

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

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*, sugerem que esta linhagem celular possui características de relógio periférico.

ABSTRACT

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 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

A fotoadaptação em mamíferos consiste em três tipos de predominantes: (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. De alguma forma intrigante, as respostas adaptativas permanecem intactas ou são apenas parcialmente atenuadas em humanos e em diversos modelos animais que sofrem perda completa da função de receptores cones e bastonetes (Czeisler *et al*, 1995). Contudo, a enucleação bilateral experimental em animais elimina todas as respostas oculares à luz, o que sugere a participação de uma nova classe de fotorreceptores oculares que não os cones e bastonetes classicamente conhecidos (Yamazaki *et al*, 1999).

Até recentemente, estes fotorreceptores permaneceram incompreendidos, porém 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 novo fotopigmento 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).

+

Ritmos Biológicos

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 depois do 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 (Fig. 1). Contudo, quando um organismo é isolado de seu ambiente (portanto na ausência de luz, alimento, temperatura e sons), a maioria destes ritmos persiste por um período independente denominado “*livre-curso*”, que geralmente é próximo, mas não exatamente, de 24 horas. (Moore-Ede *et al.*, 1982)



Fig. 1. Como resultado do movimento de translação da terra e da inclinação do seu eixo ao plano da sua órbita, a duração dos dias e das noites varia ao longo do ano, exceto no equador onde os dias são sempre iguais às noites. Apenas nos equinócios é que os dias são iguais às noites em todos os lugares do globo (Extraído de: <http://www.numaboa.com.br/relogios/astronomia/estacoes.php>).

Estes ritmos podem ser exógenos ou endógenos. Ritmos exógenos são atribuídos a fatores puramente externos, enquanto os ritmos endógenos são expressos mesmo quando mantidos em condições ambientais constantes, apresentando um componente intrínseco do animal, conhecido como “relógio biológico” ou “temporizador interno”. 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 alterações 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 (ou condições) imposta(s) pelo ambiente. A harmonização entre ritmicidade biológica e ciclos ambientais é que define adaptação temporal. Assim, se o ambiente oscila, em uma dada espécie devem existir indivíduos nas populações capazes de responder a essas oscilações, e se essa resposta for adaptativa, esses indivíduos serão selecionados. 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 ritmos, permitindo respostas rápidas a estímulos ambientais. Esse ajuste fino é dado pelo mascaramento do ritmo (Marques *et al.*, 1999).

Classificação dos Ritmos

A Cronobiologia identifica diversos e diferentes tipos de ritmos (Tab. 1), em cada célula viva, nos mais diferentes tipos de 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).

Tabela 1. Tipos de ritmo e sua duração.

Tipo de ritmo	Duração
Ultradiano	< 20h
Circadiano	20 – 28 h
Infradiano	> 28 h
✓ circasseptano	≅ 7 dias
✓ circadisseptano	≅ 14 dias
✓ circavigintano	≅ 21 dias
✓ circatrigintano	≅ 30 dias
✓ circannual	≅ 365 dias

Os ritmos circadianos (*circa* = cerca; *diem* = dia), cujo período varia de 20 a 28 horas (de acordo com a espécie) e o circannual (cerca de 365 dias), interagem com o nosso ambiente, enquanto alguns correm por sua própria conta, porém geralmente interagindo com o ritmo 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 de neurônios). 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 (Fig.2) 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 (*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).

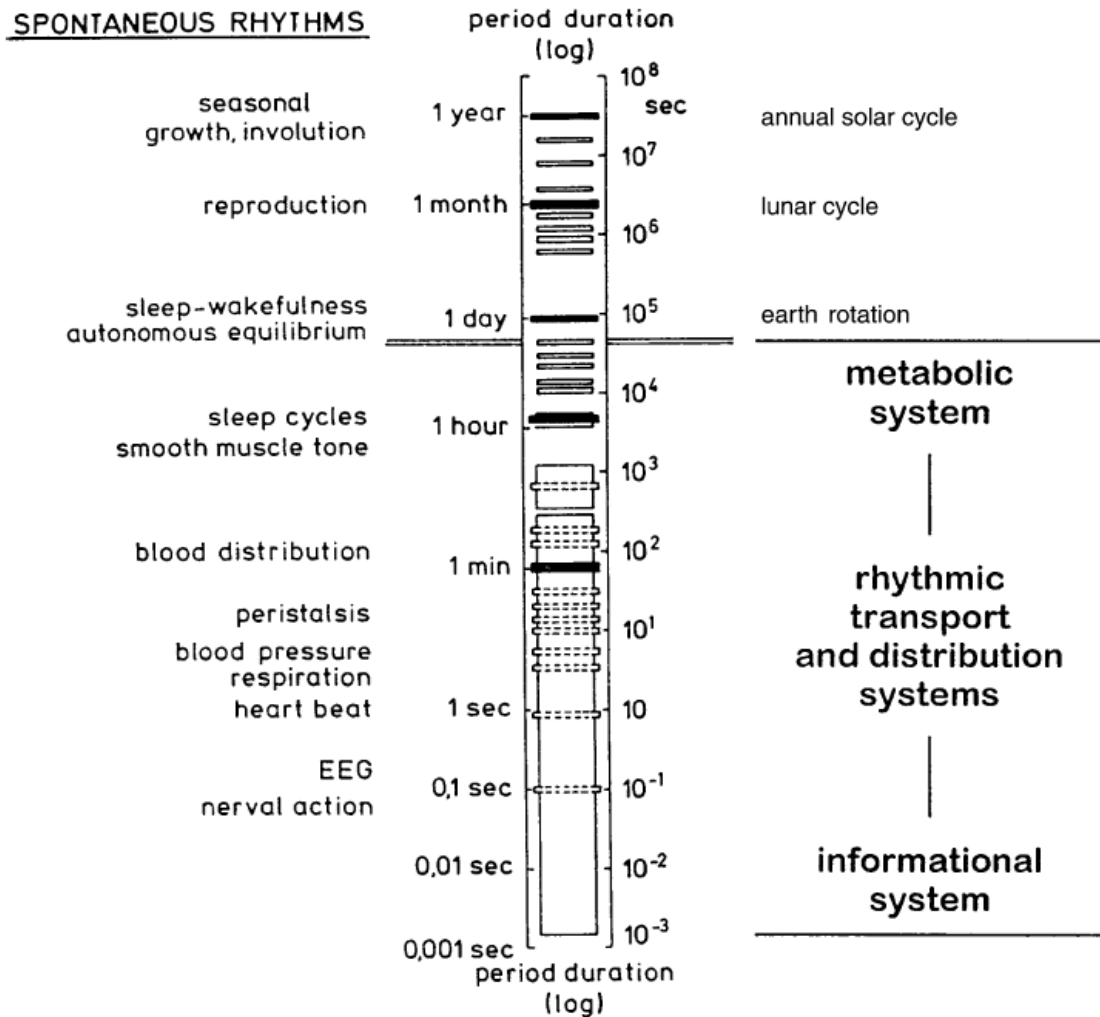


Fig. 2. Espectro dos ritmos biológicos identificados no organismo humano (Fonte: Moser *et al*, 2006).

