

Jéssica Andrade da Silva

**RITMOS CIRCADIANOS EM RATOS  
GANGLIONECTOMIZADOS E  
PINEALECTOMIZADOS: UM ESTUDO MOLECULAR  
E COMPORTAMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão corrigida

São Paulo  
2017

## RESUMO

Silva JA. Ritmos circadianos em ratos ganglionectomizados e pinealectomizados: um estudo molecular e comportamental. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A melatonina (MEL), hormônio sintetizado pela glândula pineal apenas durante a noite, é um marcador circadiano interno. A sua produção depende de uma via neural temporizada pelos núcleos supraquiasmáticos (NSQs), que culmina na liberação rítmica noturna de noradrenalina na pineal, através de fibras simpáticas vindas do gânglio cervical superior (GCS). Sabendo que a pineal é essencialmente rítmica, foram estudados o oscilador molecular da glândula pineal de ratos após a remoção do GCS (GCSx) e seus efeitos nos osciladores moleculares do fígado e do NSQ. A GCSx alterou o oscilador molecular da pineal, além de reduzir e tornar arrítmica a via de síntese de MEL. O fígado, um oscilador periférico, manteve a robustez de seu oscilador, enquanto que o NSQ, oscilador central, teve sua expressão alterada, tanto no grupo GCSx, quanto após a remoção da pineal (PINX). O NSQ coordena os ritmos de atividade motora e temperatura, os quais exibiram alterações após a GCSx, sendo tais alterações ainda mais intensas após a PINX, com a redução da temperatura e aumento da atividade motora ao longo do tempo. Em conjunto, esses dados demonstram a complexidade do sistema circadiano e a importância da inervação simpática da pineal para direta ou indiretamente mantê-lo inalterado.

**Palavras-chave:** Melatonina. Glândula pineal. Ganglionectomia. Pinealectomia. Ritmos biológicos. Genes relógio. Temperatura. Circadiano. Diário.

## ABSTRACT

Silva JA. Circadian rhythms in ganglionectomized and pinealectomized rats: a molecular and behavioural study. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Melatonin (MEL), a hormone synthesized by the pineal gland on the dark phase, is an internal circadian marker. Its production relies on a neural pathway timed by suprachiasmatic nuclei (SCN), which ends with the rhythmic release of norepinephrine by sympathetic fibers from the superior cervical ganglia (SCG). Since the pineal gland is essentially a rhythmic structure, the aim of this study was to evaluate the molecular clock of pineal gland after the superior cervical ganglia ablation (SCGx) and its effects on liver and SCN molecular clocks. The SCGs modified the molecular clock of pineal gland and, in addition, the MEL synthesis pathway was decreased and became arrhythmic. Besides that, the molecular clock of liver maintained its robustness, while the SCN's, the master clock, was changed in SCGx and after pineal removal. The SCN coordinates the rhythms of motor activity and temperature. Those are changed after SCGx, although the removal of pineal gland had changed them more, decreasing the temperature and increasing motor activity over the time. Together, these data show the complexity of the circadian system and the relevance of pineal sympathetic innervation to, direct or indirectly, maintain it unaltered.

**Keywords:** Melatonin. Pineal Gland. Ganglionectomy. Pinealectomy. Biological Rhythms. Clock genes. Temperature. Circadian. Daily.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Os ritmos

Os ritmos biológicos estão presentes em todos os níveis de organização dos seres vivos, uma adaptação evolutiva que parece vir desde os primórdios.

Os ciclos geofísicos estão presentes na Terra desde a sua constituição. E por bilhões de anos, ao girar ao redor de seu próprio eixo, há na Terra um regime cíclico de seus parâmetros geofísicos, como luz, temperatura e regime de marés. A matéria viva surgiu nesse ambiente rítmico, que exercendo uma importante pressão seletiva, contribuiu para a organização temporal dos seres vivos como vemos hoje (1). Antecipar tais alterações cíclicas permitiu aos seres vivos otimizar sua fisiologia e seus comportamentos garantindo-lhes a sobrevivência através da seleção natural.

Essa ideia de antecipação temporal dos seres vivos, demorou a ser aceita pelos cientistas e estudiosos. O primeiro relato escrito sobre observações acerca de ritmos biológicos é antigo e data de 400 a.C., quando Andróstenes descreveu a abertura e fechamento cíclicos da folha do tamarindeiro (*Tamarindus indica*). E apesar de a história da cronobiologia não se dar de forma linear, por muitos séculos, o pensamento vigente era de que tal expressão de ritmicidade nos organismos se dava apenas em resposta às oscilações do meio ambiente.

O primeiro a se opor publicamente a essa ideia foi Jean Jacques d'Ortois de Mairan, um astrônomo francês do século XVIII. Ao ver o movimento que sua planta fazia ao longo do dia, questionou-se sobre os efeitos causados pela ausência do estímulo ambiental de variação de luz. Sendo assim, de Mairan colocou a *Mimosa pudica* em uma caixa preta, a qual deixou na escuridão de seu porão. Mesmo na ausência de estímulos ambientais ele observou que a planta continuava se movimentando, e surpreendentemente, a abertura das folhas continuava coincidindo com o dia, enquanto que o fechamento coincidia com a noite. Como se, de alguma maneira, a planta fosse capaz de prever o ciclo ambiental mesmo sem ser exposta a ele. Ao expor sua teoria na Academia Real de Ciências em Paris, foi duramente criticado. Outros cientistas seguiram-se a ele, tentando provar que o ritmo biológico é gerado endogenamente. Complementando seu trabalho, em 1832, Augustin Pyrame de Candolle, um botânico suíço concluiu que essa mesma planta, quando privada de estímulos externos, abriam as suas folhas de 1 a 2 horas (h) mais cedo a cada dia. Apesar de não ser completamente compreendido na época, isso demonstrou que as plantas possuem um período endógeno, que apesar de próximo, não é igual ao do claro-escuro ambiental que é de 24 h. Compartilhando desse pensamento,

Darwin também acreditava que a movimentação das folhas das plantas era uma característica inerente ao organismo, e não apenas uma resposta a um estímulo ambiental (2,3).

Esse pensamento só ganhou força na primeira metade do século XX, com os experimentos feitos com abelhas por August Forel (físico suíço), Ingeborg Beling (etologista alemão) e pelo grupo dirigido por Karl Ritter von Frisch (etologista alemão) (2). E a partir de então, uma série de importantes estudos para a cronobiologia foram realizados, fundamentando ainda mais essa área da ciência que era considerada mística.

Entender, portanto, que os ritmos biológicos são gerados internamente é de fundamental importância para compreendê-los. E por ter se desenvolvido em um ambiente com flutuações constantes, esse oscilador interno passou a se ajustar a tais estímulos rítmicos do ambiente toda vez que eles acontecem. Esse ajuste a cada ciclo é o que mantém a sincronização dos osciladores biológicos do organismo com o meio ambiente (4). Os fatores ambientais capazes de ajustar essa ritmicidade endógena são chamados, na cronobiologia, de *zeitgebers*, proveniente do alemão, essa expressão significa “doador de tempo”. O *zeitgeber* mais potente na natureza é o ciclo de iluminação ambiental, porém outros eventos ambientais periódicos também são marcadores de tempo importantes, como os ciclos de temperatura, alimentação e outros (5).

Classificados de acordo com sua frequência, se o ritmo ocorre a cada  $24 \pm 4$  h, ele é chamado circadiano. Os ultradianos são os ritmos com período menor que 20 h, enquanto que os infradianos são os que tem períodos maiores que 28 h (4). Em mamíferos o sistema circadiano é composto por três elementos: uma via de entrada (representada pela informação ambiental que chega ao sistema do indivíduo), um marcapasso central (que em mamíferos é o núcleo supraquiasmático (NSQ), sincronizado pela informação ambiental e que promove a sincronização de outras estruturas) e a via de saída (representada pela ritmicidade dos processos fisiológicos e comportamentais do organismo) (6).

