Em condição de escuro constante, a expressão de *Bmal1* oscila, sendo menor às 6 e às 15h, aumentando significativamente em 3 e 18h. Em comparação à condição de 14C:10E, observa-se de modo geral que a expressão do RNAm de *Bmal1* é maior em 14C:10E nos horários 0, 12-18h, mantendo-se praticamente estável nos demais horário.

Quando as células são submetidas à condição de escuro constante, tratadas com melatonina 10^{-9} M, durante uma hora, 24 h antes do início da extração de RNAm, não se observa alteração dos níveis da expressão relativa do RNAm. Em comparação à condição de escuro constante, observa-se que a melatonina, de modo geral, mantém o nível de expressão relativa do RNAm de *Bmal1* (Fig. 7).

[Digite texto]

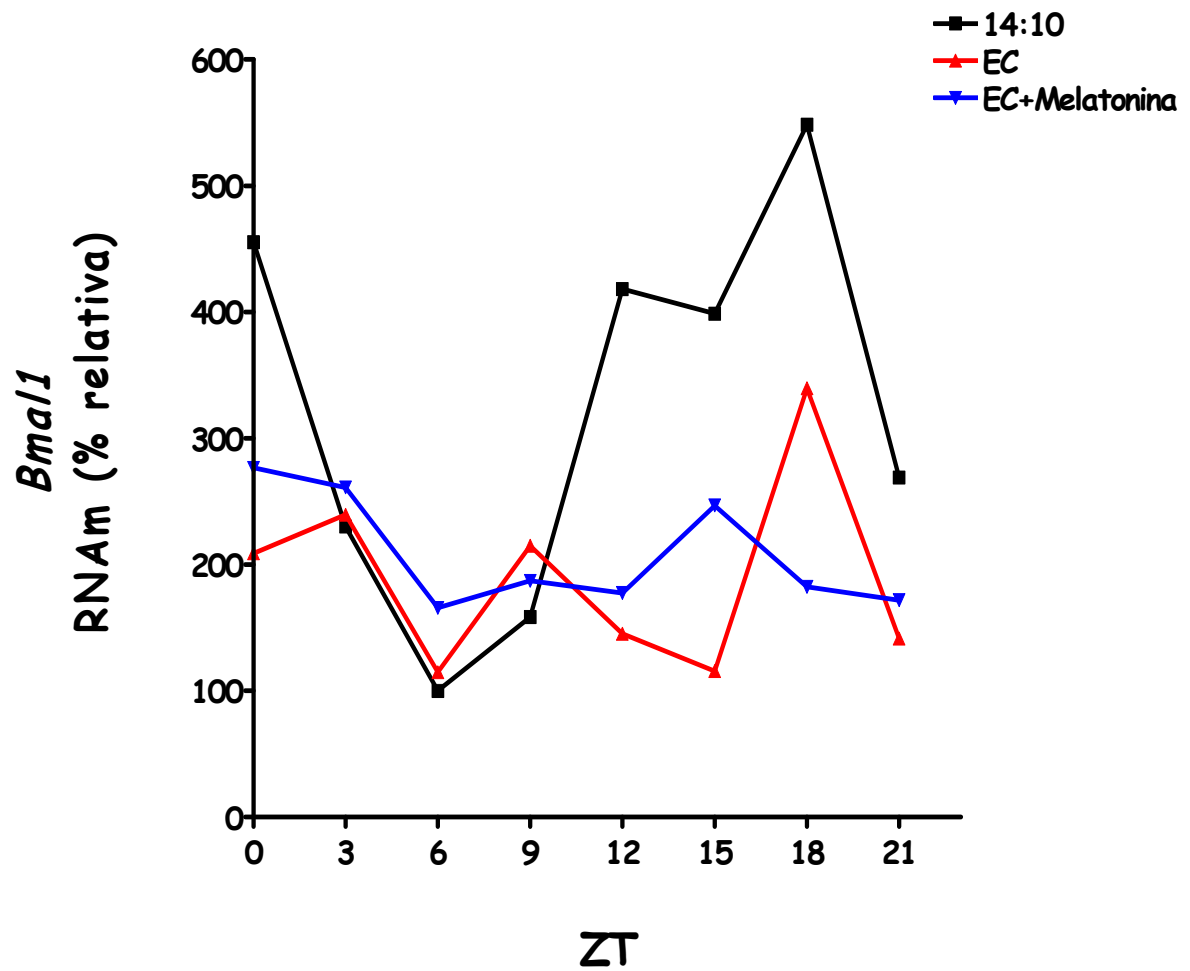


Fig.7 . Expressão relativa de *Bmal1* em 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10^{-9} M(n= 3-5).

[Digite texto]

Análise da expressão temporal de *Per1* nos regimes 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10^{-9} M

De acordo com os dados obtidos em regime fotoperiódico de 14hC:10hE, a expressão relativa do gene *Per1* apresenta uma redução estatisticamente significativa da expressão do RNAm a 0h e de 15-21h.

Em condição de escuro constante, a expressão de *Per1* não sofre aumento ou redução significativos. Porém, quando se compara com a expressão na condição de 14C:10E, observa-se de modo geral a expressão relativa do RNAm é significativamente maior entre 3-12h, ou seja, período em que a luz está acesa.

Quando as células são submetidas à condição de escuro constante, tratadas com melatonina 10^{-9} M, durante uma hora, 24 h antes do início da extração de RNAm, a expressão de *Per1* aumenta significativamente entre 0-3h, em relação a 6-21h. Porém, comparando-se à condição de escuro constante, observa-se que a melatonina aumentou de modo geral a expressão relativa do RNAm de *Per1* no mesmo período (Fig. 8).