Ritmos Circadianos

Os ritmos circadianos são características marcantes encontradas nos seres vivos, pois representam manifestações evidentes de adaptação. 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 necessidade imposta pela condição ambiental. Estes ritmos conferem vantagens significativas para os organismos, porque permitem a estes sincronizar eventos internos de acordo com os ciclos ambientais. A harmonização entre ritmicidade biológica e ciclos ambientais é o fator determinante para que haja adaptação temporal. Assim, se o ambiente oscila, em uma dada espécie devem existir indivíduos nas populações capazes de responder a essas oscilações, e se essa resposta for adaptativa, esses indivíduos serão selecionados (Aschoff, 1960; Pittendrigh, 1960; Moore-Ede *et al.*, 1982; Marques *et al.*, 1999).

Uma das vantagens da existência de ritmos endógenos é o fato dos mesmos possuírem mecanismos capazes de fazer com que funções fisiológicas que não podem ocorrer simultaneamente, como sístole e diástole, inspiração e expiração, sono e vigília, dentre outras, possam ocorrer em uma mesma unidade de espaço. 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 (Moser *et al.*, 2006; Seron-Ferre *et al.*, 2007). 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 (Marques *et al.*, 1999; Moser *et al.*, 2006).

Entende-se por organização circadiana o modo como o sistema circadiano inteiro 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 primitivos. Essas estruturas são as retinas, o complexo pineal (pineal e o órgão/olho parietal), e o núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo (Menaker *et al.*, 1997).

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* (traduzido do alemão literalmente como “doadores de tempo”), sendo que o *Zeitgeber* mais evidente é o ciclo claro/escuro. Este ciclo é importante para todas as espécies que possuem algum tipo de pigmento fotossensível. Para algumas espécies, o escuro constante, ou para outras, altas intensidades luminosas podem modificar, ou mesmo suprimir, a expressão da ritmicidade biológica. Para uma melhor adaptação ao meio é necessária, ainda, plasticidade nos ritmos, permitindo respostas rápidas a estímulos ambientais (Moore-Ede *et al.*, 1982; Marques *et al.*, 1999).

Pigmentos visuais

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 (colorida), pois apresentam sensibilidade para diferentes espectros luminosos, azul, verde e vermelho (Lucas, Freedman *et al.*, 1999; Terakita, 2005). Cada cone possui um desses pigmentos (Fig. 3), 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.

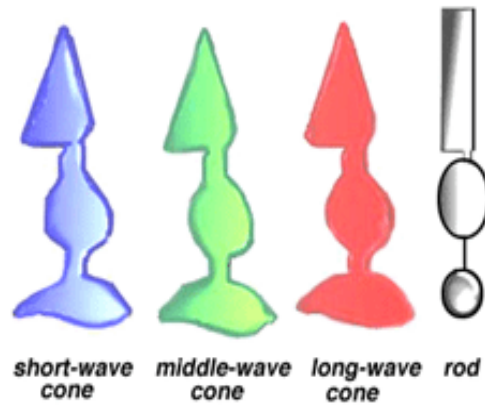


Fig. 3. Receptores cones e bastonete (Fonte: www.webvision.med.utah.edu/)

Na figura 4 são exibidos os comprimentos de onda dos três tipos de cones (vermelho, verde e azul). O pico de absorção do pigmento sensível ao azul é de 445 nm, para o sensível ao verde, 535 nm e para o sensível ao vermelho, 570 nm.

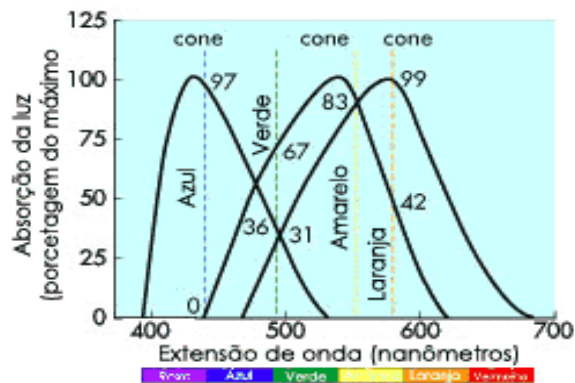


Fig. 4. Comprimento de onda dos 3 tipos de receptores cone (Fonte:

www.webvision.med.utah.edu/)

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, ambas utilizam uma molécula associada de retinaldeído para a captação da luz, e em ambas o retinaldeído associa-se à proteína, por meio de uma ligação do tipo *Base de Schiff* a um resíduo lisina, na sétima alça transmembrânica da proteína (Terakita, 2005). Ambas ativam diferentes cascatas de sinalização.

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, justamente pela análise de organismos de diferentes biomas. Opsinas tipo 2 são encontradas somente em eucariotos (Spudich, 2006; Fernald, 2006; Mccarren & Delong, 2007).

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, o que 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.

Antigamente os fotorreceptores eram classificados como fotorreceptores de vertebrados (ciliares) e fotorreceptores de invertebrados (rabdoméricos). Essa classificação era baseada 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 rabdoméricos foram encontrados em vertebrados, assim como fotorreceptores ciliares foram encontrados em invertebrados (Provencio *et al.*, 1998; Arendt *et al.*, 2004; Isoldi *et al.*, 2005).

Os fotorreceptores ciliares utilizam membros da família de opsinas ciliares incorporadas em cílios especializados, enquanto os fotorreceptores rabdoméricos utilizam membros da família de opsinas rabdoméricas que são

encontradas em rabdômeros. Cada tipo de receptor está associado a proteínas G diferentes em sua via de sinalização: A proteína G_t (transducina) é encontrada em fotorreceptores ciliares de vertebrados; a proteína G_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 fosfodiesterase. Já os fotorreceptores rabdômicos são despolarizantes e utilizam uma cascata que se inicia com a fosfolipase C. O sítio de amplificação dos sinais bioquímicos, assim como o mecanismo que finaliza a resposta fisiológica é diferente nesses dois tipos de opsinas, além do fato do cromóforo das opsinas rabdômicas nunca se separar da proteína, sendo regenerado *in situ* por um comprimento diverso do comprimento de onda responsável pelo estímulo da opsina, enquanto, nas opsinas ciliares o cromóforo é regenerado em tecidos exógenos (Gärtner & Towner, 1995; Vought *et al.*, 2000).