A manutenção desse sistema se dá por uma relação estável entre o ritmo endógeno do organismo e os *zeitgebers*, e pela relação de fase mantida entre os diferentes processos biológicos rítmicos dos seres, o que garante a organização da ordem temporal interna do indivíduo. Alterações nessas relações de fase, podem levar à dessincronização, que quando mantida por muito tempo pode acarretar em desorganização da ordem temporal interna do organismo. Muitos trabalhos têm demonstrado que a sua manutenção é fundamental para a saúde e sua alteração pode levar a patologias. A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer -IARC*) considerou a ruptura do sistema circadiano um provável agente carcinogênico (7), dentre as evidências viu-se que lesar o NSQ aumentou a velocidade de crescimento tumoral em camundongos (8) e que alterações em genes

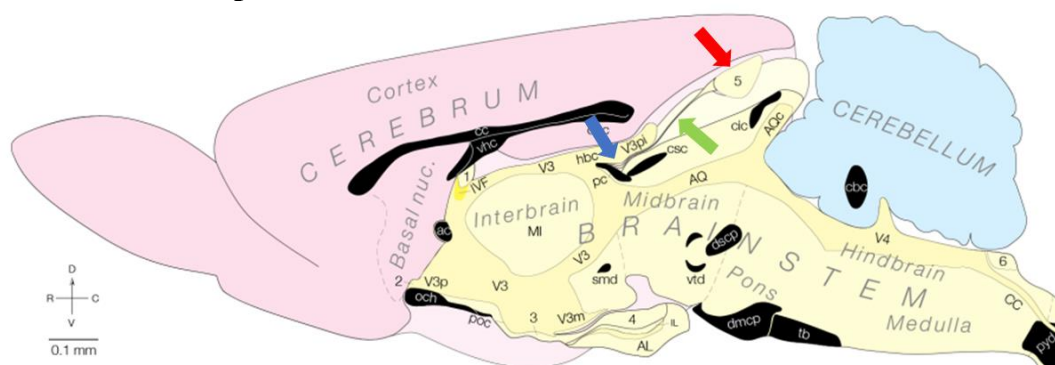
envolvidos na manutenção da ritmicidade impedem a supressão de tumores e modulam o risco de desenvolvimento do câncer (9–12). Além disso, a desregulação do sistema circadiano também parece estar relacionado com alterações do padrão alimentar e de parâmetros metabólicos que podem promover quadros de obesidade e diabetes (13–16), mesmo quando o indivíduo ainda está sendo gerado pela sua mãe (17).

Portanto, a presença de marcadores temporais, internos e externos, é fundamental para que não haja tal ruptura. Além da temperatura e do cortisol, outro importante marcador temporal interno é a melatonina, hormônio sintetizado durante a noite pela glândula pineal.

## 1.2 A glândula pineal e seu hormônio melatonina

O hormônio melatonina é produzido e secretado pela glândula pineal, presente em diversas classes de vertebrados. Sua localização varia de acordo com a espécie em questão. Em humanos, o órgão pineal se encontra na região central do encéfalo, especificamente no epitélamo, entre as comissuras habenulares e posterior (18), diferentemente do que é visto em roedores, nos quais é dividida em três partes: pineal profunda (entre as comissuras habenular e posterior, delimitando o recesso pineal), pedúnculo pineal e pineal superficial (19) (Figura 1), formando o complexo pineal.

**Figura 1 – Glândula pineal de ratos**



Representação gráfica de encéfalo de ratos, com ênfase na glândula pineal e suas porções: pineal superficial (seta vermelha), pedúnculo pineal (seta verde) e pineal profunda (seta azul). Adaptado de (20).

Apesar das diferenças encontradas na anatomia desse órgão, a constituição histológica da glândula pineal permanece a mesma nas diferentes espécies. Por volta de 80% de sua estrutura é composta por pinealócitos, mas também apresenta células gliais (das quais algumas são astrócitos) e tecido conjuntivo (18).

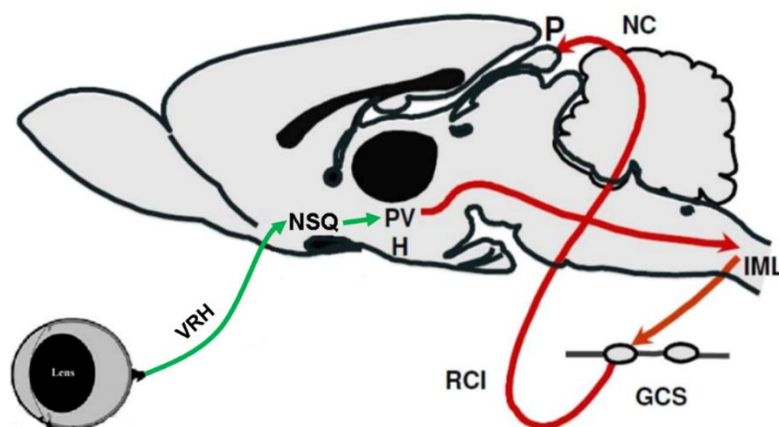
Interessantemente, a melatonina é um hormônio ubíquo, presente em quase todos os seres vivos de procariotos e eucariotos (21). Em mamíferos, a produção de melatonina é circadiana e se dá exclusivamente durante a noite (22–24), independentemente do ciclo de atividade e repouso da espécie, garantindo seu papel como sinalizador temporal interno.

Muitas são as funções atribuídas à melatonina, entre elas estão a capacidade de sequestrar radicais hidroxilas (25), ser um importante antioxidante natural (26), mobilizar mecanismos reparadores do DNA, regular processos biológicos como atividades de enzimas, o transporte de elétron na mitocôndria e processos de apoptose (21), ajustar o ciclo sono/vigília, auxiliar o sistema imunológico e, principalmente, participar da organização temporal de ritmos biológicos, sendo um importante sincronizador circadiano e sazonal (18,27).

A sincronização da produção de melatonina ao ciclo de iluminação ambiental depende de uma via neural que culmina na inervação simpática da glândula pineal (27,28). Essa via regulatória se inicia nos núcleos paraventriculares do hipotálamo (PVH), passando pela coluna intermédia lateral da medula espinhal (IML), de onde partem projeções pré-ganglionares para o gânglio cervical superior (GCS). A partir dessa estrutura, fibras simpáticas se projetam e, através do nervo carotídeo interno que, seguindo-se como nervo conário, inerva a glândula pineal liberando noradrenalina em seu interstício (27–30) (Figura 2), sendo esse o principal estímulo para a síntese de melatonina.

Essa via acima mencionada é temporizada pelo oscilador central, o NSQ, que está sincronizado, através de uma via retino-hipotalâmico, ao ciclo de iluminação ambiental, garantindo que a produção de melatonina se dê exclusivamente durante a noite (24,31).

**Figura 2 – Via neural de regulação da produção de melatonina**



Representação gráfica da via neural que regula a produção de melatonina através da liberação de noradrenalina no interstício glandular da pineal. Essa via neural é temporizada pelo núcleo supraquiasmático, que por sua vez está sincronizado pelo ciclo de iluminação ambiental graças às informações captadas pela retina e projetadas através

da via retino-hipotalâmica até o NSQ. (VRH): via retino-hipotalâmica; (NSQ): núcleo supraquiasmático; (PVH): núcleo paraventricular do hipotálamo; (IML): Coluna intermédio lateral da medula espinhal; (GCS): gânglios cervicais superiores; (RCI): ramos carotídeos internos; (NC): nervos conários; (P): glândula pineal. Modificado de (32).

Uma vez liberada no interstício glandular, a noradrenalina interage com seus receptores adrenérgicos. Quando ativado, o adrenoceptor  $\beta_1$  promove, através da mediação da proteína G estimulatória, o aumento da quantidade intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) pela ativação da enzima adenilato ciclase (AC). Esse mecanismo é potencializado pela ativação do adrenoceptor  $\alpha$  ( $\alpha_{1B}$ ). Quando isso acontece, sua proteína Gq ativa a fosfolipase C, que hidrolisa os fosfoinosítídeos de membrana, produzindo diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP3). O IP3, ao se ligar com seus receptores do retículo endoplasmático, induz a liberação de cálcio dessas organelas, aumentando sua concentração intracelularmente. Esse aumento de cálcio é caracterizado por um pico seguido de um platô. O cálcio e o DAG são importantes, pois serão os responsáveis por ativar a proteína quinase C (PKC), potencializando o aumento de AMPC. O cálcio intracelular e o AMPC são de fundamental importância na síntese de melatonina, pois irão participar da ativação da arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT), enzima passo limitante da síntese de melatonina, como descrito posteriormente (33–37).