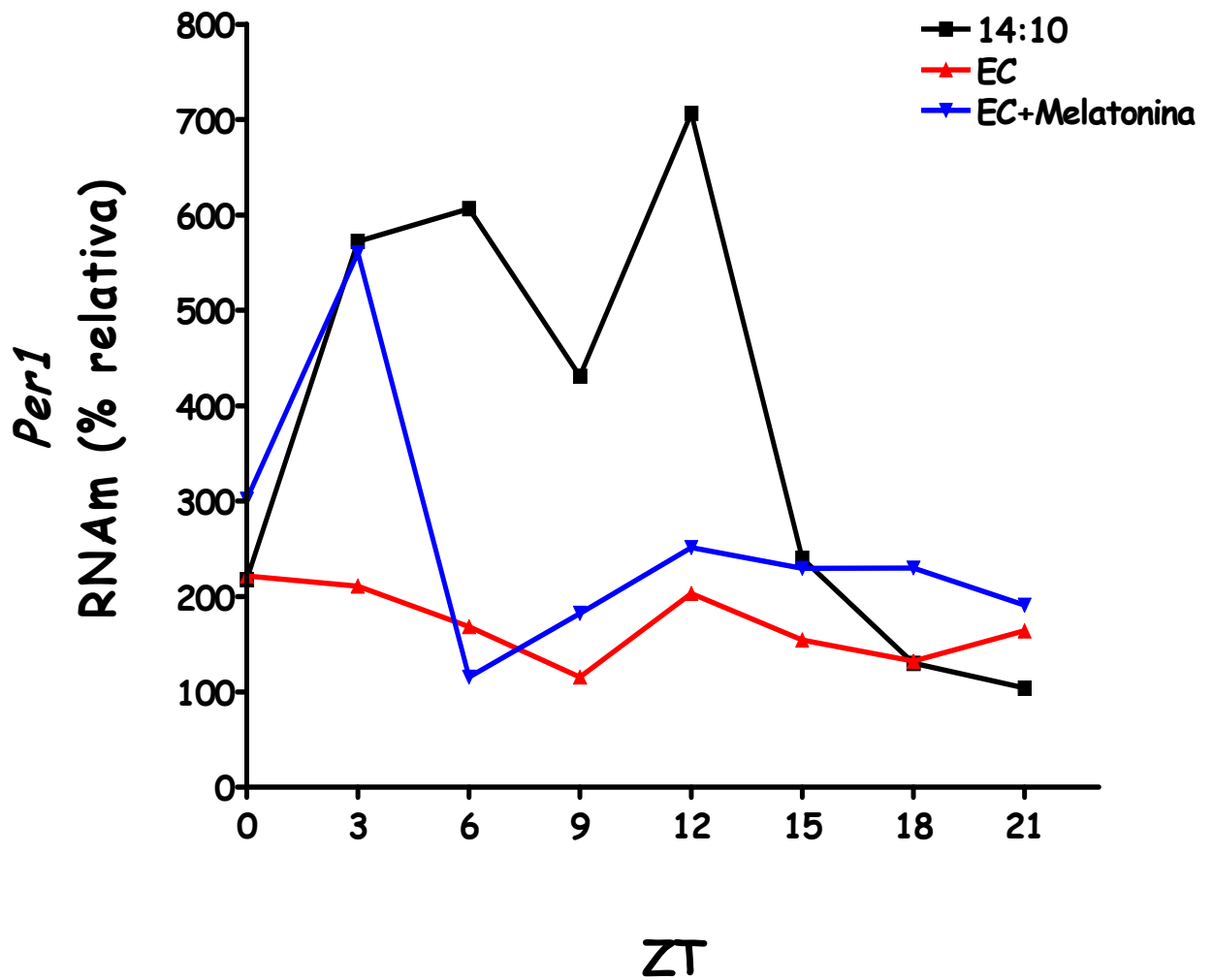


Fig.8 . Expressão relativa de *Per1* em 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10^{-9} M(n= 3-5).

Análise da expressão temporal de *Per2* nos regimes 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10^{-9} M

De acordo com os dados obtidos em regime fotoperiódico de 14hC:10hE, a expressão relativa do gene *Per2* apresenta um aumento gradual e significativo da expressão do RNAm entre 6-12h, além de apresentar uma redução gradual a partir de 15h.

Em condição de escuro constante, a expressão de *Per2* aumenta às 3 e às 18h, reduzindo-se entre 15-18h. Em comparação à condição de 14C:10E, observa-se de modo geral um aumento dos níveis de expressão relativa do RNAm de *Per2*, às 3 e às 12h.

Quando as células são submetidas à condição de escuro constante, tratadas com melatonina 10^{-9} M, durante uma hora, 24 h antes do início da extração de RNAm, observa-se um aumento da expressão relativa do RNAm às 12 e às 21h. Comparando-se à condição de escuro constante, observa-se que a melatonina, de modo geral, mantém a expressão relativa do RNAm de *Per2*, com exceção do horário das 3h, que possui maior expressão sem o tratamento com o hormônio (Fig. 9).

[Digite texto]

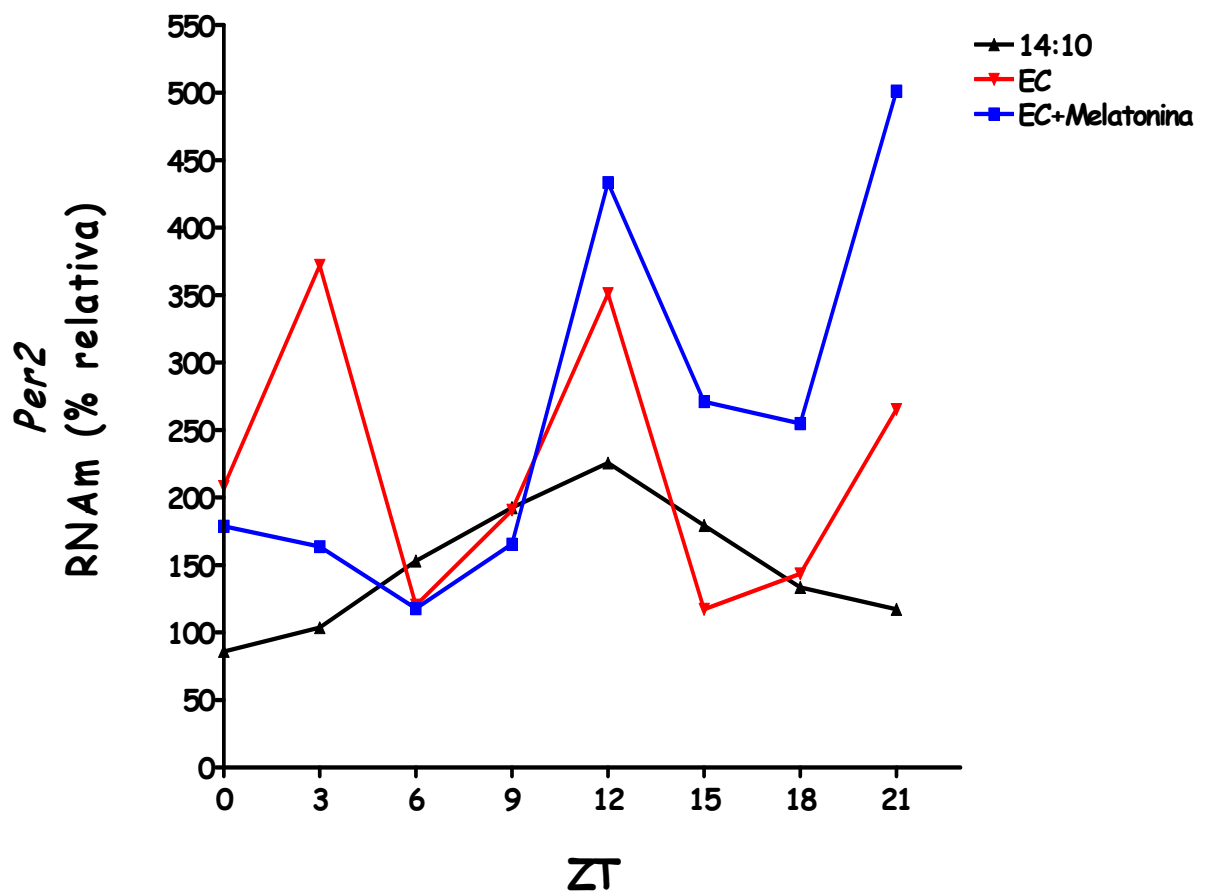


Fig.9 . Expressão relativa de *Per2* em 14C:10E, escuro constante e tratamento com melatonina 10^{-9} M(n= 3-5).

[Digite texto]

DISCUSSÃO

[Digite texto]

Neste estudo investigamos a expressão temporal da *Opn4* e dos genes de relógio *Per1*, *Per2*, *Bmal1* e *Clock* e o efeito da melatonina sobre a expressão temporal destes genes nos melanóforos dérmicos do anfíbio *Xenopus laevis*.