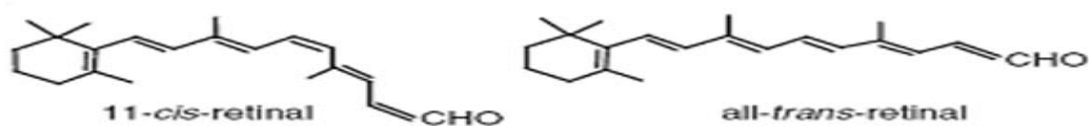


Fig. 5. 11-cis-retinal e all-trans-retinal (Fonte: Terakita, 2005).

A rodopsina é uma opsina conjugada a um cromóforo retinal não protéico derivado da vitamina A, 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 fotorreceptores 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, alterando-a para *trans*-retinal (Fig.5). A primeira reação leva apenas alguns

trilionésimos de segundo, o que faz com que o composto seja instável. A rodopsina se quebra em diversos compostos intermediários (Fig.6), mas eventualmente (em menos de um segundo) forma metarodopsina II (rodopsina ativada). Este composto químico produz impulsos elétricos que são transmitidos ao [cérebro](#) e interpretados como [luz](#). A porção retinal do composto químico encontrado nos cones é a mesma, mas a escotopsina é substituída por fopsinas. Portanto, os pigmentos que respondem à cor são compostos de retinal e fopsinas.

Finalmente, a rodopsina precisa ser recomposta para que o processo possa voltar a ocorrer. A trans-retinal é convertida em 11-cis-retinal, que então é recombinada com a escotopsina para formar rodopsina, que está pronta para iniciar o processo quando for exposta à luz novamente.

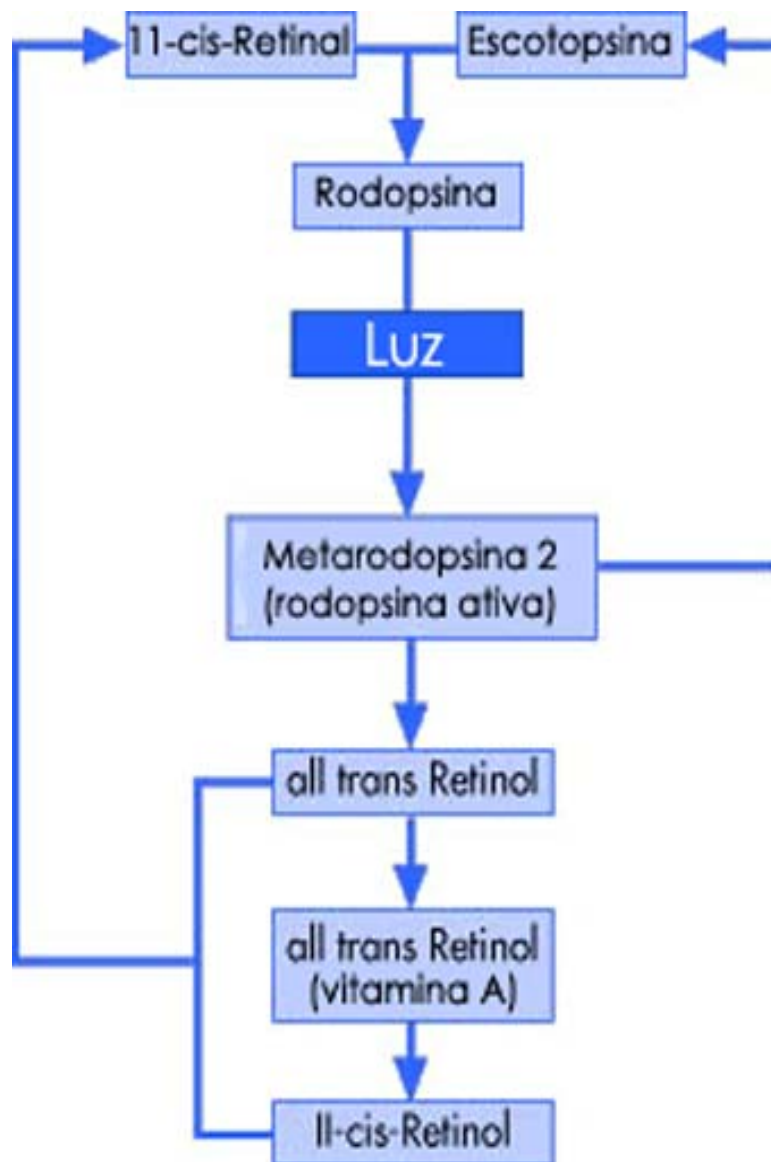


Fig. 6. Esquema de quebra da rodopsina (Fonte: www.webvision.med.utah.edu/)

Pesquisas buscando identificar qual, ou quais, o(s) fotorpigmento(s) envolvido(s) na percepção circadiana, mostraram 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.*, 2000; Panda *et al.*, 2002; Provencio *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2003; Rollag *et al.*, 2003; Chaurasia *et al.*, 2005; Isoldi *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2005).

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 visível era capaz de estimular 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 melanossomos 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 pigmentar, proveniente da pele deste anfíbio, pode ser mediada por mecanismos dependentes de AMPc, sugerindo que um único 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 por causa de sua origem (Provencio *et al.*, 1998) e, subseqüentemente, a melanopsina de *Xenopus laevis* também foi encontrada na retina e em um pequeno grupo de células ganglionares da retina intrinsecamente fotorreceptivas (ipRGCs) de mamíferos. Estas células projetam-se predominantemente para o NSQ e para o núcleo pré-tectal olivar (OPN) do cérebro, que é importante para a fotorrecepção circadiana e para reflexo da pupila à luz. Além disso, a melanopsina (correspondente ao gene *OPN4* do genoma humano) 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).

