

**Maria Nathália de Carvalho Magalhães Moraes**

Efeito da Luz e Endotelina no Mecanismo Molecular  
do Relógio em Melanóforos de *Xenopus laevis*

**Effect of Light and Endothelin on Clock Molecular  
Mechanisms in *Xenopus laevis* Melanophores**

São Paulo

2014

**Maria Nathália de Carvalho Magalhães Moraes**

Efeito da Luz e Endotelina no Mecanismo Molecular  
do Relógio em Melanóforos de *Xenopus laevis*

**Effect of Light and Endothelin on Clock Molecular  
Mechanisms in *Xenopus laevis* Melanophores**

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

Orientadora:

Ana Maria de Lauro Castrucci

São Paulo

2014

# Ficha Catalográfica

Moraes, Maria Nathália de Carvalho Magalhães.

Efeito da luz e endotelina no mecanismo molecular do relógio em melanóforos de *Xenopus laevis* / Maria Nathália de Carvalho Magalhães Moraes ; orientadora Ana Maria de Lauro Castrucci. -- São Paulo, 2014. 151 f.

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

1. *Xenopus laevis*. 2. Melanopsina. 3. Genes do relógio. 4. Endotelina. 5. Relógio periférico. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

## Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Profa. Dra.

Orientadora

*Dedico esta tese a minha mãe, Suelly de Carvalho, que me ensinou o valor da vida e meu amado Juarez Borges, que me ensinou a amar.*

*“Tenho consciência de ser autêntica e procuro superar todos os dias minha própria personalidade, despedaçando dentro de mim tudo que é velho e morto, pois lutar é a palavra vibrante que levanta os fracos e determina os fortes.*

*Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça.*

*Digo o que penso, com esperança.*

*Penso no que faço, com fé.*

*Faço o que devo fazer, com amor.*

*Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende!”*

*Cora Coralina*

*“Eu desejo, como qualquer ser humano, sentir-me em casa onde quer que esteja.”*

Maya Angelou

## **Agradecimentos**

*“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”*

**Clarice Lispector**

Agradeço a Deus por ter guiado meus passos e ter me dado força para sempre seguir em frente.

Agradeço a toda a minha família que sempre me ofereceu apoio e amor, e que compreendeu a minha ausência durante a execução deste trabalho. A minha vó Adir, Tia Suzi, Tio Atilano e Sofia que sempre torceram por mim. A minha irmã, Ana Clara, que com seu coração enorme sempre esteve ao meu lado, mesmo quando fisicamente distante. Principalmente a minha mãe, Suely, que sempre foi meu exemplo de mulher forte. Que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e amando incondicionalmente. Que sempre com as palavras doces me mostrou que força e determinação são essenciais durante a caminhada. Sem você, hoje não estaria aqui! Amo você!

Novamente agradeço a Deus por ter me dado uma nova família, a do coração. Obrigada Thelma pelo amor de mãe e pela torcida diária. Obrigada meu amor Juarez, por sonhar o meu sonho e sempre me apoiar. Por ter feito de mim mais coração do que razão. Te amo!

Agradeço imensamente a minha orientadora Ana Maria Castrucci, que me ensinou a pensar ciência, mas que também me ensinou sobre a arte da vida com todo seu amor. Obrigada por todas as oportunidades concedidas, pela confiança e principalmente por toda amizade. Serei eternamente grata!

À amiga Maristela, pelas deliciosas madrugadas de trabalho. Que ao meu lado fez do trabalho um grande prazer. Obrigada pelos inúmeros conselhos. Pela amizade, carinho e amor.

Aos amigos de laboratório: Bruno, Jennifer, Leonardo Assis, Nathana, Rodrigo e Márcio pela excelente companhia, boas risadas, e excelentes discussões científicas que contribuíram para meu crescimento profissional. Sem vocês não teria sido tão prazeroso.

Aos amigos Patrícia, Marcos, Camila, Renato, Sanseray que fizeram os momentos difíceis mais felizes. Obrigado por terem sido “ouvido” quando precisei desabafar e por me acalmarem quando desesperei.

As queridas amigas Carol, Elisa, Karina e Michelle, minhas irmãs de alma e coração. Saber que vocês torcem por mim fez a minha caminhada mais tranquila. Saber que em cada retorno a Juiz de Fora vocês estariam lá pra dividir comigo minhas vitórias me deu força pra nunca desistir.

À Fernanda Amaral e Professor José Cipolla pelas inúmeras discussões enriquecedoras sobre a análise dos meus resultados.

À Roseli e Gisele que sempre me ajudaram com tudo que estava ao seu alcance.