Os relógios biológicos foram identificados em diferentes tecidos, das mais diferentes espécies. Porém, os relógios presentes em diferentes tipos celulares podem apresentar características funcionais diversas; são osciladores celulares e/ou moleculares auto-suficientes, que são ajustados por ciclos ambientais (particularmente dia x noite). Em *Drosophila*, por exemplo, onde foram encontrados relógios circadianos em todos os tecidos estudados, o marca-passo principal deste invertebrado mantém as suas oscilações durante um longo tempo, quando permanecem em condição de escuro constante, apresentando uma pequena, ou nenhuma, perda em seu ritmo. Porém, as diferenças envolvidas entre o marca-passo central e a maquinaria do relógio neste e nos demais sistemas de vertebrados e invertebrados ainda não estão totalmente esclarecidas (Balsalobre *et al*, 1998; Schibler & Sassone-Corsi, 2002; Peng *et al*, 2003; Iuvone *et al*, 2005).

Os melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis* respondem à luz com a dispersão dos melanossomos, o que é característico de melanóforos derivados de embriões deste anfíbio (Rollag *et al*, 2000). Essa capacidade de melanóforos de anfíbios em reagir diretamente à luz é freqüente, mas nem sempre mantida. Duas respostas cromáticas primárias são observadas, sendo que a mais comum é a dispersão dos grânulos de pigmentos pelo citoplasma quando os melanóforos de anfíbios são expostos à luz (Daniolos *et al.*, 1990).

[Digite texto]

Em nossos experimentos, o *Zeitgeber* 0 (0h) corresponde à hora em que a luz acende (9h); além disso, todos os experimentos foram montados na mesma hora do dia (por volta das 15 h) e o meio de cultura foi trocado no mesmo horário, quando necessário. Essa padronização foi necessária, pois Yoshikawa e cols. (2005) mostraram que culturas de células obtidas de órgãos, que contenham osciladores circadianos centrais ou periféricos, podem ter suas oscilações arrastadas pela hora de obtenção e da troca do meio das culturas.

Embora pareça curioso que melanopsina tenha sido inicialmente clonada em melanóforos dérmicos de um anfíbio, *X. laevis*, seu papel nessas células é evidente: percepção das condições luminosas para resposta de ajuste cromático corporal com fins de mimetismo e termorregulação, graças à resposta de dispersão pigmentar. Em aves, no entanto, a presença desse fotopigmento em melanócitos, que não apresentam resposta de translocação pigmentar, abre imensas possibilidades e especulações a respeito de sua função nesse tipo celular. Sabe-se que radiação ultravioleta evoca alterações dramáticas na síntese de melanina e na proliferação de melanócitos em mamíferos, inclusive no homem (Thody & Graham, 1998; Catania *et al.*, 2000).

Melanóforos de *Xenopus laevis* são também modelos para a investigação das vias de transdução de sinal da *Opn4*, justamente por expressar naturalmente este fotopigmento. Embora as ipRGCs também expressem *Opn4*, as respostas de ativação destes dois tipos celulares aparentam ser diferentes; os melanóforos redistribuem os melanossomos, enquanto as ipRGCs produzem despolarização na membrana, quando ambas são expostas à luz, sugerindo que estas células apresentam reação à luz por vias de sinalização diferentes.

[Digite texto]

Trabalhos anteriores sugerem que, nestes melanóforos, a melanopsina estaria acoplada a proteína Gs para fotodispersão, com um aumento dos níveis de AMPc durante essa resposta (Daniolos *et al.*, 1990). Já a fotoagregação exibida por melanóforos isolados de girinos é inibida por toxina de pertussis (Rollag, 1993), indicando um acoplamento à proteína Gi.

Neste mesmo modelo, Isoldi e cols. (2005), trabalhando na investigação do segundo mensageiro envolvido em sua via de sinalização, observaram um aumento de quatro vezes nos níveis de GMPc após 1 min de exposição das células à luz. Também observaram resposta semelhante quando da aplicação do ativador de guanilil ciclase YC-1 em escuro constante. Este ativador, porém, não potencializou os níveis de GMPc em exposição à luz. Ainda, a resposta fóptica obtida nesta investigação possui um espectro de ação consistente com a observação de Daniolos e cols. (1990) e de que é dependente de retinaldeído, conforme observação de Rollag & Lynch (1993).

Como mencionado anteriormente, o sistema circadiano é constituído por um marca-passo, em conjunto com sistemas de entrada e saída, sendo este sistema aparentemente similar em todos os organismos (Collin *et al.*, 1989; Takahashi, 1995). A oscilação circadiana dos genes de relógio controla a expressão de genes envolvidos em múltiplas funções celulares, durante o período aproximado de 24 horas por, pelo menos dois mecanismos: (1) pela interação direta com os *E-boxes* nos promotores destes genes e (2) através da regulação de outros genes controladores do relógio, que também agem como fatores de transcrição (Reppert & Weaver, 2002; Richter *et al.*, 2002; Levi & Schibler, 2007).

[Digite texto]

O mecanismo molecular envolvido na manutenção da ritmicidade circadiana é determinado pela transcrição/tradução em alças de retroalimentação, sendo estas baseadas na expressão rítmica do RNAm e proteínas dos componentes do relógio circadiano. A sincronização do NSQ pela luz induz a expressão de um grupo de genes de relógio, dentre eles *Per2* e *Per1* (Cajochen *et al.*, 2006). Embora os genes *Per* sejam elementos críticos para o funcionamento relógio, suas funções específicas ainda não são bem definidas. Por exemplo, o fato de um único gene *Per*, em *Drosophila*, ser suficiente como alça negativa do funcionamento do relógio, enquanto no sistema dos mamíferos encontram-se três genes *Per* homólogos (*Per1*, *Per2* e *Per3*), sendo que dois deles (*Per1* e *Per2*) são essenciais para o funcionamento do NSQ. Aparentemente, estes três genes homólogos possuem funções distintas (Besharse *et al.*, 2004).

Na retina de *X. laevis*, a expressão de *Per1* e *Per2* é incomum quando comparada ao sistema circadiano dos mamíferos, em que a expressão dos genes *Per1* e *Per2* é induzida pela luz (Besharse *et al.*, 2004); pois em retina de *Xenopus*, em regime 12C:12E, *Per2* possui um ritmo dependente da luz, com uma baixa expressão próxima ao horário de início da fase luminosa e um pico durante o dia. Por outro lado, neste anfíbio a expressão de *Per1* na retina não é induzida por luz (Zhuang *et al.*, 2000). Em melanóforos de *X. laevis*, a expressão de *Per2* apresenta, em regime fotoperiódico 14C:10E, um aumento de expressão na fase de claro, similar ao observado para esse gene na retina. Além disso, em contraste ao observada na retina, a expressão de *Per1* é maior na fase de claro, sugerindo que sua expressão seja induzida por luz, similar ao observado em mamíferos.

[Digite texto]

Com relação ao gene *Bmal1*, os resultados indicam que, em regime fotoperiódico de 14C:10E, *Bmal1* apresenta um decréscimo entre 3-9 ZT, o oposto ao observado para *Per2* na fase de claro. Há ainda um aumento de expressão bem visível no período 12-15 ZT (fim da fase de claro e início da fase de escuro), que se mantém em níveis elevados até 21 ZT. Estes resultados são, em termos gerais, o oposto do observado na expressão de *Per2*.