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). A *OPN4* foi clonada, e sua estrutura indica que é um membro da família das opsinas que, por sua vez, faz parte da superfamília de receptores acoplados à proteína G. 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 *shiff* 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. Essa estrutura molecular de invertebrados é bem demonstrada pelo resíduo aromático tirosina, no sítio onde retinaldeído estabiliza a base de *shiff*. A maioria das opsinas de vertebrados emprega um resíduo ácido neste sítio, geralmente glutamato. Um atributo importante das opsinas de invertebrados é que elas não são transferidas para tecidos exógenos para reisomerizar o retinaldeído usado. Ao invés disso o retinaldeído é fotoisomerizado dentro da própria molécula da opsina para a forma *cis*, sob comprimento diverso daquele ativador da transdução do sinal luminoso. Como a luz depende de fotorreceptores oculares para entrar no sistema circadiano dos mamíferos, o fato de que uma pequena população de células ganglionares contendo melanopsina, além do polipeptídeo ativador de adenilil ciclase da hipófise, ser intrinsecamente fotossensíveis, sugeriu que a melanopsina teria uma função crítica no sistema circadiano de mamíferos. De fato, utilizando camundongos *knock out* para melanopsina e *rdrd*, Panda e colaboradores (2002) demonstraram que as células ganglionares fotossensíveis são essenciais para o ajuste do relógio aos ciclos de claro/escuro e para respostas fóticas não visuais, como constricção pupilar e supressão de melatonina (Terakita, 2005).

Além de estar presente na retina, a melanopsina pode ser expressa em células pigmentares cutâneas, 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).

Organização do Sistema Circadiano

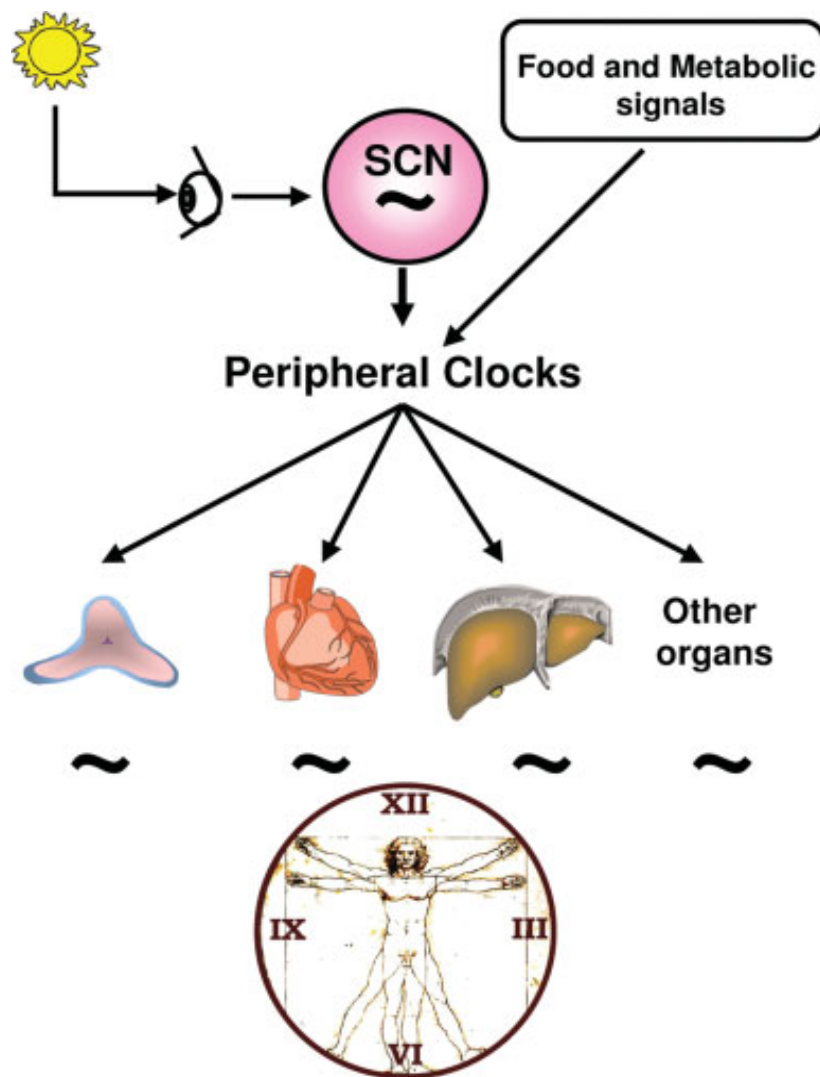
O sistema circadiano é organizado hierarquicamente por osciladores localizados em diversos tecidos, denominados *osciladores periféricos*, que, por sua vez, são sincronizados pelo gerador de ritmo central localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ). Estes osciladores (ou relógios) periféricos são modulados diretamente pelo NSQ através de um mecanismo neuro-hormonal, e por outros *Zeitgebers*, tais como temperatura corporal e alimentação, que governam a fisiologia e o metabolismo dos organismos e podem ser considerados como braços deste sistema de relógio (Seron-Ferre *et al.*, 2007).

O sistema visual dos vertebrados capta e processa a informação luminosa para gerar uma imagem do mundo (Cajochen *et al.*, 2006). Primariamente, a percepção da luz é responsável pela formação de imagem, e por diversos efeitos não visuais como a sincronização dos ritmos circadianos, supressão da síntese e secreção do hormônio melatonina, dentre outras funções (Besharse *et al.*, 2004).

Nos mamíferos, a fotorrecepção ocorre através da retina (Fig. 4), que contém células fotorreceptoras, cones e bastonetes, responsáveis pela conversão dos sinais luminosos em sinais elétricos. O núcleo supraquiasmático (NSQ) está conectado 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 NSQ através de sinais hormonais e neuronais, por sinais metabólicos e alimentação (Levi & Schibler, 2007; Seron-Ferre *et al*, 2007).

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).

Fig. 7. Ordem temporal interna dos ritmos circadianos (Fonte: Seron-Ferre *et al*, 2007).

Segundo Daniolos e colaboradores (1990), a resposta ao estímulo luminoso é resultado da interpretação da informação luminosa pelos diferentes tipos celulares, sendo que o principal sinal fornecido pelo ambiente para que os organismos ajustem seus ritmos é o ciclo claro/escuro. O avanço tecnológico, e estudos realizados em organismos até então pouco investigados, tem revelado que células fotorreceptoras ou estruturas responsáveis pela captação da informação luminosa ambiental são encontradas em todos os organismos, dos procariontes ao homem (Spudich *et al.*, 2000; Spudich, 2006).

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

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

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). Os relógios circadianos podem ser reajustados pelos *Zeitgebers*, fatores ambientais que modificam o padrão de expressão dos genes de relógio (Levi&Schibler, 2007; Seron-Ferret *et al*, 2007).