A produção de melatonina se dá através de uma via catalítica, na qual a primeira enzima é a triptofano hidroxilase (TPH). Essa enzima é responsável por hidroxilar o aminoácido triptofano, transformando-o em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Tal substância é então descarboxilada pela descarboxilase de L-aminoácido (LAAD), dando origem à serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). Essa por sua vez, sofre ação da AANAT, que transfere um grupamento acetil para a serotonina, tendo como produto final a N-acetilserotonina (NAS). Por fim, a NAS sofre ação da acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT, antigamente conhecida como HIOMT), que substitui o hidrogênio do grupamento hidroxila do carbono 5 do grupo indólico por um grupamento metil, formando a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (28).

A TPH apresenta ritmo circadiano de sua atividade na glândula pineal de ratos, apresentando maiores valores durante a noite. Esse aumento se deve, pelo aumento da transcrição e síntese protéica, assim como pela ativação da enzima por fosforilação. Ambos são induzidos pelo estímulo noradrenérgico que aumenta os níveis de AMPC e PKA, culminando na fosforilação da proteína CREB (*cAMP response element binding*), um fator de transcrição que promove a transcrição do gene que codifica a TPH ao se ligar ao sítio CRE (*cAMP response*



*elements sites*). Além disso, a fosforilação da enzima também pode ser realizada pela PKA, pela quinase dependente de cálcio e calmodulina (CAMK) e pela PKC (33,34,36,38,39).

A AANAT, responsável pela acetilação da serotonina, apresenta diferentes características de acordo com a espécie. Em ratos essa enzima está presente em diversos tecidos, como retina, intestino, fígado, pele, entre outros (33), permitindo a produção local de melatonina. A expressão do gene que codifica essa enzima apresenta variação rítmica, sendo maior durante a noite, assim como a atividade de seu correspondente proteico. Durante a noite, esse aumento chega a ser 150 vezes se comparado aos valores diurnos em ratos (33,40–42). Um dos mecanismos de ativação da transcrição do gene da *Aanat* se dá através da fosforilação do CREB pelo AMPc após estímulo adrenérgico. O pCREB se liga ao sítio CRE da região promotora da *Aanat*, estimulando sua transcrição (39,42). Além do pCREB, outros fatores de transcrição também podem se ligar à região promotora da *Aanat*, levando à sua transcrição, como a proteína ativadora 1 (*Activator Protein 1*: AP-1), o antígeno relacionado ao Fos 2 (*Fos-related antigen 2*: Fra2) e a *Cone-rod Homeobox* (CRX) (43).

Por fim, a última enzima da via de síntese, a ASMT/HIOMT. Seu nome foi recentemente modificado para ASMT, a fim de especificar sua ação sobre a metilação da NAS, convertendo-a em melatonina. Sua atividade proteica aumenta 1,5 vezes durante a noite, enquanto sua expressão gênica aumenta 2 vezes durante essa fase. O ritmo circadiano do RNAm da HIOMT/ASMT é dependente da estimulação adrenérgica, da ativação do receptor  $\beta$ -adrenérgico e do aumento na concentração de AMPc. Já a regulação do ritmo de atividade da enzima HIOMT/ASMT parece ser dependente de eventos pós-transcricionais, induzidos por neurotransmissores que aumentem o cálcio (44,45) não estando diretamente relacionada com a noradrenalina assim como sua transcrição gênica.

De acordo com o visto, na regulação de todas as enzimas da via, podemos encontrar um elo em comum: a importância da estimulação noradrenérgica cíclica na glândula pineal, permitindo a manutenção do perfil rítmico deste órgão e de sua produção hormonal.

### **1.3 Remoção do gânglio cervical superior**

O gânglio cervical superior é o gânglio mais alto da cadeia paravertebral de onde parte a inervação simpática da cabeça e do pescoço (46), incluindo face e estruturas intracranianas, como a glândula pineal, através dos nervos carotídeos internos e externos. Suas ramificações inervam não só a pineal superficial, mas também a pineal profunda, e a ablação bilateral do gânglio leva a uma redução significativa da quantidade de fibras simpáticas nessas duas regiões

(47), e no pedúnculo pineal (48) por meses, reduzindo consideravelmente a liberação de noradrenalina no interstício da glândula.

Vários estudos demonstram que a remoção bilateral do gânglio cervical superior é capaz de modificar significativamente a via de síntese de melatonina e, conseqüentemente, a sua produção. A enzima AANAT sofre importantes alterações, não só em sua expressão gênica, mas também em sua atividade. De acordo com a literatura, após 10 dias de ganglionectomia, o ritmo circadiano de expressão gênica da *Aanat* em ratos foi abolido, assim como naqueles animais que sofreram lesão no núcleo supraquiasmático ou no núcleo paraventricular, demonstrando a importância dessa via neural para a manutenção de seu ritmo (49,50). O mesmo resultado foi visto na pineal superficial e profunda de hamsters (51). Seguindo a flutuação vista na expressão gênica, a atividade de AANAT e produção de melatonina também apresentaram abolição em seus ritmos, não havendo diferenças entre a produção diurna e noturna (49,51). Nesses trabalhos observou-se também um pequeno aumento da expressão gênica de *Aanat* durante o dia, o equivalente a aproximadamente 12% da produção noturna de animais intactos. Mesmo após 21 dias, a ganglionectomia continua tendo o seu efeito de abolir o ritmo e reduzir a atividade da AANAT durante a noite e aumentar levemente sua atividade durante o dia (52).

Ao serem tratados com isoproterenol (agonista  $\beta$  adrenérgico), os animais ganglionectomizados apresentaram reversão do quadro e aumento da expressão gênica de *Aanat* (50). Semelhantemente, glândulas pineais de ratos ganglionectomizados mantidas *in vitro* tiveram a atividade de AANAT aumentada após tratamento com noradrenalina quando comparadas com a atividade vista nesses animais (52), demonstrando que os efeitos observados de redução e abolição de ritmo, foram de fato devido à ausência de estimulação noradrenérgica. Não houve diferença nos resultados obtidos entre animais no qual houve a simulação da cirurgia e animais intactos (51,52).

A ganglionectomia não altera apenas a AANAT, mas também leva a alterações na última enzima da via, a ASMT/HIOMT. Viu-se que a remoção bilateral do gânglio cervical reduziu a atividade de ASMT/HIOMT e alterou o momento em que houve sua maior atividade. E assim como o visto para a AANAT, o tratamento com agonistas que ativam a sinalização noradrenérgica alterou esse quadro (53).

Esses dados em conjunto indicam que a presença de estimulação noradrenérgica de maneira rítmica, proveniente do gânglio cervical superior, é fundamental para a expressão rítmica circadiana e sazonal, além de garantir a quantidade de produção fisiológica de melatonina diária. A ausência da inervação simpática, através da ganglionectomia, altera radicalmente a síntese de melatonina, fazendo com que essa intervenção cirúrgica seja um bom

modelo para estudar o papel da inervação simpática no controle neural da produção de melatonina pela glândula pineal de mamíferos.