Resultados similares foram observados por Durgan e cols. (2006) em um modelo de mamífero (cardiomiócitos de ratos), em que analisaram os padrões de oscilação em um período de 24 h, com coleta de amostras a cada 3 h, mesmo protocolo que utilizamos neste trabalho. Em experimentos com fotoperíodo 12C:12E, os autores relatam uma diminuição da expressão de *Bmal1* na fase de claro e aumento no escuro, e o oposto ocorre com a expressão de *Per2*.

Em geral, um ciclo circadiano tem início nas primeiras horas da manhã com a ativação da transcrição de *Per* e *Cry* por CLOCK/BMAL1. Ainda, de acordo com Albrecht e Eichele (2003), os níveis de transcrição atingem seu ápice por volta de meio-dia, e de fato nossos dados indicam aumento de expressão em 12-15ZT, para ambos os genes, que corresponde ao fim da fase de claro e início da de escuro. A expressão de *Bmal1* se mantém elevada em toda a fase de escuro. Pelo modelo proposto para mamíferos, essa expressão elevada propiciaria a síntese da proteína BMAL1 e conseqüente dimerização com CLOCK, o que levaria ao aumento de expressão de *Per2*. Nossos dados com esses transcritos corroboram esse modelo (Akashi & Nishida, 2000; Hirota & Fukada, 2004).

[Digite texto]

A melatonina, hormônio secretado pela glândula pineal, está diretamente relacionada à maquinaria do relógio biológico. É secretada durante a noite em todas as espécies, estando associada ao sono, manutenção da temperatura corporal, resposta imunológica e outros eventos fisiológicos noturnos. Ela pode ser definida como uma substância “*cronobiótica*”, ou “*uma substância que ajusta a engrenagem central do relógio biológico*”. Existem boas evidências de que a administração exógena de melatonina pode ajustar diversos ritmos, como sono, a temperatura corporal, a secreção endógena de cortisol e da própria melatonina, e, *in vitro*, pode alterar a atividade eletrofisiológica e metabólica no NSQ (Anisimov, 2003; Markus et al, 2007). Em algumas circunstâncias, a melatonina pode sincronizar o ritmo circadiano (24h) em indivíduos que estejam em livre-curso, ou seja, podem fazer com que estes indivíduos voltem a expressar o período natural de seus relógios biológicos internos (Arendt, 1995; Dijk & Cajochen, 1997; Brainard *et al*, 2001; Arendt & Skene, 2005), Em melanóforos dérmicos de *X. laevis*, nossos dados indicam que a melatonina, mesmo com apenas 1h de incubação, reajusta os níveis de RNAm em escuro constante para os patamares daqueles expressos em 14C:10E, sugerindo que essa função seja filogeneticamente conservada.

O mecanismo que está envolvido nestes efeitos que a melatonina parece exercer no NSQ, ditando ajustes nos ritmos circadianos ainda precisa ser determinado. Provavelmente, os efeitos diretos da melatonina possam mascarar os ritmos abertos, por mecanismo de retroalimentação, modificando a atividade do NSQ. Os receptores envolvidos nestes efeitos ainda necessitam caracterização, principalmente em humanos, mas deve-se considerar também

[Digite texto]

que a melatonina, por ser anfipática, possa atuar intracelularmente sem a intermediação de receptores de membrana (Almeida-Paula *et al*, 2005).

A regulação gênica rítmica é importante desde o desenvolvimento embrionário, pois a ritmicidade circadiana é uma característica fundamental dos organismos, que nos ajuda a assegurar que as funções vitais ocorram em uma seqüência temporal apropriada e precisa, de acordo com as mudanças ambientais cíclicas. Os genes de relógio são necessários para a sustentação dos ritmos circadianos sob condições constantes. Deficiências crônicas nos mecanismos de ajustes dos relógios endógenos provavelmente podem provocar diversas desordens relacionadas aos ritmos circadianos dos mais diversos organismos. Animais mutantes para genes de relógio apresentam ritmos anormais e, em alguns casos, algumas arritmidades. Os genes de relógio também estão associados às desordens rítmicas em humanos (Moser *et al*, 2006; Ko & Takahashi, 2006; Seron-Ferre *et al*, 2007; Nayak *et al*, 2007).

Desta forma, parece razoável que o desenvolvimento celular anormal encontrado em células tumorais, por exemplo, podem estar diretamente conectados aos distúrbios de ritmicidade, bem como desordens afetivas sazonais e depressão (Moser *et al*, 2006; Seron-Ferre *et al*, 2007; Nayak *et al*, 2007).

A última década parece ter sido fundamental para o progresso de nosso entendimento a respeito da organização e da função do relógio circadiano. Alguns novos genes relacionados ao funcionamento dos relógios biológicos foram descobertos, e estes genes e suas proteínas correspondentes parecem funcionar pelos mecanismos de retroalimentação para gerar ritmos próximos a 24 horas. Porém, estes mecanismos aparentam serem muito mais complexos

[Digite texto]

do que os mecanismos descritos anteriormente, principalmente pelo fato de alguns dos genes recém descobertos são homólogos a genes já conhecidos, sugerindo uma redundância funcional (Dardente & Cermakian, 2007).

Estes novos componentes do relógio podem desempenhar papéis importantes na sintonia fina, estabilização e/ou no reajuste do relógio. Por exemplo, as proteínas NPAS2 e BMAL2 dividem uma enorme similaridade com CLOCK e BMAL1, respectivamente. NPAS2 forma um heterodímero transcricional ativo com BMAL1, enquanto BMAL2 pode formar heterodímeros ativos tanto com CLOCK, quanto com NPAS2. Estes heterodímeros podem ser eficientemente reprimidos pelas proteínas CRY ou PER2 (Cermakian *et al*, 2000; Hogenesch *et al*, 2000; Ikeda *et al*, 2000; Gotter *et al*, 2000; Maemura *et al*, 2000; Schoenhard *et al*, 2003; Reddy *et al*, 2006; Dardente & Cermakian, 2007).

O conjunto de resultados, que obtivemos em melanóforos dérmicos de *X. laevis*, se insere nesse contexto cada vez mais amplo e, se por um lado, nosso modelo possa ter um grau menor de complexidade, os mecanismos moleculares nele encontrados provavelmente são subjacentes aos de outros organismos, que investigações com uma perspectiva filogenética poderão confirmar.