Evolução dos genes de relógio

Os primeiros estudos para a identificação dos genes importantes para a ritmicidade circadiana foram realizados em *Drosophila* e *Neurospora* e levaram posteriormente pesquisadores a procurarem pelos homólogos em vertebrados, notadamente mamíferos. Todos os genes de relógio descobertos em *Drosophila* encontram 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 3,5 milhões 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). Os fósseis mais antigos datam desta época e representam organismos que notavelmente sobreviveram, como a cianobactéria *Oscillatoria*, que aparentemente pouco se modificou ao longo destes

milhões de anos. 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).

Para estes organismos, a luz representava a possibilidade de alimento, fazendo com que fossem capazes de desenvolver um sentido que lhes indicasse que o horário de “alimentação” estava próximo. Há evidências de um grupo de genes ancestrais encontrados em vários tipos de cianobactérias, *kaiA*, *kaiB* e *kaiC*, que são capazes de gerar um programa circadiano transcricional, com uma série de alças negativa e positivamente auto-reguladas (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. 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 & 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 fotoliasas, que podem reparar os danos causados pelos raios UV. As fotoliasas 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 fotoliasas 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)

Os criptocromos não são as únicas proteínas que possuem uma história evolutiva de resposta aos danos causados pela irradiação UV. Membros da família das caseína-quinases possuem um papel importante na fosforilação das proteínas chave de relógios presentes em plantas, fungos, moscas e mamíferos (Tauber *et al.*, 2004). Além disso, outros genes já foram identificados em organismos dos mais simples aos mais complexos, como *Period (Per)*, *Timeless (Tim)*, *Clock* e *Bmal*.

Estrutura Funcional dos Relógios Biológicos Circadianos

Para que o sistema circadiano funcione de forma adequada, há a necessidade de um marca-passo ou relógio, que, por sua vez, precisa de um sistema de entrada e saída que forneça um sinal de forma rítmica. O marca-passo, junto com os sistemas de entrada e saída, constitui o sistema circadiano, que aparenta ser semelhante em todos os organismos. Os organismos vivos são capazes de gerar oscilações periódicas das mais

diversas variedades fisiológicas, pois a evolução selecionou a frequência de certas oscilações nos sistemas biológicos. O sistema fisiológico responsável pela medição e sincronização dos processos internos dos organismos em relação aos eventos diários ambientais é conhecido como sistema de temporizador circadiano, e todas as espécies, desde insetos até mamíferos, o possuem (Moore-Ede *et al.*, 1982; Collin *et al.*, 1989; Takahashi, 1995).

Os relógios são esses osciladores biológicos que medem o tempo e regulam a organização temporal dos organismos. As propriedades que distinguem estes relógios, e que representam requisito para a geração dos ritmos circadianos, incluem osciladores endógenos, ajustes por estímulos externos, como o ciclo claro/escuro e interações sociais, e a produção de um sinal eferente que alcance o organismo como um todo, ajustando o tempo para todos os osciladores no corpo. O relógio e os sistemas de entrada e saída de sinais constituem o sistema circadiano, que aparenta ser semelhante em todos os organismos (Collin *et al.*, 1989; Takahashi, 1995; Guido *et al.*, 2002)..

As flutuações diárias e sazonais da intensidade da luz e da temperatura ambiente são fatores que sincronizam os relógios biológicos internos, responsáveis pelo programa temporal interno, e que estão codificados no DNA (Hall & Rosbash, 1987; 1988; Tauber *et al.*, 2004). Estes genes têm que satisfazer alguns critérios, a saber: a ausência de proteína de relógio deve levar à arritmicidade, a sua síntese deve apresentar ritmo circadiano, a fase do ritmo deve ser suscetível ao arrastamento por *Zeitgebers* e a manipulação dos níveis protéicos deve mudar a fase do ritmo (Lopes *et al.*, 2003). Os componentes centrais de um relógio são as proteínas, essenciais para a geração e regulação dos ritmos circadianos no interior de células individuais (Takahashi, 2004). Em mamíferos, a luz ativa as vias de sinalização no encéfalo, onde se localiza o marca passo central circadiano, o núcleo supraquiasmático (NSQ), que coordena a organização

temporal diária de vários processos fisiológicos e comportamentais (Besharse *et al.*, 2004). Os olhos, o núcleo supraquiasmático e a glândula pineal são componentes centrais do sistema circadiano em vertebrados (Collin *et al.*, 1989; Takahashi, 1995).

Hoje já se sabe que os vertebrados possuem vários relógios distribuídos pelo corpo, os chamados “relógios periféricos”. Mesmo assim, as funções destes “relógios periféricos” ainda não estão bem esclarecidas (Green e Besharse, 2004).

Em contraste com o conhecimento a respeito do NSQ, os relógios periféricos foram menos investigados, mas já se sabe que ocorrem de peixes a mamíferos. Está bem estabelecido hoje que há 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).

Em nível celular, os ritmos circadianos são regidos por uma interação auto-regulatória, engatada por uma série de genes como *Bmal1* (também conhecido como *Mop3*), *Per 1-2*, *Cry 1-2* e *clock*, denominados “genes de relógio” e seus produtos

protéicos (Fig. HHHH). O braço positivo deste circuito é o heterodímero formado pelas proteínas CLOCK:BMAL1. Este complexo liga-se a elementos E-box da região promotora dos genes *Per* 1-2 e *Cry* 1-2, induzindo a sua transcrição. Os reguladores negativos são as proteínas transcritas *CRY* e *PER*, que formam um complexo com a caseína quinase E ($CK\epsilon$), sendo translocados para o núcleo, onde interagem com o complexo CLOCK:BMAL1, inibindo sua própria transcrição. A fosforilação das proteínas *PER* e *CRY* pela $CK\epsilon$ desencadeia a formação do complexo *CRY:PER*, determinando a extensão do ciclo (Lowrey *et al*, 2000; Lee *et al*, 2001; Vanselow *et al*, 2006; Seron-Ferre *et al*, 2007).

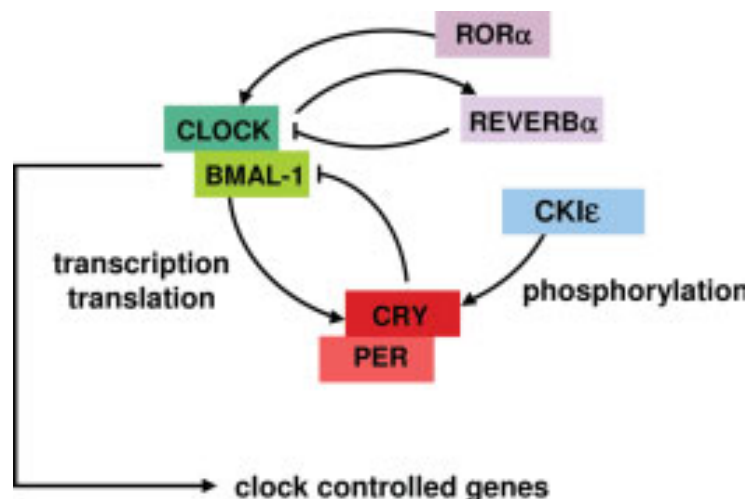


Fig. 8. Representação esquemática dos componentes do relógio biológico (Fonte: Seron-Ferre *et al*, 2007).