#### **1.4 Ritmicidade e o oscilador molecular**

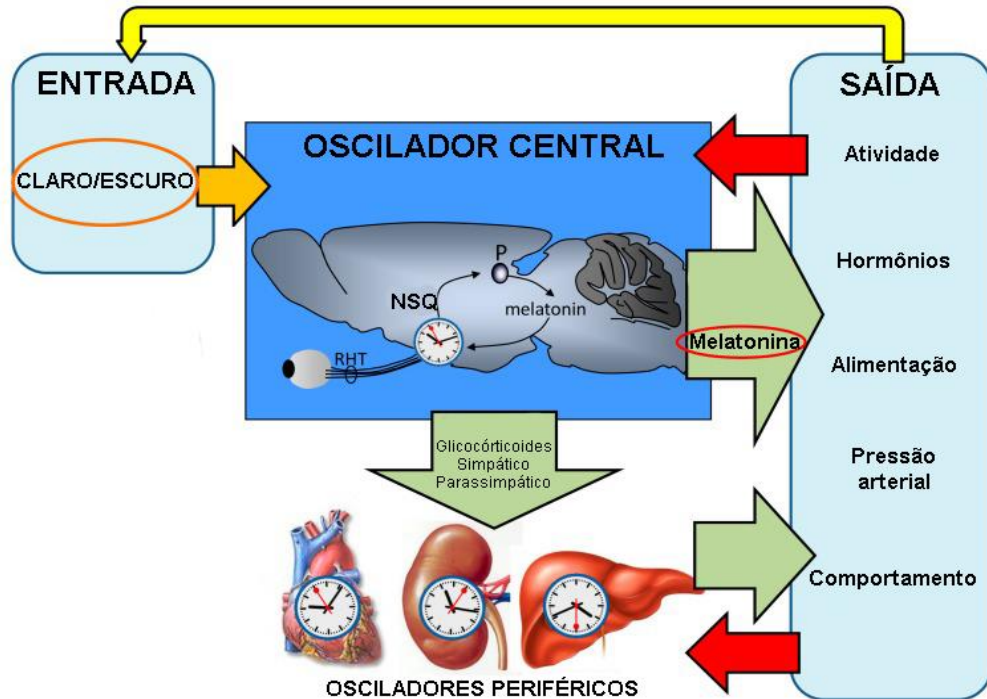
A síntese de melatonina apresenta variação circadiana e sazonal, com produção ocorrendo apenas durante a noite. Essa periodicidade é garantida através da temporização e sincronização de osciladores encontradas em todas as células. Uma vez temporizado e sincronizado pelos osciladores do NSQ, considerado como oscilador central em mamíferos, os osciladores da glândula pineal permanecem sincronizados com o ciclo de iluminação ambiental.

O núcleo supraquiasmático foi destacado como oscilador central pelo fato de que lesões bilaterais levaram à abolição de ritmos importantes, como atividade, temperatura, alimentação e ingestão hídrica (54–57), demonstrando que são regulados por essa estrutura. A princípio, pensava-se que os osciladores circadianos estavam presentes apenas em células do NSQ, mas hoje sabe-se que também podem ser encontrados em tecidos periférico, como o coração, rim e fígado, e que o núcleo supraquiasmático é um importante coordenador da expressão rítmica desses osciladores através de sinais neurais e humorais (22,23,58) (Figura 3), garantindo a ritmicidade dos processos fisiológicos em mamíferos.

A base molecular dos osciladores, centrais e periféricos, compreende um grupo de genes, que através de alças transcricionais e traducionais sustentam o sistema circadiano de expressão gênica. Em mamíferos, *Bmal1* (*Brain and muscle ARNT-like1*), *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*), *Rev-erba* (*Reverse strand of the c-erba gene*), *Per* (*Period*) *1, 2 e 3*, *Cry* (*Chryptochrome*) *1 e 2* foram considerados genes relógio. Além deles, o sistema circadiano também conta com os genes controlados pelo relógio como, por exemplo, o *Dbp* (*D-box binding protein*) (59), para a sua manutenção.

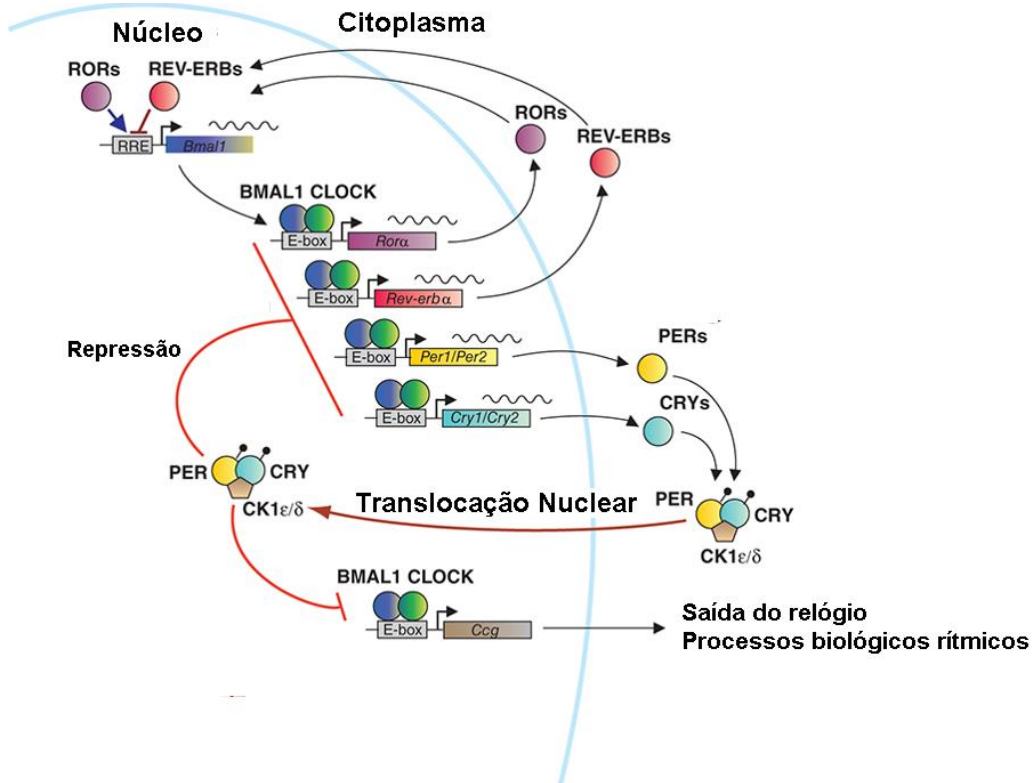
Portanto, para que a ritmicidade seja mantida esses genes estão envolvidos em basicamente duas alças de retroalimentação (Figura 4).

**Figura 3 - Regulação dos osciladores periféricos pelo oscilador central**



Através de sinais neurais e humorais, o núcleo supraquiasmático, considerado oscilador central, é capaz de, juntamente com outros fatores, coordenar a expressão rítmica dos osciladores periféricos, como coração, rins e fígado, garantindo a sincronização e a manutenção da ritmicidade de processos fisiológicos. A via de saída também contribui para a regulação da expressão rítmica dos osciladores. Modificado de (6)

**Figura 4 - Modelo do oscilador molecular em mamíferos**



Alças primária e secundária do oscilador molecular de mamíferos. Na alça primária, o complexo CLOCK:BMAL1 ativa a transcrição dos genes *Per* e *Cry*, que quando retornam ao núcleo regulam a sua própria expressão através

da inibição da ação de CLOCK:BMAL1. Na alça secundária há a regulação da expressão de *Bmal1*, através da ação de ROR que ativa sua transcrição e REVERB que a inibe. O correto funcionamento dessa maquinaria garante a expressão de genes controlados pelo relógio, que sustentam a ritmicidade de processos biológicos. Modificado de (60).

A alça primária envolve os genes *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* e *Cry2*. Primeiramente, os genes *Clock* e *Bmal1* são transcritos e traduzidos, no citoplasma ocorre a heterodimerização das proteínas CLOCK e BMAL1, formando o complexo CLOCK/BMAL1 que migra para o núcleo e pode se ligar à região ativadora de transcrição de diversos genes alvos. Na alça primária esse complexo se liga às regiões *E-boxes* (sequências específicas de DNA encontrados na região promotora) dos genes *Pers* e *Crys* ativando sua transcrição, o que culmina na tradução dessas proteínas. Quando as proteínas PER1 e PER2 se acumulam no citoplasma formam um complexo negativador juntamente com proteínas CRY1 e CRY2, que entrando no núcleo suprime a atividade do complexo CLOCK/BMAL1, impedindo assim sua ação indutora da transcrição dos genes relógio. Essa supressão da atividade ocorreria através de dois mecanismos distintos. No primeiro, ocorre a inibição, propriamente dita, da atividade do complexo CLOCK:BMAL1, através da ligação de CRY1 no heterodímero CLOCK:BMAL1 (repressão tipo bloqueio) que ocorre no início da fase circadiana (ZT0). No segundo modelo proposto, a repressão seria através da dissociação do complexo CLOCK:BMAL1 do sítio de transcrição realizada pela ligação do complexo PER2:CRY1, formando um novo complexo transiente PER2:CRY1:CLOCK:BMAL1 que ocorreria durante a noite (Figura 4) (61).

Para o funcionamento da alça secundária, há o envolvimento dos genes *Bmal1*, *Rev-erba/β* e *Rora/β*. O complexo ativador CLOCK/BMAL1 também pode promover a transcrição dos genes *Rev-erba/β* e *Rora/β*. Após transcrição e tradução, os ROR  $\alpha/\beta$  migram para o núcleo e agem ativando a transcrição do gene *Bmal1*, diferentemente de REV-ERB $\alpha/\beta$  que migram para o núcleo e atuam inibindo a transcrição do gene. Dessa forma essas proteínas são reguladoras da expressão de *Bmal1*, realizando a sintonia fina desse oscilador intracelular (22,23,58,62).