REFERÊNCIAS

[Digite texto]

- Abe, M., Herzog, E.D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. & Block, G.D. 2002 Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci.*, 22: 350-356.
- Akashi, M. and E. Nishida (2000). "Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock." *Genes Dev* **14**(6): 645-9.
- Albrecht, U. & Eichele, G. 2003 The mammalian circadian clock. *Cur. Opin. Gen. Dev.*, 13: 271-277.
- Almeida-Paula, L.D.; Costa-Lotufo, L.V.; Monteiro, A. E. G. ; Ferreira, Z.S.; Godinho, R.O. ; Markus, R. P. . Melatonin modulates rat myotube-acetylcholine receptors by inhibiting calmodulin.. *European Journal of Pharmacology*, v. 525, p. 24-31, 2005.
- Anisimov VN. Effects of exogenous melatonin--a review. *Toxicol Pathol.* 2003 Nov-Dec;31(6):589-603.
- Arendt J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms.* 2005 Aug;20(4):291-303.
- Arendt, J., Skene, D. (2004). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* 9:25–39
- Aschoff, J. (1960). "Exogenous and endogenous components in circadian rhythms." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 25: 11-28.
- Bagnara, J.T. & Hadley, M.E. 1973 *Chromatophores and Color Change*. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, 304pp.
- Baldo, M.V.C. 1999 Visão, In: *Fisiologia*. Aires, M.M. (Coord.). Rio de Janeiro: ed. Guanabara-Koogan, p. 245-276.
- Balsalobre, A., Damiola, F. & Schliber, U. 1998 A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93: 929-937.
- Bargiello TA, Jackson FR, Young MW.. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 312:752–54, 1984.
- Barr, L. 1989 Photomechanical coupling in the vertebrate sphincter pupillae. *CRC Crit. Rev. Neurobiol.*, 4: 325-366.
- Barrett, R. e J. Takahashi. Lability of circadian pacemaker amplitude in chick pineal cells: a temperature-dependent process. *J Biol Rhythms*, v.12, n.4, 1997 Aug, p.309-18. 1997.

[Digite texto]

- Bartell, P.A., Miranda-Anaya, M. & Menaker, M. 2004 Period and phase control in a multioscillatory circadian system (*Iguana iguana*). *J. Biol. Rhythms*, 19: 47-57.
- Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*. 2005;6:544–556.
- Berson, D.M., Dunn, F.A. & Takao, M. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295:1070-1073.
- Besharse, J. C. and P. M. Iuvone (1983). "Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase." *Nature* **305**(5930): 133-5.
- Besharse, J. C., M. Zhuang, et al. (2004). "Regulation of photoreceptor *Per1* and *Per2* by light, dopamine and a circadian clock." *Eur J Neurosci* 20(1): 167-74.
- Binkley, S. Circadian rhythm in pineal N-acetyltransferase activity: phase shifting by light pulses (II). *J Neurochem*, v.41, n.1, 1983 Jul, p.273-6. 1983.
- Boissy, R.A. 1988 The melanocyte. Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes, and hair. *Dermatol. Clin.*, 6(2): 161-73.
- Brainard, G. C., J. P. Hanifin, et al. (2001). "Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor." *J Neurosci* 21(16): 6405-12.
- Brown S.A., Schibler U. 2001 Circadian rhythms: mop up the clock! *Curr Biol*. Apr 3;11(7):R268-70.
- Burchill, S.A., Virden, R. & Thody, A.J. 1989 Regulation of tyrosinase synthesis and its processing in the hair follicular melanocytes of the mouse during eumelanogenesis and pheomelanogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, 93: 236–240.
- Butler MP, Paul MJ, Turner KW, Park JH, Driscoll JR, Kriegsfeld LJ, Zucker I. Circadian rhythms of photorefractory siberian hamsters remain responsive to melatonin. *J Biol Rhythms*. 2008 Apr;23(2):160-9.
- Cahill, G. M. and J. C. Besharse (1991). "Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors." *J Neurosci* 11(10): 2959-71.

[Digite texto]

- Cajochen, C., C. Jud, et al. (2006). "Evening exposure to blue light stimulates the expression of the clock gene PER2 in humans." *Eur J Neurosci* 23(4): 1082-6.
- Camargo, C.R., Visconti, M.A. & Castrucci, A.M.L. 1999 Physiological color change in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Exp. Zool.*, 283:160-169.
- Carr, A.J. & Whitmore, D. 2005 Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. *Nat. Cell Biol.*, 7: 319-321.
- Carrillo-Vico, A., Calvo, J.R., Abreu, P., Lardone, P.J., Garciamauriño, S., Reiter, R.J. & Guerrero, J.M.. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.*, 18(3): 537-539, 2004.
- Cashmore, A., J. Jarillo, et al. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, v.284, n.5415, 1999 Apr, p.760-5. 1999, v.232, n.3, 1984 Dec, p.539-49. 1984.
- Castrucci, A.M., L. Hadley, M.E. & Hruby, V.J. 1984 Melanotropin bioassays: *in vitro* and *in vivo* comparisons. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 55 (1): 104-111.
- Catania A, Airaghi L, Colombo G, Lipton JM. Alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human physiology and disease states. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Oct;11(8):304-8.
- Chaurasia SS, Rollag MD, Jiang G, Hayes WP, Haque R, Natesan A, Zatz M, Tosini G, Liu C, Korf HW, Iuvone PM, Provencio I. Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (Opn4): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types. *J Neurochem*, v.92, n.1, 2005 Jan, p.158-70. 2005.
- 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, C. A. (1995). "The effect of light on the human circadian pacemaker." *Ciba Found Symp* 183: 254-90; discussion 290-302.
- Daniolos, A., Lerner, A.B. & Lerner, M.R. 1990 Action of light on frog cells in culture. *Pigment Cell Res.*, 3: 38-43.

[Digite texto]

- Davidson, A.J., London, B., Block G.D. & Menaker, M. 2005 Cardiovascular tissues contain independent circadian clocks. *Clin. Exp. Hypertens.*, 27: 307-311.
- De Luca, M., Siegrist, W., Bondanza, S., Mathor, M., Cancedda, R. & Eberle, A.N. 1993 α - melanocyte stimulating hormone (α -MSH) stimulates normal human melanocyte growth by binding to high-affinity receptors. *J. Cell Sci.*, 105:1079–1084.
- Dijk, D. J. and C. Cajochen (1997). "Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG." *J Biol Rhythms* 12(6): 627-35.
- Dubocovich, M.L., Yun, K., Al-Ghoul, W.M., Benlocif, S. & Masana, M.I. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J.*, 12: 1211-1220, 1998.
- Durgan DJ, Trexler NA, Egbejimi O, McElfresh TA, Suk HY, Petterson LE, Shaw CA, Hardin PE, Bray MS, Chandler MP, Chow CW, Young ME. The circadian clock within the cardiomyocyte is essential for responsiveness of the heart to fatty acids. *J Biol Chem.* 2006 Aug 25;281(34):24254-69. Epub 2006.
- Ebisawa, T.; Karne, S.; Lerner, M.R.; Reppert, S.M.: Expression cloning of high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci* 91:6133-6137, 1994.
- Edmunds, L.N.: Cellular and molecular basis of biological clocks: models and mechanisms for biological timekeeping. *Springer-Verlag*, Berlin, 1988.
- Fernald, R. D. (2006). "Casting a genetic light on the evolution of eyes." *Science* 313(5795): 1914-8.
- Filadelfi AMC, Camargo CR, Castrucci AML. Phylogeny of purine and endothelin receptors in vertebrate integumentary melanocytes. *Pigment Cell Res* 1996;5:83
- Filadelfi, A. M. and A. M. Castrucci (1996). "Comparative aspects of the pineal/melatonin system of poikilothermic vertebrates." *J Pineal Res* 20(4): 175-86.
- Filadelfi AMC, Ramanzini, GC, Visconti, MA, Castrucci AML The Endothelin/Sarafotoxin-Induced Increase of the Proliferation of Undifferentiated and DMSO-Differentiated GEM-81 Goldfish
-

[Digite texto]

Erythrophoroma Cells is Mediated by ETB Receptors. *Pigment Cell Res* 17: 480–487. 2004

Fujii R, Tanaka Y, Hayashi H. Endothelin-1 causes aggregation of pigment in teleostean melanophores. *Zool Sci* 1993;10:763–772.