O heterodímero CLOCK:BMAL1 também induz a transcrição dos genes *Rev-erbα* e *Rora*, que interagem com os elementos *Rev-erb/Ror* (RREs) no promotor de

Bmal1 (Fig. N), reprimindo e direcionando a sua transcrição, respectivamente. Existem, ainda, outros reguladores protéicos negativos que 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 no NSQ, 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; Grechez-Cassiau *et al*, 2004; Green e Besharse, 2004; Hirota e Fukada, 2004; Seron-Ferre *et al*, 2007).

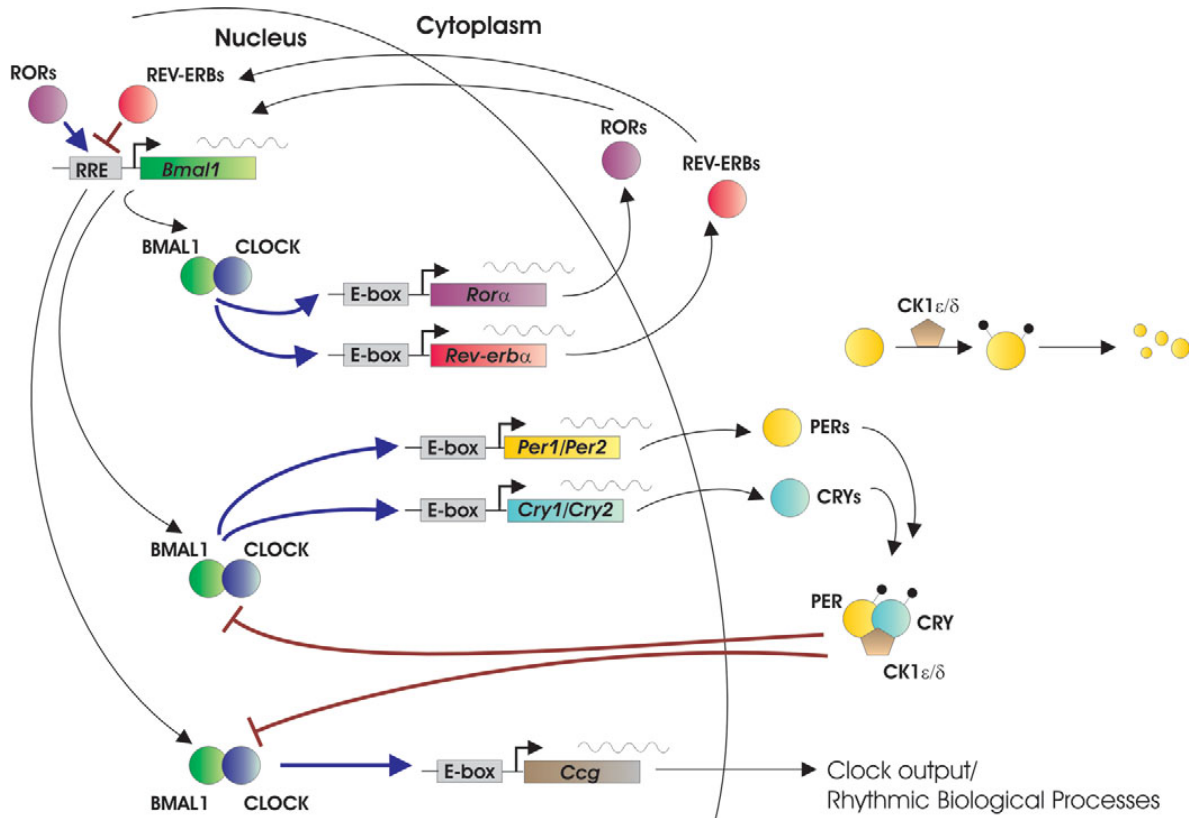


Fig. 9. Esquema dos mecanismos de retroalimentação positiva e negativa do relógio circadiano. Extraído de Ko & Takahashi, 2006.

Em geral, um típico ciclo circadiano tem início nas primeiras horas da manhã com a ativação da transcrição de *Per* e *Cry* por CLOCK/BMAL1. Os níveis de transcrição atingem seu ápice por volta de meio-dia e os níveis de proteína no citoplasma atingem o seu apogeu cerca de duas horas depois. Após sofrer hiperfosforilação pela ação da caseína quinase ϵ ($Ck\epsilon$), a estabilidade de PER diminui. Ocorre, então, a sua degradação no citoplasma, enquanto que, contrapondo-se a esta degradação, a proteína CRY liga-se à PER no núcleo, impedindo sua saída. Desta forma, ocorrerá o bloqueio de CLOCK/BMAL1, resultando no fim da

transcrição de *Per* e *Cry*. Em algum ponto, quando muita proteína PER é degradada no citoplasma, a concentração de PER no núcleo torna-se muito baixa para manter a retroalimentação negativa, levando ao início de um novo ciclo. Assim, a periodicidade do relógio circadiano resulta da combinação entre retroalimentação transcricional positiva e negativa, o vaivém constante de PER entre o núcleo e o citoplasma, e a fosforilação e degradação de PER (Albrecht e Eichele, 2003).

A organização do sistema temporal dos vertebrados resulta, portanto, de uma complexa interação entre fotorreceptores e osciladores. Os ciclos dia:noite são traduzidos em oscilações hormonais que coordenam a fisiologia e o metabolismo dos organismos vivos (Guido *et al.*, 2002). Recentemente, demonstrou-se que os genes de relógio, identificados no núcleo supraquiasmático, também são expressos na retina de todas as espécies examinadas até o momento, e em vários sistemas periféricos. Ainda, o papel da proteína CLOCK foi diretamente testado no mecanismo de relógio do anfíbio *Xenopus laevis* (Green e Besharse, 2004).