Agradeço aos demais laboratórios e funcionários do Dep. de Fisiologia por todo o auxílio prestado e pela ótima convivência.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	14
INTRODUÇÃO.....	17
1. O ritmo biológico: contexto histórico .....	18
2. Organização temporal .....	19
3. Detecção do sinal luminoso.....	22
4. Melanopsina: histórico .....	25
5. O relógio biológico central de mamíferos.....	29
6. Maquinaria molecular do relógio .....	31
7. Relógios periféricos.....	35
8. Endotelinas .....	39
9. Modelo de estudo: melanóforos de <i>Xenopus laevis</i> .....	43
OBJETIVO .....	46
MATERIAL E MÉTODOS.....	49
1. Cultura de melanóforos de <i>Xenopus laevis</i> .....	50
2. Determinação da presença das proteínas melanopsinas OPN4x e OPN4m por ensaio imunocitoquímico.....	50
3. Ensaio de dispersão de grânulos de melanina .....	52
4. Expressão temporal dos genes de relógio <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Clock</i> e <i>Bmal1</i> em melanóforos submetidos a ciclo claro-escuro (12:12 CE, luz branca) ou escuro constante (EC).....	53
5. Expressão dos genes de relógio <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Clock</i> e <i>Bmal1</i> em melanóforos submetidos a pulsos de luz azul ou vermelha .....	54
6. Expressão dos genes de relógio <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Clock</i> e <i>Bmal1</i> em melanóforos submetidos a pulso de luz azul na presença de inibidores de componentes de vias de sinalização ...	56

7. Expressão dos genes de relógio <i>Per1</i> , <i>Per2</i> e <i>Bmal1</i> em melanóforos tratados com ativador de guanilil ciclase (YC-1).....	56
8. Quantificação de AMPc em melanóforos submetidos a pulso de luz azul.....	57
9. Expressão temporal dos genes de relógio <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Clock</i> e <i>Bmal1</i> em melanóforos tratados com endotelina-3.....	58
10. Silenciamento da melanopsina <i>Opn4x</i> .....	59
11. Extração de RNA total.....	61
12. RT-PCR ( <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> ).....	62
13. PCR quantitativo .....	62
14. Análise dos resultados .....	66
RESULTADOS .....	68
1. Determinação da presença das proteínas melanopsinas OPN4m e OPN4x por ensaio imunocitoquímico.....	69
2. Ensaio de dispersão de grânulos de melanina .....	75
4. Expressão dos genes de relógio <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Clock</i> e <i>Bmal1</i> em melanóforos submetidos a diferentes condições de iluminação .....	78
5. Via de sinalização em melanóforos de <i>Xenopus laevis</i> em resposta a luz azul.....	84
6. Expressão temporal dos genes de relógio <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Clock</i> e <i>Bmal1</i> em melanóforos tratados com endotelina-3.....	89
7. Silenciamento da melanopsina <i>Opn4x</i> .....	102
DISCUSSÃO .....	104
1. Melanóforos de <i>Xenopus</i> : modelo de relógio periférico .....	105
2. Via de sinalização da melanopsina.....	115
3. Efeito da endotelina sobre os melanóforos .....	121
4. Transfecção de RNAi em melanóforos de <i>Xenopus</i> .....	128

CONCLUSÃO.....	131
BIBLIOGRAFIA.....	134

## **RESUMO**

Os ciclos claro-escuro (CE) são considerados importantes pistas para o ajuste de relógios biológicos. Alças de retroalimentação positiva e negativa de transcrição e tradução de genes de relógio são a base molecular subjacente tanto a relógios centrais como periféricos. A opsina não visual, melanopsina (*Opn4*), expressa na retina de mamíferos, é considerada o fotopigmento circadiano pois é responsável pelo ajuste do relógio biológico endógeno. Este fotopigmento também está presente nos melanóforos de *Xenopus laevis*, onde ele foi descrito pela primeira vez, mas seu papel nestas células ainda não está completamente esclarecido. Espécies de vertebrados não mamíferos expressam duas ou mais melanopsinas e, no caso de *X. laevis*, há dois genes, *Opn4m* and *Opn4x*. Melanóforos de *X. laevis* respondem à luz com dispersão dos grânulos de melanina, a resposta máxima sendo atingida no comprimento de onda correspondente àquele de excitação máxima da melanopsina. Entre vários hormônios, endotelinas também dispersam os melanossomos em melanóforos de *Xenopus* através de via similar àquela evocada pela luz. Tendo esses fatos em mente, decidimos investigar se a luz e a endotelina modulam a expressão de genes de relógio em melanóforos de *Xenopus*, usando PCR quantitativo para avaliar os níveis relativos de RNAm de *Per1*, *Per2*, *Clock* e *Bmal1*. Ciclos CE promoveram alterações temporais na expressão de *Per1*, *Per2* e *Bmal1*. Pulsos de 10 min de luz azul aumentaram a expressão de *Per1* e *Per2*, diminuíram a expressão de *Opn4x*, mas não tiveram efeito sobre *Opn4m*. Ainda mais, diferentes localizações foram mostradas para cada melanopsina: imunorreatividade para OPN4x foi vista principalmente na membrana celular, enquanto OPN4m foi imuno-localizada no núcleo. Estes resultados em conjunto apontam para funções diferenciais das duas melanopsinas neste modelo. A translocação de grânulos de melanina foi maior quando um pulso de luz azul foi aplicado na presença de endotelina ET-3. E os níveis de RNAm de *Clock* exibiram variação temporal em melanóforos submetidos a CE após tratamento com ET-3  $10^{-9}$ M, enquanto a expressão de *Per1* não foi