Outras proteínas secundárias, que são controladas por genes do relógio, aumentam a complexidade do *feedback* e aumentam a amplitude do ritmo, como a proteína DBP (proteína ligante do elemento D albumina). O complexo BMAL1/CLOCK aumenta a transcrição do gene *Dbp* através de presença de um E-box no seu segundo íntron mostrando, portanto, que o gene *Dbp* é controlado pelos genes do relógio (58).

Como já mencionado, esse oscilador molecular não está presente apenas no NSQ, mas também está em praticamente todas as regiões neurais centrais estudadas, além de praticamente todas as regiões periféricas, como fígado, coração, rins, músculos, tecido adiposo, entre outros

(23,63–65). Os genes relógio, presentes na glândula pineal, são responsáveis pelo metabolismo glandular que leva à síntese de melatonina (66).

### 1.5 Expressão de genes relógio na glândula pineal

Em glândula pineal de roedores, já foi vista a presença da expressão dos genes relógio que não só garantem a função rítmica da glândula, mas também agem diretamente sobre a via de síntese de melatonina, controlando por exemplo, o ciclo de atividade da AANAT (59,65–68).

A sinalização noradrenérgica garante a correta síntese de melatonina agindo sobre as enzimas da via, mas também garante o perfil rítmico da glândula pineal por meio da regulação dos genes relógio lá presentes. Simonneaux et al. (2004)(59), viram, em ratos Wistar, a variação circadiana dos genes *Bmal1*, *Per1*, *Per3*, *Cry1* e *Cry2* com adequada relação de fase entre eles. Ao serem tratados com isoproterenol (agonista  $\beta$  adrenérgico), viu-se o aumento da expressão dos genes *Per1* e *Cry2*, sugerindo que o perfil rítmico desses genes pode ser disparado pela noradrenalina. Corroborando esse dado, a injeção de propranolol (antagonista inespecífico receptores  $\beta$  adrenérgicos) durante a fase de claro por 3 h reduziu a expressão de *Per1* e *Cry2*, enquanto que os genes *Bmal1* e *Rev-erba* não foram afetados (67).

Experimentos *in vitro*, também demonstram a influência de noradrenalina sobre a expressão dos genes relógio na glândula pineal. Fukuhara, Dirden e Tosini (2002) (69) viram que o tratamento das glândulas com noradrenalina após o quinto dia de cultura aumentou a expressão de *Per1*, mas não de *Per2*. Esse efeito também foi visto quando astrócitos medulares de ratos foram tratados com essa catecolamina, havendo o aumento de *Per1*, mas não de *Per2* e *Clock* (70), demonstrando que os genes relógio respondem diferentemente à estimulação noradrenérgica.

Todos esses estudos *in vitro* foram feitos com estimulação aguda da sinalização noradrenérgica. Quando tais genes foram avaliados circadianamente, de fato viu-se que a estimulação aguda com noradrenalina não alterou as expressões de *Bmal1*, *Per2*, *Cry2* e *Rev-erba*, de modo que esses se mostraram arrítmicos. Porém, quando essas glândulas foram mantidas em cultura com tratamento temporizado de noradrenalina, mimetizando o ciclo que ocorreria no animal *in vivo*, viu-se a manutenção do ritmo e da fase de expressão desses genes relógio (71), demonstrando que pelo menos *in vitro* a ausência de sinalização adrenérgica altera o sistema circadiano da glândula pineal, além da própria síntese de melatonina que também fica alterada.

Esses trabalhos em conjunto demonstram que o oscilador molecular está presente na glândula pineal e é essencial para sua fisiologia e função. E apesar de estar clara a importância da noradrenalina nesse processo, ainda não está definida a maneira que ela age modulando a expressão dos genes relógio de forma global *in vivo*, portanto, uma análise do funcionamento do oscilador molecular da glândula pineal se torna imprescindível. Na literatura há dados que correlacionam o rompimento do sistema circadiano com alterações metabólicas em diferentes tecidos periféricos (72). Sendo a melatonina um hormônio ubíquo e com ação cronobiótica, qualquer alteração no órgão produtor desse hormônio poderá se refletir em alguma alteração no resto do organismo, principalmente alterações em outros osciladores, como o núcleo supraquiasmático, que apresenta receptores para melatonina (73). Além disso, modificações no oscilador do núcleo supraquiasmático pode alterar a ritmicidade de outros territórios no organismo, já que é responsável por coordenar a ritmicidade de osciladores periféricos e por controlar processos biológicos rítmicos fundamentais, como ciclo de atividade/repouso e temperatura. Sendo assim, este trabalho se torna essencial para melhorar a compreensão de se e como a ausência de sinalização noradrenérgica na glândula pineal pode afetar o sistema circadiano da própria pineal e de outras estruturas centrais e periféricas.

## 2 CONCLUSÃO

Em conjunto esses dados mostram a importância da inervação simpática na glândula pineal para a manutenção da integridade do sistema circadiano, já que a remoção da inervação simpática através da ganglionectomia, promoveu alterações na fisiologia rítmica da glândula pineal, sendo capaz de alterar os genes relógio expressos nesse tecido. Além disso, através da alteração na via de síntese de melatonina, e provável alteração do padrão de secreção desse hormônio, com redução e abolição da variação entre o dia e a noite, a ganglionectomia levou a alterações na expressão do oscilador central de mamíferos. Demonstrando que para gerar alterações na expressão rítmica do oscilador molecular do núcleo supraquiasmático, não é somente necessária a ausência completa de melatonina. Sendo assim, extrapolando esse dado, o ciclo de iluminação artificial a que estamos expostos atualmente, com fotoiluminação inclusive durante a noite, poderia afetar o oscilador central diretamente através da via retino-hipotalâmica, mas também indiretamente através da alteração da síntese de melatonina, já que é sabido que, assim como a ganglionectomia, pulsos de luz durante a noite é capaz de reduzir a via de síntese e, conseqüentemente, a secreção de melatonina (147,148), reenfatizando a necessidade de estudos na área.

Apesar de ser muito importante para manter essa coesão do sistema através de seus efeitos no supraquiasmático, os efeitos observados pela ganglionectomia nos ciclos de atividade e temperatura, foram menos marcantes do que aqueles provocados pela ausência total de melatonina através da pinealectomia, reforçando a ideia de que de fato a melatonina é um importante mensageiro circadiano, e que a sua redução ou arritmicidade, e principalmente sua abolição, é capaz de gerar modificações no sistema circadiano, molecularmente e comportamentalmente.



## REFERÊNCIAS

1. Anokhin PK. Biology and Neurophysiology of the Conditioned Reflex and its Role in Adaptive Behavior. *Biology and Neurophysiology of the Conditioned Reflex and its Role in Adaptive Behavior*. 1974. 313-329 p.
2. Moore-Ede M, Sulzman F, Fuller C. The clocks that time us: physiology of the circadian timing system. Cambridge, Mass: Harvard University Press; 1982.
3. Menna-Barreto LS, Fortunato G. O que é cronobiologia? In: Cipolla-Neto J, Marques N, Menna-Barreto LS, organizadores. *Introdução ao Estudo da Cronobiologia*. São Paulo: Ícone; 1988. p. 15–23.
4. Paludetti LA, Afeche SC, Benedito-Silva AA. Conceitos fundamentais. In: Cipolla-Neto J, Marques N, Menna-Barreto LS, organizadores. *Introdução ao Estudo da Cronobiologia*. São Paulo: Ícone; 1988. p. 25–64.
5. Aschoff J. Die 24-Stunden-Periodik der Maus unter konstanten Umgebungsbedingungen. *Naturwissenschaften*. 1951;38(21):506–7.
6. Bonmati-Carrion MA, Arguelles-Prieto R, Martinez-Madrid MJ, Reiter R, Hardeland R, Rol MA, et al. Protecting the melatonin rhythm through circadian healthy light exposure. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):23448–500.
7. World Health Organization IA for R on, Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Paint firefighting, Shiftw. 2010;98:9–764.
8. Filipski E, King VM, Li X, Granda TG, Mormont M-C, Liu X, et al. Host circadian clock as a control point in tumor progression. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(9):690–7.
9. Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*. 2002;111(1):41–50.
10. Truong T, Lique B, Menegaux F, Plancoulaine S, Laurent-Puig P, Mulot C, et al. Breast cancer risk, nightwork, and circadian clock gene polymorphisms. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(4):629–38.
11. Karantanos T, Theodoropoulos G, Pektasides D, Gazouli M. Clock genes: their role in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(8):1986–92.
12. Kelleher FC, Rao A, Maguire A. Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Lett*. Elsevier Ireland Ltd; 2014;342(1):9–18.