Fujii, R. 2000 The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell Res.*, 13: 300-19.

Fujii, R. & Miyashita, Y. 1982 Receptor mechanisms in fish chromatophores--V. MSH disperses melanosomes in both dermal and epidermal melanophores of a catfish (*Parasilurus asotus*). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 71 (1): 1-6.

Fujii R, Oshima N (1994) Factors influencing motile activities of fish chromatophores. In: *Advances in comparative and environmental physiology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1–54.

Fujita T, Fujii R. Endothelins disperses light-scattering organelles in leucophores of the medaka, *Oryzias latipes*. *Zool Sci* 1997;14:559–569.

Gehring W, Rosbash M. The coevolution of blue-light photoreception and circadian rhythms. *J Mol Evol.* 2003;57 Suppl 1:S286-9.

Gery, S., Komatsu, N., Baldjyan, L., Yu, A., Koo, D. and Koeffler, H.P. The circadian gene *Per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Mol. Cell*, 22, 375–382, 2006.

Golden S.S., Canales S.R. 2003 Cyanobacterial circadian clocks--timing is everything. *Nat Rev Microbiol.* Dec;1(3):191-9.

Golombek, D.A. & Roblero, R.A. 2003 Mecanismos de temporização nos vertebrados. In: *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. Marques N. (Coord.) São Paulo: ed. EDUSP. 163-190.

Gotter, A.L., Manganaro, T., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F, Jr. & Possidente, B. 2000 A timeless function for mouse Timeless. *Nat. Neurosci.*, 3: 755-756.

Green, C. B. and M. Menaker (2003). "Circadian rhythms. Clocks on the brain." *Science* 301(5631): 319-20.

Green, C. B.; Besharse, J. C. 2004 Retinal circadian clocks and control of retinal physiology. *J. Biol. Rhythms*, 19(2):91-102.

Guido M.E., Carpentieri, A.R., Garbarino-Pico, E. 2002 Circadian phototransduction and the regulation of biological rhythms. *Neurochem Res.* Nov;27(11):1473-89.

[Digite texto]

- Hall, J. & Rosbash, M. 1987 Genetics analysis of biological rhythms. *J. Biol. Rhythms*, 2: 153-178.
- Hall, J. & Rosbash, M. 1988 Mutations and molecular mechanisms of biological rhythms *Annu. Ver. Neurosci.*, 11: 373-393.
- Hardeland, R. & Poeggeler, B.. Non-vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.*, 34: 233-241, 2003.
- Hattar, S.; Liao, H.W & Takao, M. 2002 Berson, D.M & Yau, K.W.: Melanopsin containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, 295: 1065-1070.
- Hirota, T. and Y. Fukada (2004). "Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals." *Zoolog Sci* 21(4): 359-68.
- Hunt, G., Todd, C., Cresswell, J.E. & Thody, A.J. 1994 α -Melanocyte stimulating hormone and its analogue [Nle⁴-DPhe⁷] α -MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell. Sci.*, 107: 205–211.
- Iga, T. & Takabatake, I. 1983. Melanophores of *Zacco temminckii* (Teleostei) are light sensitive. *J. Exp. Zool.*, 227: 9-14.
- Im, L.H.J., Isoldi, M.C., Scarparo, A.C., Visconti, M.A. & Castrucci, A.M.L, 2006 Rhythmic expression, light entrainment and alpha-MSH modulation of rhodopsin mRNA in a teleost pigment cell line. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007 Jul;147(3):691-6.
- Isoldi, M.C, Rollag, M.D., Castrucci, A.M. & Provencio, I. 2005 Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 1217–1221.
- Iluvone, P. M., G. Tosini, et al. (2005). "Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina." *Prog Retin Eye Res* 24(4): 433-56.
- Johnston, J.D., Tournier, B.B., Andersson, H., Masson-Pévet, M., Lincoln, G.A. & Hazlerigg, D.G. 2006 Multiple effects of melatonin on rhythmic clock gene expression in the mammalian pars tuberalis. *Endocrinology*, 147: 959-965.
- Kasal, C., M. Menaker, *et al.* Circadian clock in culture: N-acetyltransferase activity of chick pineal glands oscillates in vitro. *Science*, v.203, n.4381, 1979 Feb, p.656-8. 1979.

[Digite texto]

- Krasinsky, G. 2002 Dynamical history of the earth-moon system. *Celestial Mechanics and Dynamical Astronomy* 84:27-55.
- Kitta K, Marini M, Oshima N, Bern H. Effects of prolactin on the chromatophores of the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Gen Comp Endocrinol* 1993;92:355–365.
- Ko CH and Takahashi, JS. Molecular components of the mammalian circadian clock *Human Molecular Genetics*, 2006, Vol. 15, Review Issue No. 2 R271–R277.
- Konopka RJ, Benzer S.. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:2112–16, 1971.
- Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, et al. 2001. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107:855–867.
- Lee K, Loros JJ, Dunlap JC. Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. *Science* 289:107–10, 2000.
- Lerner, A.B., Takahashi, Y., Lee, T.H. & Mori, W.. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.*, 80: 2587 1958.
- Lerner AB, Case JD, Takahasji Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem* 1960;235:1992–1997.
- Levi F, Schibler U. 2007. Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:593–628.
- Lopes, P.F., Marques, N. Pinto, E. & Colepicolo, P. 2003 *Organização Celular e Molecular dos Ritmos Biológicos In: Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. São Paulo: ed. EDUSP. 223-245p.
- Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, et al. 2000. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288:483–492.
- Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004;5:407-41
- Marques, M.D.; Golombek, D. & Moreno, C. *Adaptação Temporal In: EDUSP. Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. São Paulo, 1999. p. 45-84.

[Digite texto]

- Markus RP, Ferreira ZS, Fernandes PA, Cecon E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. Neuroimmunomodulation. 2007;14(3-4):126-33. Epub 2007
- Masson-Pévet, M., George, D., Kalsbeek, A., Saboureau, M., Ghazal, L.N & Pévet. P. 1994 An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic function: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res.*, 278: 97-106.
- McCarren, J. and E. F. DeLong (2007). "Proteorhodopsin photosystem gene clusters exhibit co-evolutionary trends and shared ancestry among diverse marine microbial phyla." *Environ Microbiol* 9(4): 846-58.
- McCord CP, Allen FP. Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 1917;23:207–224.
- McNamara, P., Seo, S., Radu, D.R., Sehgal, A., Chakravarti, D. & Fitzgerald, A. 2001 Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: A humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell*, 105: 877-889.
- Menaker, M., L. F. Moreira, et al. (1997). "Evolution of circadian organization in vertebrates." *Braz J Med Biol Res* 30(3): 305-13.
- Menaker, M. 2003 Circadian Photoreception. *Science*, 299 10:213-214.
- Moore, R.Y. & Klein, D.C. 1974 Visual pathways and the central neural control of rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain. Res.*, 71: 17-33.
- Moore-Ede MC, Sulzman FM, Fuller CA. 1982. Characteristics of a circadian clock. In: *The clocks that time us*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Moriya, T., Miyashita, Y., Arai, J., Kusunoki, S., Abe, M. & Asami, K. 1996 Light-sensitive response in melanophores of *Xenopus laevis*: I. Spectral characteristics of melanophore response in isolated tail fin of *Xenopus* tadpole. *J. Exp. Zool.*, 276: 11-18.
- Moser M, Penter R, Fruehwirth M, Kenner T. Why life oscillates – from a topographical towards a functional chronobiology. *Cancer Causes Control* (2006) 17:591–599.
- Murakami, N., H. Nakamura, *et al.* Comparison of circadian oscillation of melatonin release in pineal cells of house sparrow, pigeon and Japanese
-