Melatonina

Diferentes estudos sobre a natureza do oscilador circadiano mostram que existe uma verdadeira sinergia funcional entre os núcleos supraquiasmáticos, 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 o próprio NSQ ou a hipófise, estão envolvidos na regulação circadiana, tanto quanto os genes de relógio (Moser *et al.*, 2006).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é a principal indolamina produzida pela pineal, sendo também chamada de sinalizador do escuro, que tem como função agir como uma espécie de cronômetro interno. Sua biossíntese e sua liberação são mais elevadas durante a noite do que durante o dia, seguindo um padrão bem preservado entre todos os vertebrados estudados até o momento. Este ritmo sincroniza uma variedade de ritmos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais, tais como ritmo locomotor, ciclos de dormir e acordar e temperatura corporal (Falcón, 1999). Por exemplo, o peixe teleósteo *Danio rerio* possui um ritmo locomotor predominantemente diurno quando mantido em ciclo claro/escuro e, quando mantido sob condições constantes (claro ou escuro), notou-se que a sua ritmicidade circadiana não foi modificada pela temperatura, mantida entre 18 e 28,5 °C (Cahill *et al.*, 1998; Hurd *et al.*, 1998).

A glândula pineal dos vertebrados contém fotorreceptores que permitem a sincronização de ciclos claro/escuro, com a produção e liberação noturna de melatonina que exerce sua ação específica através de GPCRs. Este hormônio atua na regulação de diversos processos fisiológicos e comportamentais, incluindo respostas circadianas e sazonais, algumas respostas retinianas, cardiovasculares e imunológicas. 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; Bartness &, 1991; Filadelfi & Castrucci, 1996; Prendergast *et al.*, 2002; Durgan *et al.*, 2004; Butler *et al.*, 2008).

A melatonina é uma molécula amplamente distribuída na natureza, cuja atividade funcional ocorre em organismos unicelulares, plantas, fungos e animais. Em muitos vertebrados, inclusive o homem, este hormônio é sintetizado pela glândula pineal e regulado pelo ciclo claro:escuro ambiental pelo NSQ. Pelo fato de sua liberação

ocorrer exclusivamente no período escuro do ciclo, ela é denominada “hormônio (ou mensageiro) do escuro”, e está envolvida, principalmente, na regulação do sono (Pandi-Perumal *et al.*, 2006).

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 (Cassone, 2003). 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; Berett & Takahashi, 1997; Murakami *et al.*, 1994; Nakahara *et al.*, 1997;).

Este hormônio também está relacionado à mudança de cor nos animais. Nota-se a influência da melatonina tanto sobre a mudança rápida (empalidecimento no escuro, em vertebrados ectotérmicos; Fujii, 2000), quanto à mudança de cor morfológica (por exemplo, a troca de pelagem sazonal em determinados mamíferos) (Weatherhead, 1988; Castrucci *et al.*, 1989). Vertebrados peilotérmicos podem exibir um ritmo circadiano de mudança de cor, com clareamento noturno relacionado com a secreção de melatonina (Binkley, 1988; Filadelfi & Castrucci, 1996).

Em melanócitos dérmicos de anfíbios, causa agregação dos melanosomos (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 *X. laevis*, observaram que 75 % das células mantidas em cultura por um longo período agregam seus melanosomos em resposta a melatonina. Desses 75%, todas dispersam seus melanosomos 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 & Oshima, 1986; Fujii, 1993; Filadelfi & Castrucci, 1996).

Os receptores para melatonina são receptores de membrana acoplados à proteína Gi (inibitória). Quando estimulados, levam à inibição da adenilil ciclase. Em 1988, 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 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).

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

Células pigmentares e o modelo biológico

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 medo, agressividade e reprodução (Bagnara & Hadley, 1973; 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; Fujii, 1993).

As alterações 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; 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; Fujita & Fujii, 1997; Camargo *et al*, 1999; Oshima & Gotto, 2000; Ramanzini, 2001; Filadelfi *et al*, 2004).

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 anfíbios, em particular os de *Xenopus laevis*, ocupam uma importância histórica especial na pesquisa sobre a melatonina, pois 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 (1960; 1992-1997), que fizeram uso da resposta de clareamento dérmico deste animal para monitorar o isolamento do princípio contido na glândula pineal, identificada como melatonina. Desde esta descoberta, muito se aprendeu a respeito das vias bioquímicas e dos complexos sinais neurais que regulam com precisão a ativação dos pinealócitos, gerando o ritmo característico de síntese e de liberação noturna de melatonina (Simonneaux & Ribelayga, 2003; Sugden *et al*, 2004).

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 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).

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICA*

Abe, M., E. D. Herzog, et al. (2002). "Circadian rhythms in isolated brain regions." J Neurosci **22**(1): 350-6.

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. and G. Eichele (2003). "The mammalian circadian clock." Curr Opin Genet Dev **13**(3): 271-7.

Arendt, J. and D. J. Skene (2005). "Melatonin as a chronobiotic." Sleep Med Rev **9**(1): 25-39.

Aschoff, J. (1960). "Exogenous and endogenous components in circadian rhythms." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **25**: 11-28.

Balsalobre, A., F. Damiola, et al. (1998). "A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells." Cell **93**(6): 929-37.

Barr, L. (1989). "Photomechanical coupling in the vertebrate sphincter pupillae." Crit Rev Neurobiol **4**(4): 325-66.

Bartell, P. A., M. Miranda-Anaya, et al. (2004). "Period and phase control in a multioscillatory circadian system (Iguana iguana)." J Biol Rhythms **19**(1): 47-57.

Berson, D. M., F. A. Dunn, et al. (2002). "Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock." Science **295**(5557): 1070-3.

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.

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.

Brainard, G. C., J. P. Hanifin, et al. (2001). "Human melatonin regulation is not mediated by the three cone photopic visual system." J Clin Endocrinol Metab **86**(1): 433-6.

Brown, S. A. and U. Schibler (2001). "Circadian rhythms: mop up the clock!" Curr Biol **11**(7): R268-70.

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.

Cahill, G. M., M. S. Grace, et al. (1991). "Rhythmic regulation of retinal melatonin: metabolic pathways, neurochemical mechanisms, and the ocular circadian clock." Cell Mol Neurobiol **11**(5): 529-60.

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.

Cajochen, C., M. Munch, et al. (2006). "Age-related changes in the circadian and homeostatic regulation of human sleep." Chronobiol Int **23**(1-2): 461-74.

Carr, A. J. and D. Whitmore (2005). "Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods." Nat Cell Biol **7**(3): 319-21.

Cashmore, A. R., J. A. Jarillo, et al. (1999). "Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals." Science **284**(5415): 760-5.