\*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

13. Qin L-Q, Li J, Wang Y, Wang J, Xu J-Y, Kaneko T. The effects of nocturnal life on endocrine circadian patterns in healthy adults. *Life Sci.* 2003;73(19):2467–75.
14. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. *Occup Environ Med.* 2001;58(11):747–52.
15. Garaulet M, Lee Y-C, Shen J, Parnell LD, Arnett DK, Tsai MY, et al. Genetic variants in human CLOCK associate with total energy intake and cytokine sleep factors in overweight subjects (GOLDN population). *Eur J Hum Genet.* 2010;18(3):364–9.
16. Fonken LK, Workman JL, Walton JC, Weil ZM, Morris JS, Haim A, et al. Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(43):18664–9.
17. Mendez N, Halabi D, Spichiger C, Salazar ER, Vergara K, Alonso-Vasquez P, et al. Gestational Chronodisruption Impairs Circadian Physiology in Rat Male Offspring, Increasing the Risk of Chronic Disease. *Endocrinology.* 2016;157(12):4654–68.
18. Arendt J. *Melatonin and the Mammalian Pineal Gland.* Vol. ed 1., London. Chapman & Hall. 1995.
19. Moller M, Møller M. Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech.* 1992;21(3):188–204.
20. Swanson LW. *Brain Maps: Structure of the Rat Brain.* 2<sup>a</sup>. Oxford, United Kingdom: Elsevier Science & Technology; 1998. 274 p.
21. Reiter RJ. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol.* 1995;16(4):383–415.
22. Duguay D, Cermakian N. The crosstalk between physiology and circadian clock proteins. *Chronobiol Int.* 2009;26(8):1479–513.
23. Dardente H, Cermakian N. Molecular Circadian Rhythms in Central and Peripheral Clocks in Mammals. *Chronobiol Int.* 2007;24(2):195–213.
24. Skene DJ, Arendt J. Human circadian rhythms: physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Ann Clin Biochem.* 2006;43(Pt 5):344–53.
25. Tan DX, Pöeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Lucien MC, et al. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* 1993;70(1–2):65–71.
26. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant

and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem.* 2002;2(2):181–97.

27. Kappers JA. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1960;52:163–215.
28. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia.* 1989;45(10):922–32.
29. Campos L, Cipolla-Neto J, Amaral FG, Michelini LC, Bader M, Baltatu OC. The Angiotensin-melatonin axis. *Int J Hypertens.* 2013;2013:521783.
30. Cipolla-Neto J, Bartol I, Seraphim PM, Afeche SC, Scialfa JH, Peraçoli AM. The effects of lesions of the thalamic intergeniculate leaflet on the pineal metabolism. *Brain Res.* 1995;691(1–2):133–41.
31. Moore RY. Neural control of pineal function in mammals and birds. *J Neural Transm Suppl.* 1978;(13):47–58.
32. Cipolla-Neto J, Afeche SC. Glândula Pineal. In: Aires M de M, organizador. *Fisiologia.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 980–90.
33. Borjigin J, Wang MM, Snyder SH. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature.* dezembro de 1995;378(6559):783–5.
34. Klein DC, Sugden D, Weller JL. Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(2):599–603.
35. Chik CL, Ho AK, Klein DC. Alpha 1-adrenergic potentiation of vasoactive intestinal peptide stimulation of rat pinealocyte adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate: evidence for a role of calcium and protein kinase-C. *Endocrinology.* 1988;122(2):702–8.
36. Vanecek J, Sugden D, Weller J, Klein DC. Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology.* 1985;116(6):2167–73.
37. Sugden D, Klein DC. Activators of protein kinase C act at a postreceptor site to amplify cyclic AMP production in rat pinealocytes. *J Neurochem.* 1988;50(1):149–55.
38. Sugden D, Vanecek J, Klein DC, Thomas TP, Anderson WB. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature.* 1985;314(6009):359–61.
39. Roseboom PH, Klein DC. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic

- receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol.* 1995;47(3):439–49.
40. Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri MA, Koonin E V, et al. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science.* 1995;270(5242):1681–3.
  41. Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology.* 1996;137(7):3033–45.
  42. Klein DC, Roseboom PH, Coon SL. New light is shining on the melatonin rhythm enzyme the first postcloning view. *Trends Endocrinol Metab.* 1996;7(3):106–12.
  43. Maronde E, Pfeffer M, Olcese J, Molina C a, Schlotter F, Dehghani F, et al. Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J Neurosci.* 1999;19(9):3326–36.
  44. Ribelayga C, Pévet P, Simonneaux V. Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res.* 1997;777(1–2):247–50.
  45. Ribelayga C, Garidou M-LL, Malan A, Gauer F, Calgari C, Pévet P, et al. Photoperiodic Control of the Rat Pineal Arylalkylamine-N-Acetyltransferase and Hydroxyindole-O-Methyltransferase Gene Expression and Its Effect on Melatonin Synthesis. *J Biol Rhythms.* 1999;14(2):105–15.
  46. Horn JP, Swanson LW. The Autonomic Motor System and the Hypothalamus. In: Kandel ER, Shwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, organizadores. *Principles of Neuro Science.* 5th ed McGraw-Hill Companies; 2013. p. 1056–77.
  47. Reiter RJ, Hedlund L. Peripheral sympathetic innervation of the deep pineal gland of the golden hamster. *Experientia.* 1976;32(8):1071–2.
  48. Luo Y, Wang J, Wu H, Zhu D, Zhang Y. Working-memory training improves developmental dyslexia in Chinese children. *Neural Regen Res.* 2013;8(5):452–60.
  49. Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Garidou M-L, Wortel J, van der Vliet J, van Heijningen C, et al. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci.* 2003;17(2):221–8.
  50. Takekida S, Yan L, Maywood ES, Hastings MH, Okamura H. Differential adrenergic regulation of the circadian expression of the clock genes *Period1* and *Period2* in the rat pineal gland. *Eur J Neurosci.* 2000;12(12):4557–61.
  51. Garidou ML, Bartol I, Calgari C, Pévet P, Simonneaux V. In vivo observation of a non-noradrenergic regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the

- rat pineal complex. *Neuroscience*. 2001;105(3):721–9.
52. Klein DC, Weller JL, Moore RY. Melatonin metabolism: neural regulation of pineal serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(12):3107–10.
  53. Nagle CA, Cardinali DP, Rosner JM. Retinal and Pineal Hydroxyindole—O—Methyl Transferases in the Rat: Changes Following Cervical Sympathectomy, Pinealectomy or Blinding. *Endocrinology*. 1973;92(5):1560–4.
  54. Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69(6):1583–6.
  55. Eastman CI, Mistlberger RE, Rechtschaffen A. Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. *Physiol Behav*. 1984;32(3):357–68.
  56. Saito M, Ibuka N. Decreased food intake of rats kept under adurnal feeding cycles: effect of suprachiasmatic lesions. *Physiol Behav*. 1983;30(1):87–92.
  57. Stoynev AG, Ikononov OC, Usunoff KG. Feeding pattern and light-dark variations in water intake and renal excretion after suprachiasmatic nuclei lesions in rats. *Physiol Behav*. 1982;29(1):35–40.
  58. Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res*. 2002;309(1):47–56.
  59. Simonneaux V, Poirel V-J, Garidou M-L, Nguyen D, Diaz-Rodriguez E, Pévet P. Daily rhythm and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland. *Mol Brain Res*. 2004;120(2):164–72.
  60. Takahashi JS. Molecular components of the circadian clock in mammals. *Diabetes, Obes Metab*. 2015;17:6–11.
  61. Ye R, Selby CP, Chiou Y-Y, Ozkan-Dagliyan I, Gaddameedhi S, Sancar A. Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian clock. *Genes Dev*. 2014;28(18):1989–98.
  62. Bonaconsa M, Malpeli G, Montaruli A, Carandente F, Grassi-Zucconi G, Bentivoglio M. Differential modulation of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus, liver and heart of aged mice. *Exp Gerontol*. Elsevier B.V.; 2014;55:70–9.
  63. Agez L, Laurent V, Pévet P, Masson-Pévet M, Gauer F. Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience*. 2007;144(2):522–30.
  64. Masson-Pévet M. [Melatonin in the circadian system]. *J Soc Biol*. 2007;201(1):77–83.