[Digite texto]

- quail, using cell perfusion systems. *Brain Res*, v.651, n.1-2, 1994 Jul, p.209-14. 1994.
- Nakahara, K., N. Murakami, *et al.* Individual pineal cells in chick possess photoreceptive, circadian clock and melatonin-synthesizing capacities in vitro. *Brain Res*, v.774, n.1-2, 1997 Nov, p.242-5. 1997.
- Nayak SK, Jegla T, Panda S. Role of a novel photopigment, melanopsin, in behavioral adaptation to light. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Jan;64(2):144-54.
- Nery, L.E. & Castrucci, A.M.L. 1997 Pigment cell signalling for physiological color change. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 118: 1135-44.
- Nöel, P.Y.: Chromatophores Direct Photoreactivity. *Pigment Cell 1985 – Biological, Molecular and Clinical Aspects of Pigmentation*, pag. 219-227, 1985.
- Oliveira, A. L., Visconti, M. A., Castrucci, A. M. L. Cellular signaling in vertebrate pigment cell. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 1743 - 1749, 1996.
- Okamura, H., Yamaguchi, S. & Yagita, K. 2002 Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res.*, 309: 47-56.
- Oliver, J. & Bayle, J.D. 1982 Brain photoreceptors for the photo-induced testicular response in birds. *Experientia*, 38: 1021-1029.
- Oshima N, Goto M. Prolactin signalling in erythrophores and xanthophores of teleost fishes. *Pigment Cell Res* 2000;15:35–40.
- Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I. & Kay, S.A. 2002 Melanopsin (Opn 4) is required for circadian phase shifting under low light conditions. *Science*, 298:2213-2216.
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D.C., Pires, S.S., Rollag, M.D., Castrucci, A.M.L., Pletcher, M.T., Sato, T.K., Wiltshire, T., Andahazy, M., Kay, S.A., Van Gelder, R.N. & Hogenesch, J.B. 2003 Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, 301: 525-527.
- Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 2006 Jul;273(13):2813-38.
- Peng Y, Stoleru D, Levine JD, Hall JC, Rosbash M. *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. *PLoS Biol*. 2003 Oct;1(1):E13. Epub 2003.

[Digite texto]

- Pittendrigh, C. S. (1960). "Circadian rhythms and the circadian organization of living systems." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 25: 159-84.
- Poirel, J.V., Masson-Pévet, M., Pévet, P & Gauer, F. 2002 MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Research*, 946: 64-71.
- Poirel, V.J., Boggio, V., Dardent, H., Pévet, P., Masson-Pévet, M., & Gauer, F. 2003 Contrary to other non-photic cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience*, 120: 745-755.
- Pontes, G.N., Cardoso, E.C., Carneiro-Sampaio, M.M.S., Ferreira, Z.S. & Markus, R.P. (2005). Avaliação da ritmicidade de secreção de melatonina em colostro de mães, clinicamente sadias e com mastite. *Anais da XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE, Águas de Lindóia, São Paulo*, pp. 78.
- Preitner, N., Damiola, F., Luiz Lopez, M., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U. & Schibler, U. 2002 The orphan nuclear receptor Rev-Erb alpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110: 251-260.
- Provencio, I., Jiang, G., deGrip, W.J., Hayes, W.P. & Rollag, M.D. 1998 Melanopsin: an opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 340-345.
- Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, E.F. & Rollag, M.D. 2000 A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.*, 20: 600-605.
- Provencio, I., Rollag, M.D. & Castrucci, A.M.L. 2002 Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature*, 415: 493.
- Radha, E. and F. Halberg (1987). "Rhythms of isolated platelet glutathione, aging, and the internal evolution of species." *Prog Clin Biol Res* 227A: 173-80.
- Ramanzini GC. Modulação da migração pigmentar em melanóforos de *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae) por endotelinas. São Paulo, SP: Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo; 2001.

[Digite texto]

- Reiter, R. J., Calvo, J.R., Karbownik, M., Qi, W. & Tan, D.X.. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 917: 376-386, 2000.
- Reppert, S.M.; Weaver, D.R.; & Ebisawa, T.: Cloning and expression of mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13:1177-1185, 1994.
- Reppert, S.M.; Godson, C.G.; Mahle, C.D.; Weaver, D.R.; Slaugenhaupt S.A.; & Gusella, J.F.: Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel_{1b} melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci* 92:8734-8738, 1995a.
- Reppert, S.M.; Weaver, D.R.; Cassone, V.M.; Godson, C.; & Kolakowski Jr., L.F.: Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* 15:1003-1015, 1995b.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver (2002). "Coordination of circadian timing in mammals." *Nature* 418(6901): 935-41.
- Richter HG, Torres-Farfán C, Rojas-García PP, Campino C, Torrealba F, Serón-Ferré M. The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. *Biol Res.* 2004;37(1):11-28.
- Rollag, M.D. 1993 Pertussis toxin sensitive photoaggregation of pigment in isolated *Xenopus* tail-fin melanophores. *Photochem. Photobiol.*, 57: 862-866.
- Rollag MD, Lynch GR. Melatonin-induced desensitization in amphibian melanophores. *J Exp Zool.* 1993 Apr 1;265(5):488-95.
- Rollag, M.D. 1996 Amphibian melanophores become photosensitive when treated with retinal. *J. Exp. Zool.*, 275: 20-26.
- Rollag, M. D., I. Provencio, et al. (2000). "Cultured amphibian melanophores: a model system to study melanopsin photobiology." *Methods Enzymol* 316: 291-309.
- Rollag, M.D.; Berson, D.M.; Provencio, I.: Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J. Biol. Rhythms*, 18(3):227-234, 2003.
- Roseboom, P.H., Coon, S.L., Baler, R., Mccune, S.K., Weller, J.L. & Klein, D.C. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150- fold nocturnal increase
-

[Digite texto]

- in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology*, 137: 3033-3045, 1996.
- Sangoram, A.M., Saez, L., Antoch, M.P, 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.
- Schibler, U., J. A. Ripperger, et al. (2001). "Circadian rhythms. Chronobiology--reducing time." *Science* 293(5529): 437-8.
- Schibler, U. and P. Sassone-Corsi (2002). "A web of circadian pacemakers." *Cell* 111(7): 919-22.
- Schomerus, C., Korf, H.W., Laedtke, E., Weller, J.L. & Klein, D.C. Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteosomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J. Neurochem.*, 75(5): 2123-2132, 2000.
- Schopf J.W. 1994 Disparate rates, differing fates: tempo and mode of evolution changed from the Precambrian to the Phanerozoic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 19;91(15):6735-42.
- Schopf J.W. 2000 Solution to Darwin's dilemma: discovery of the missing Precambrian record of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 20;97(13):6947-53.
- Schopf J.W. 2006 Fossil evidence of Archaean life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Jun 29;361(1470):869-85.
- Seldenrijk, R.; Hup, D.R.W.; DeGraan, P.N.E. & Van der Veerdonk, F.C.G 1979 Morphological and physiological aspects of melanophores in primary culture from tadpoles of *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res*. 198: 397-409.
- Sherbrooke, W.C., Hadley, M.E. & Castrucci, A.M.L. 1988 Melanotropic peptides and receptors: an evolutionary perspective in vertebrates. In: *The Melanotropic Peptides*, vol. II, ed. M.E. Hadley, pp 175-190, CRC Press, Washington DC.
- Sherbrooke, W.C. & Hadley, M.E. 1988 Exploring the evolutionary history of melanin-concentrating hormone and melanin-stimulating hormone receptors on melanophores: neopterygian (holostean) and chondrosteian fishes. *Pigment Cell Res.*, 1: 344-349.