Chaurasia, S. S., M. D. Rollag, et al. (2005). "Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (Opn4): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types." J Neurochem **92**(1): 158-70.

Costa, A., O. Castanon-Cervantes, et al. (2005). "Daily rhythm of lactate dehydrogenase in rat (*Rattus norvegicus*) carrying a Per1-luciferase transgene: assessment on serum and liver." Vet Res Commun **29 Suppl 2**: 183-6.

Czeisler, C. A. (1995). "The effect of light on the human circadian pacemaker." Ciba Found Symp **183**: 254-90; discussion 290-302.

Daniolos, A., A. B. Lerner, et al. (1990). "Action of light on frog pigment cells in culture." Pigment Cell Res **3**(1): 38-43.

de Almeida-Paula, L. D., L. V. Costa-Lotufo, et al. (2005). "Melatonin modulates rat myotube-acetylcholine receptors by inhibiting calmodulin." Eur J Pharmacol **525**(1-3): 24-31.

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.

Fernald, R. D. (2006). "Casting a genetic light on the evolution of eyes." Science **313**(5795): 1914-8.

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, A. M. and A. M. Castrucci (1996). "Serotonin and N-acetylserotonin effects on pigment cells of the toad *Bufo ictericus*: pharmacological characterization of melatonin receptors." Gen Comp Endocrinol **103**(2): 192-9.

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

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

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

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

Hall, J. C. and M. Rosbash (1987). "Genetic and molecular analysis of biological rhythms." J Biol Rhythms **2**(3): 153-78.

Hall, J. C. and M. Rosbash (1988). "Mutations and molecules influencing biological rhythms." Annu Rev Neurosci **11**: 373-93.

Hattar, S., H. W. Liao, et al. (2002). "Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity." Science **295**(5557): 1065-70.

Hirota, T. and Y. Fukada (2004). "Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals." Zoolog Sci **21**(4): 359-68.

Isoldi, M. C., M. A. Visconti, et al. (2005). "Anti-cancer drugs: molecular mechanisms of action." Mini Rev Med Chem **5**(7): 685-95.

Isoldi, M. C., M. D. Rollag, et al. (2005). "Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(4): 1217-21.

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.

Levi, F. and U. Schibler (2007). "Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 593-628.

Marques, M. D. G., D. & Moreno, C. (1999). Adaptação Temporal São Paulo.

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.

Menaker, M. (2003). "Circadian rhythms. Circadian photoreception." Science **299**(5604): 213-4.

Menaker, M., L. F. Moreira, et al. (1997). "Evolution of circadian organization in vertebrates." Braz J Med Biol Res **30**(3): 305-13.

Moore-Ede, M. C. S., F. M.; Fuller, C. A. (1982). The clocks that time us., Harvard University Press.

Moser, M., M. Fruhwirth, et al. (2006). "Why life oscillates--from a topographical towards a functional chronobiology." Cancer Causes Control **17**(4): 591-9.

Nayak, S. K., T. Jegla, et al. (2007). "Role of a novel photopigment, melanopsin, in behavioral adaptation to light." Cell Mol Life Sci **64**(2): 144-54.

Oliver, J. and J. D. Bayle (1982). "Brain photoreceptors for the photo-induced testicular response in birds." Experientia **38**(9): 1021-9.

Panda, S., T. K. Sato, et al. (2002). "Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting." Science **298**(5601): 2213-6.

Pittendrigh, C. S. (1960). "Circadian rhythms and the circadian organization of living systems." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **25**: 159-84.

Provencio, I., G. Jiang, et al. (1998). "Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 340-5.

Provencio, I., I. R. Rodriguez, et al. (2000). "A novel human opsin in the inner retina." J Neurosci **20**(2): 600-5.

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.

Reppert, S. M. and D. R. Weaver (2002). "Coordination of circadian timing in mammals." Nature **418**(6901): 935-41.

Rollag, J. G. and D. S. Hage (1998). "Non-linear elution effects in split-peak chromatography. II. Role of ligand heterogeneity in solute binding to columns with adsorption-limited kinetics." J Chromatogr A **795**(2): 185-98.

Rollag, M. D. (1993). "Pertussis toxin sensitive photoaggregation of pigment in isolated *Xenopus* tail-fin melanophores." Photochem Photobiol **57**(5): 862-6.

Rollag, M. D. and G. R. Lynch (1993). "Melatonin-induced desensitization in amphibian melanophores." J Exp Zool **265**(5): 488-95.

Rollag, M. D., D. M. Berson, et al. (2003). "Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment." J Biol Rhythms **18**(3): 227-34.

Rollag, M. D., I. Provencio, et al. (2000). "Cultured amphibian melanophores: a model system to study melanopsin photobiology." Methods Enzymol **316**: 291-309.

Schibler, U. and P. Sassone-Corsi (2002). "A web of circadian pacemakers." Cell **111**(7): 919-22.

Schibler, U., J. A. Ripperger, et al. (2001). "Circadian rhythms. Chronobiology--reducing time." Science **293**(5529): 437-8.

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 **91**(15): 6735-42.

Seldenrijk, R., D. R. Hup, et al. (1979). "Morphological and physiological aspects of melanophores in primary culture from tadpoles of *Xenopus laevis*." Cell Tissue Res **198**(3): 397-409.

Seron-Ferre, M., G. J. Valenzuela, et al. (2007). "Circadian clocks during embryonic and fetal development." Birth Defects Res C Embryo Today **81**(3): 204-14.

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., D. G. Luo, et al. (2006). "Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications." Science **311**(5767): 1617-21.

Tauber, E., K. S. Last, et al. (2004). "Clock gene evolution and functional divergence." J Biol Rhythms **19**(5): 445-58.

Terakita, A. (2005). "The opsins." Genome Biol **6**(3): 213.

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.

Vought, B. W., E. Salcedo, et al. (2000). "Characterization of the primary photointermediates of Drosophila rhodopsin." Biochemistry **39**(46): 14128-37.

Whitmore, D. and P. Sassone-Corsi (1999). "Cryptic clues to clock function." Nature **398**(6728): 557-8.

Wilsbacher, L. D., S. Yamazaki, et al. (2002). "Photic and circadian expression of luciferase in mPeriod1-luc transgenic mice invivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 489-94.

Yamazaki, S., R. Numano, et al. (2000). "Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats." Science **288**(5466): 682-5.

Zatz, M., D. A. Mullen, et al. (1988). "Photoendocrine transduction in cultured chick pineal cells: effects of light, dark, and potassium on the melatonin rhythm." Brain Res **438**(1-2): 199-215.