65. Namihira M, Honma S, Abe H, Tanahashi Y, Ikeda M, Honma K. Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. *Neurosci Lett*. 1999;267(1):69–72.
66. Fukuhara C, Yamazaki S, Liang J. Pineal circadian clocks gate arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the mouse pineal gland. *J Neurochem*. 2005;93(1):156–62.
67. Wongchitrat P, Felder-Schmittbuhl M-P, Phansuwan-Pujito P, Pévet P, Simonneaux V. Endogenous rhythmicity of Bmal1 and Rev-erb alpha in the hamster pineal gland is not driven by norepinephrine. *Eur J Neurosci*. maio de 2009;29(10):2009–16.
68. Wu T, Dong Y, Yang Z, Kato H, Ni Y, Fu Z. Differential resetting process of circadian gene. 2009;26(6):793–807.
69. Fukuhara C, Dirden JC, Tosini G. Regulation of period 1 expression in cultured rat pineal. *Neurosignals*. 2002;11(2):103–14.
70. Sugimoto T, Morioka N, Sato K, Hisaoka K, Nakata Y. Noradrenergic regulation of period1 expression in spinal astrocytes is involved in protein kinase A, c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase activation mediated by  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 2-adrenoceptors. *Neuroscience*. 2011;185:1–13.
71. Andrade-Silva J, Cipolla-Neto J, Peliciari-Garcia R a. The in vitro maintenance of clock genes expression within the rat pineal gland under standard and norepinephrine-synchronized stimulation. *Neurosci Res*. 2014;81–82:1–10.
72. Kennaway DJ, Owens J a, Voultzios A, Boden MJ, Varcoe TJ. Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(4):R1528-37.
73. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*. 1994;13(5):1177–85.
74. Bellavía SL, Carpentieri a R, Vaqué a M, Macchione a F, Vermouth NT. Pup circadian rhythm entrainment--effect of maternal ganglionectomy or pinealectomy. *Physiol Behav*. 2006;89(3):342–9.
75. Mihara T, Kikuchi T, Kamiya Y, Uchimoto K, Kurahashi K, Goto T. Day or Night Administration of Ketamine and Pentobarbital Differentially Affect Circadian Rhythms of Pineal Melatonin Secretion and Locomotor Activity in Rats. *Anesth Analg*. 2012;115(4):805–13.
76. Savastano LE, Castro AE, Fitt MR, Rath MF, Romeo HE, Muñoz EM. A standardized surgical technique for rat superior cervical ganglionectomy. *J Neurosci Methods*. 2010;192(1):22–33.

77. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
78. Harkin A, O'Donnell JM, Kelly JP. A study of VitalView for behavioural and physiological monitoring in laboratory rats. *Physiol Behav*. 2002;77(1):65–77.
79. Usvyat LA, Carter M, Thijssen S, Kooman JP, van der Sande FM, Zabetakis P, et al. Seasonal variations in mortality, clinical, and laboratory parameters in hemodialysis patients: a 5-year cohort study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(1):108–15.
80. Morgan WW, Hansen JT. Time course of the disappearance of pineal noradrenaline following superior cervical ganglionectomy. *Exp brain Res*. 1978;32(3):429–34.
81. Coon SL, McCune SK, Sugden D, Klein DC. Regulation of pineal alpha1B-adrenergic receptor mRNA: day/night rhythm and beta-adrenergic receptor/cyclic AMP control. *Mol Pharmacol*. 1997;51(4):551–7.
82. Sugden D, Klein DC. Regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase in neonatal and adult rats. *J Neurochem*. 1983;40(6):1647–53.
83. Chik CL, Young I, Ho AK. Differential involvement of the arachidonic acid cascade on the alpha 1-adrenergic potentiation of vasoactive intestinal peptide- versus beta-adrenergic-stimulated cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in rat pinealocytes. *J Neurochem*. 1991;57(5):1534–9.
84. Simonneaux V, Kienlen-Campard P, Loeffler JP, Basille M, Gonzalez BJ, Vaudry H, et al. Pharmacological, molecular and functional characterization of vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the rat pineal gland. *Neuroscience*. 1998;85(3):887–96.
85. Piszczkiewicz S, Zigmund RE. Is the vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in the rat pineal gland present in fibers originating in the superior cervical ganglion? *Brain Res*. 1992;598(1–2):327–31.
86. Kaku K, Tsuchiya M, Tanizawa Y, Okuya S, Inoue Y, Kaneko T, et al. Circadian cycles in VIP content and VIP stimulation of cyclic AMP accumulation in the rat pineal gland. *Peptides*. 1986;7 Suppl 1:193–5.
87. Moller M, Phansuwan-Pujito P, Morgan KC, Badiu C. Localization and diurnal expression of mRNA encoding the beta1-adrenoceptor in the rat pineal gland: an in situ hybridization study. *Cell Tissue Res*. 1997;288(2):279–84.
88. Pfeiffer M, Kuhn R, Krug L, Korf HW, Stehle JH. Rhythmic variation in beta1-adrenergic receptor mRNA levels in the rat pineal gland: circadian and developmental regulation. *Eur J Neurosci*. 1998;10(9):2896–904.
89. Collins S, Ostrowski J, Lefkowitz RJ. Cloning and sequence analysis of the human beta

- 1-adrenergic receptor 5'-flanking promoter region. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1172(1-2):171-4.
90. Henden T, Stokkan KA, Reiter RJ, Nonaka KO, Lerchl A, Jones DJ. Age-associated reduction in pineal beta-adrenergic receptor density is prevented by life-long food restriction in rats. *Biol Signals*. 1(1):34-9.
  91. Sugden D. Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J Neurochem*. 2003;86(5):1308-11.
  92. Boadle-Biber MC. Activation of tryptophan hydroxylase from slices of rat brain stem incubates with N6, 02'-dibutyryl adenosine-3':5'-cyclic monophosphate. *Biochem Pharmacol*. fevereiro de 1980;29(4):669-72.
  93. Ehret M, Pevet P, Maitre M. Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J Neurochem*. 1991;57(5):1516-21.
  94. Shibuya H, Toru M, Watanabe S. A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. *Brain Res*. 1977;138(2):364-8.
  95. Sitaram BR, Lees GJ. Effect of oxygen on the induction of tryptophan hydroxylase by adrenergic agents in organ cultures of rat pineal glands. *J Neurochem*. abril de 1984;42(4):1183-5.
  96. Boularand S, Darmon MC, Mallet J. The human tryptophan hydroxylase gene. An unusual splicing complexity in the 5'-untranslated region. *J Biol Chem*. 1995;270(8):3748-56.
  97. Faniello MC, Bevilacqua MA, Condorelli G, de Crombrughe B, Maity SN, Avvedimento VE, et al. The B subunit of the CAAT-binding factor NFY binds the central segment of the Co-activator p300. *J Biol Chem*. 1999;274(12):7623-6.
  98. Côté F, Schussler N, Boularand S, Peirotes A, Thévenot E, Mallet J, et al. Involvement of NF-Y and Sp1 in basal and cAMP-stimulated transcriptional activation of the tryptophan hydroxylase (TPH) gene in the pineal gland. *J Neurochem*. 2002;81(4):673-85.
  99. Huang Z, Liu T, Chatteraj A, Ahmed S, Wang MM, Deng J, et al. Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland. *J Pineal Res*. 2008;45(4):506-14.
  100. Ho a K, Price DM, Terriff D, Chik CL. Timing of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the rat pineal gland. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;252(1-2):34-9.
  101. Yuwiler A, Brammer GL, Bennett BL. Interaction between adrenergic and peptide stimulation in the rat pineal: pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *J Neurochem*.



1995;64(5):2273–80.