[Digite texto]

- Shiu, S.T.W.; & Pang, S.F.: An update phylogenetic analysis of vertebrate melatonin receptor sequences: reflection on the melatonin receptor nomenclature by the Nomenclature Subcommittee of the International Union of Pharmacology. *Biol Signals Recept* 7: 244-248, 1998.
- Simonneaux, V. & Ribelayga, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev.*, 55: 325-395, 2003.
- Slominski, A. & Pawelek, J. 1998 Animals under the sun: effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. *Clin. Dermatol.*, 16: 503–515.
- Spudich, J. L. (2000). "Structural biology. A chloride pump at atomic resolution." *Science* 288(5470): 1358-9.
- Spudich, J. L. (2006). "The multitasking microbial sensory rhodopsins." *Trends Microbiol* 14(11): 480-7.
- Su, C.-Y., Luo, D.-G., Terakita, A., Shichida, Y., Liao, H.-W., Kazmi, M.A., Sakmar, T.P. & Yau, K.-W. 2006 Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. *Science*, 311: 1617-1621.
- Sugden, D., Davidson, K., Hough KA, and The, M-T. Melatonin, Melatonin Receptors and Melanophores: A Moving Story. *PIGMENT CELL RES* 17: 454–460. 2004.
- Sumpter J.P., Denning-Kendall P.A. & Lowry P.J. 1984 The involvement of melanotrophins in physiological colour change in the dogfish *Scylliorhinus canicula*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56(3): 360-367.
- Suzuki, I., Cone, R.D., Im, S., Nordlund, J., Abdel-Malek, Z.A. 1996 Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology*, 137: 1627–1633.
- Tan, d.x.; Manchester, LC.; Reiter,RJ; Gi, WB.; Zhang,M, Weintraub, ST; Cabrera, J; Sainz, RM & Mayo, JC. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1472: 206-214, 1999.
- Tauber E., Last K.S., Olive P.J., Kyriacou C.P. 2004 Clock gene evolution and functional divergence. *J Biol Rhythms*. Oct;19(5):445-58.

[Digite texto]

- Takahashi, J.S. 1995 Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Rev. Neurosc.* 18: 531-553.
- Terakita , A., Koyanagi, M., Tsukamoto, H., Yamashita, T., Miyata, T. & Shichida, Y. 2004 Counterion displacement in the molecular evolution of the rhodopsin family. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11: 284-289.
- Terakita, A. (2005). "The opsins." *Genome Biol* 6(3): 213.
- Thody,A.J., Hunt, G., Donatien, P.D. & Todd, C. 1993 Human melanocytes express functional melanocyte-stimulating hormone receptors. *Ann. NY Acad. Sci.*, 680: 381–390.
- Thody, A. J. and A. Graham (1998). "Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans?" *Pigment Cell Res* 11(5): 265-74.
- Torres-Farfan, C., Serón-Ferre, M., Dinet, V. & Korf, H.-W. 2006 Immunocytochemical demonstration of day/night changes of clock gene protein levels in the murine adrenal gland: Differences between melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *J. Pineal Res.*, 40: 64-70.
- Tosini, g. & Fukuhara, c.. Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. *J neuroendocrinol.*, 15: 364-369, 2003.
- Tsatmali, M., Ancans, J. & Thody, A.J. 2002 Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J. Histochem. Cytochem.*, 50(2): 125–133.
- Tu DC, Owens LA, Anderson L, Golczak M, Doyle SE, McCall M, Menaker M, Palczewski K, Van Gelder RN. Inner retinal photoreception independent of the visual retinoid cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 5;103(27):10426-31. Epub 2006.
- Underwood, H., R. Barrett, *et al.* Melatonin does not link the eyes to the rest of the circadian system in quail: a neural pathway is involved. *J Biol Rhythms*, v.5, n.4, p.349-61. 1990.
- Vanselow K, Vanselow JT, Westermarck PO, et al. 2006. Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes Dev* 20:2660–2672.
- Vaudry,H., Chartrel, N., Desrues, L., Galas, L., Kikuyama, S., Mor, A., Nicolas, P. & Tonon, M.C. 1999 The pituitary-skin connection in amphibians. Reciprocal regulation of melanotrope cells and dermal melanocytes. *Ann. NY Acad. Sci.*, 885: 41-56.
-

[Digite texto]

- Visconti, M. A., Ramanzini, G.C., Camargo, C.R. & Castrucci, A.M.L. 1999 Elasmobranch color change: a short review and novel data on hormone regulation. *J. Exp. Zool.*, 284(5): 485-491.
- Vought, B. W., E. Salcedo, et al. (2000). "Characterization of the primary photointermediates of *Drosophila* rhodopsin." *Biochemistry* 39(46): 14128-37.
- Weaver, D.R.; Liu, C.; & Reppert, S.M.: Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* 10(11):1478-87, 1996.
- Wainwright, S. e L. Wainwright. Regulation of the diurnal cycle in activity of serotonin acetyltransferase in the chick pineal gland. *Can J Biochem*, v.56, n.7, 1978 Jul, p.685-90. 1978.
- Whitmore, D., Foulkes, N.S. & Sassone-corsi, P. 2000 Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature*, 404: 87-91.
- Wilsbacher, L. D., S. Yamazaki, et al. (2002). "Photic and circadian expression of luciferase in mPeriod1-luc transgenic mice *in vivo*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(1): 489-94.
- Yamaguchi, S., Mitsui, S., Miyake, S., Yan, L., Onishi, H., Yagita, K., Suzuki, M., Shibata, S., Kobayashi, M. & Okamura, H. 2000 The 5'-upstream region of mPer1 gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. *Curr. Biol.*, 10: 873-876.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M. & Tei, H. 2000 Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288: 682-685.
- Yamazaki, S., Alones, V. & Menaker, M. 2002 Interaction of the retina with suprachiasmatic pacemakers in the control of circadian behavior. *J Biol Rhythms* 17:315-329.
- Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepk, S.M., Hong, H.-K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M. & Takahashi, J.S. 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.

[Digite texto]

Yoshikawa T, Yamazaki S, Menaker M. Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. J Biol Rhythms. 2005 Dec;20(6):500-12.

Young, M.W. & Kay, S.A. 2001 Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. Nat. Rev. Genet., 2: 521-526.

Zatz, M., Mullen, D.A. & Moskal, J.R. 1988 Photoendocrine transduction in cultured chick pineal cells: Effects of light, dark, and potassium on the melatonin rhythm. Brain Res., 438: 199-215.

Zehring WA, Wheeler DA, Reddy P, Konopka RJ, Kyriacou CP, et al. P-element transformation with *period* locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. Cell 39:369–76, 1984.