102. Gauer F, Craft CM. Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain Res.* 1996;737(1–2):99–109.
103. Klein DC, Schaad NL, Namboordiri MA, Yu L, Weller JL. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Biochem Soc Trans.* 1992;20(2):299–304.
104. Wang G-Q, Du Y-Z, Tong J. Daily oscillation and photoresponses of clock gene, *Clock*, and clock-associated gene, arylalkylamine N-acetyltransferase gene transcriptions in the rat pineal gland. *Chronobiol Int.* 2007;24(1):9–20.
105. Wongchitrat P, Felder-schmittbuhl M. A Noradrenergic Sensitive Endogenous Clock Is Present in the Rat Pineal Gland. 2011;75–83.
106. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science.* 2000;288(5468):1013–9.
107. Yoshikawa T, Yamazaki S, Menaker M. Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *J Biol Rhythms.* 2005;20(6):500–12.
108. Chen W, Baler R. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;81(1–2):43–50.
109. Morioka N, Sugimoto T, Tokuhara M, Dohi T, Nakata Y. Noradrenaline induces clock gene *Per1* mRNA expression in C6 glioma cells through beta(2)-adrenergic receptor coupled with protein kinase A - cAMP response element binding protein (PKA-CREB) and Src-tyrosine kinase - glycogen synthase kinase-3beta (Src-GSK. *J Pharmacol Sci.* 2010;113(3):234–45.
110. Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, Okamura H. Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol.* 2000;20(13):4773–81.
111. Takekida S, Yan L, Maywood ES, Hastings MH, Okamura H. Differential adrenergic regulation of the circadian expression of the clock genes *Period1* and *Period2* in the rat pineal gland. *Eur J Neurosci.* 2000;12(12):4557–61.
112. Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, Schibler U. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol.* 2007;5(2):e34.
113. Pang SF, Ralph CL. Pineal and serum melatonin at midday and midnight following pinealectomy or castration in male rats. *J Exp Zool.* 1975;193(3):275–80.
114. Pevet P, Challet E. Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the

- circadian clocks network. *J Physiol Paris*. 2011;105(4–6):170–82.
115. de Farias TDSM, de Oliveira AC, Andreotti S, do Amaral FG, Chimin P, de Proença ARA, et al. Pinealectomy interferes with the circadian clock genes expression in white adipose tissue. *J Pineal Res*. 2015;58(3):251–61.
  116. Lamia KA, Storch K-F, Weitz CJ. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci*. setembro de 2008;105(39):15172–7.
  117. Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, et al. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med*. 2010;16(10):1152–6.
  118. Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, et al. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol*. 2002;12(7):540–50.
  119. Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*. 2000;14(23):2950–61.
  120. Stokkan K-A, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding. *Science (80- )*. 2001;291(5503):490–3.
  121. Vollmers C, Gill S, DiTacchio L, Pulivarthy SR, Le HD, Panda S. Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(50):21453–8.
  122. Shieh J-M, Wu H-T, Cheng K-C, Cheng J-T. Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKC $\zeta$ -Akt-GSK3 $\beta$  pathway in hepatic cells. *J Pineal Res*. 2009;47(4):339–44.
  123. Kurabayashi N, Hirota T, Sakai M, Sanada K, Fukada Y. DYRK1A and Glycogen Synthase Kinase 3 , a Dual-Kinase Mechanism Directing Proteasomal Degradation of CRY2 for Circadian Timekeeping. *Mol Cell Biol*. 2010;30(7):1757–68.
  124. Sabath E, Salgado-Delgado R, Guerrero-Vargas NN, Guzman-Ruiz MA, del Carmen Basualdo M, Escobar C, et al. Food entrains clock genes but not metabolic genes in the liver of suprachiasmatic nucleus lesioned rats. *FEBS Lett*. 2014;588(17):3104–10.
  125. Saini C, Liani A, Curie T, Gos P, Kreppel F, Emmenegger Y, et al. Real-time recording of circadian liver gene expression in freely moving mice reveals the phase-setting behavior of hepatocyte clocks. *Genes Dev*. 2013;27(13):1526–36.
  126. Houdek P, Nováková M, Polidarová L, Sládek M, Sumová A. Melatonin is a redundant entraining signal in the rat circadian system. *Horm Behav*. 2016;83:1–5.

127. Quintela T, Sousa C, Patriarca FM, Gonçalves I, Santos CRA. Gender associated circadian oscillations of the clock genes in rat choroid plexus. *Brain Struct Funct*. 2015;220(3):1251–62.
128. Hewing M. A liquor contacting area in the pineal recess of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Anat Embryol (Berl)*. 1978;153(3):295–304.
129. Heidbüchel U, Vollrath L. Pineal complex of rats: effects of superficial pinealectomy on the deep pineal. *Acta Anat (Basel)*. 1983;117(2):165–9.
130. Challet E. Minireview : Entrainment of the Suprachiasmatic Clockwork in Diurnal and Nocturnal Mammals. *Endocrinology*. 2007;148(12):5648–55.
131. Pévet P, Agez L, Bothorel B, Saboureau M, Gauer F, Laurent V, et al. Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world. *Chronobiol Int*. 2006;23(1–2):39–51.
132. Cassone VM. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci*. 1990;13(11):457–64.
133. Agez L, Laurent V, Guerrero HY, Pévet P, Masson-Pévet M, Gauer F. Endogenous melatonin provides an effective circadian message to both the suprachiasmatic nuclei and the pars tuberalis of the rat. *J Pineal Res*. 2009;46(1):95–105.
134. Vriend J, Reiter RJ. Melatonin feedback on clock genes : a theory involving the proteasome. *J Pineal Res*. 2015;(58):1–11.
135. Dardente H, Menet JS, Poirel VJ, Streicher D, Gauer F, Vivien-Roels B, et al. Melatonin induces *Cry1* expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;114(2):101–6.
136. Amir S, Harbour VL, Robinson B. Pinealectomy does not affect diurnal *PER2* expression in the rat limbic forebrain. *Neurosci Lett*. maio de 2006;399(1–2):147–50.
137. Besing RC, Paul JR, Hablitz LM, Rogers CO, Johnson RL, Young ME, et al. Circadian rhythmicity of active *GSK3* isoforms modulates molecular clock gene rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms*. 2015;30(2):155–60.
138. Reiter RJ, Richardson BA, Johnson LY, Ferguson BN, Dinh DT. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science*. 1980;210(4476):1372–3.
139. Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrangé P, Renard P, et al. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2003;144(12):5347–52.
140. Bojková B, Orendás P, Friedmanová L, Kassayová M, Datelinka I, Ahlersová E, et al. Prolonged melatonin administration in 6-month-old Sprague-Dawley rats: metabolic

alterations. *Acta Physiol Hung.* março de 2008;95(1):65–76.

141. Fioretti MC, Riccardi C, Menconi E, Martini L. Control of the circadian rhythm of the body temperature in the rat. *Life Sci.* junho de 1974;14(11):2111–9.
142. Hanneman SK. Measuring Circadian Temperature Rhythm. *Biol Res Nurs.* 2001;2(4):236–48.
143. Heldmaier G, Hoffmann K. Melatonin stimulates growth of brown adipose tissue. *Nature.* 1974;247(5438):224–5.
144. Heldmaier G, Steinlechner S, Rafael J, Vsiansky P. Photoperiodic control and effects of melatonin on nonshivering thermogenesis and brown adipose tissue. *Science.* 1981;212(4497):917–9.
145. Jiménez-Aranda A, Fernández-Vázquez G, Campos D, Tassi M, Velasco-Perez L, Tan DX, et al. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res.* 2013;55:416–23.
146. Lopez-Molina L, Conquet F, Dubois-Dauphin M, Schibler U. The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J.* 1997;16(22):6762–71.
147. Ribelayga C, Gauer F, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V. Photoneural Regulation of Rat Pineal Hydroxyindole- O - Methyltransferase ( HIOMT ) Messenger Ribonucleic Acid Expression : An Analysis of Its Complex Relationship with HIOMT Activity \*. *Endocrinology.* 1999;140(3).
148. Grundy A, Sanchez M, Richardson H, Tranmer J, Borugian M, Graham CH, et al. Light Intensity Exposure, Sleep Duration, Physical Activity, and Biomarkers of Melatonin Among Rotating Shift Nurses. *Chronobiol Int.* 2009;26(7):1443–61.