afetada pelo tratamento hormonal. Em adição, ensaios farmacológicos indicaram que as respostas de *Per1* e *Per2* à luz azul são evocadas através da ativação da via de fosfoinosítídeos, com *crosstalks* com GMPc/proteína quinase G (PKG) para ativar os genes de relógio. Estes dados sugerem a participação de melanopsina na foto-ativação de genes de relógio, e apontam para uma participação menor de endotelina como sincronizador desta linhagem celular. Nossos resultados constituem uma importante contribuição ao campo emergente dos relógios periféricos os quais, em espécies de não mamíferos têm sido mais extensivamente estudados em *Drosophila melanogaster* e *Danio rerio*. Dentro deste contexto, nós mostramos que os melanóforos de *Xenopus laevis* representam um modelo ideal para a compreensão da modulação de ritmos circadianos por luz e hormônios.

# **ABSTRACT**

Light-dark cycles (LD) are considered important cues to entrain biological clocks. Positive and negative feedback loops of clock gene transcription and translation are the molecular basis underlying the mechanism of both central and peripheral clocks. The non-visual opsin, melanopsin (*Opn4*), expressed in the mammalian retina, is considered a circadian photopigment because it is responsible of entraining the endogenous biological clock. This photopigment is also present in the melanophores of *Xenopus laevis*, where it was first described, but its role in these cells is not fully understood. Non-mammalian vertebrate species express two or more melanopsins, and in *X. laevis* there are two melanopsin genes, *Opn4m* and *Opn4x*. *X. laevis* melanophores respond to light with melanin granule dispersion, the maximal response being achieved at the wavelength of melanopsin maximal excitation. Among various hormones, endothelins also disperse melanosomes in *Xenopus* melanophores through a similar pathway as light does. Therefore, we decided to investigate whether light and endothelin modulate clock gene expression in *Xenopus* melanophores, using quantitative PCR to evaluate the relative mRNA levels of *Per1*, *Per2*, *Clock* and *Bmal1*. LD cycles elicited temporal changes in the expression of *Per1*, *Per2* and *Bmal1*. A 10 min pulse of blue light increased the expression of *Per1* and *Per2*, decreased *Opn4x* expression, but had no effect on *Opn4m*. In addition, a different localization was shown for each melanopsin: immunoreactivity for OPN4x was mainly seen in the cell membrane, whereas OPN4m was immunolocalized in the nucleus. These results taken together point to a differential role for each melanopsin in this model. Melanosome translocation was greater when a blue light pulse was applied in the presence of endothelin ET-3. And mRNA levels of *Clock* exhibited temporal variation in melanophores under LD cycles after  $10^{-9}$  M ET-3 treatment, whereas *Per1* expression was not affected by the hormone treatment. In addition, pharmacological assays indicated that *Per1* and *Per2* responses to blue light are evoked through the activation of the phosphoinositide pathway,

## ABSTRACT

which crosstalks with cGMP/protein kinase G (PKG) to activate the clock genes. These data suggest the participation of melanopsin in the photo-activation of clock genes and point to a minor role of endothelin as synchronizer for this cell line. Our results add an important contribution to the emerging field of peripheral clocks, which in non-mammalian species have been mostly studied in *Drosophila melanogaster* and *Danio rerio*. Within this context, we show that *Xenopus laevis* melanophores represent an ideal model to understanding circadian rhythms modulation by light and hormone.

# INTRODUÇÃO

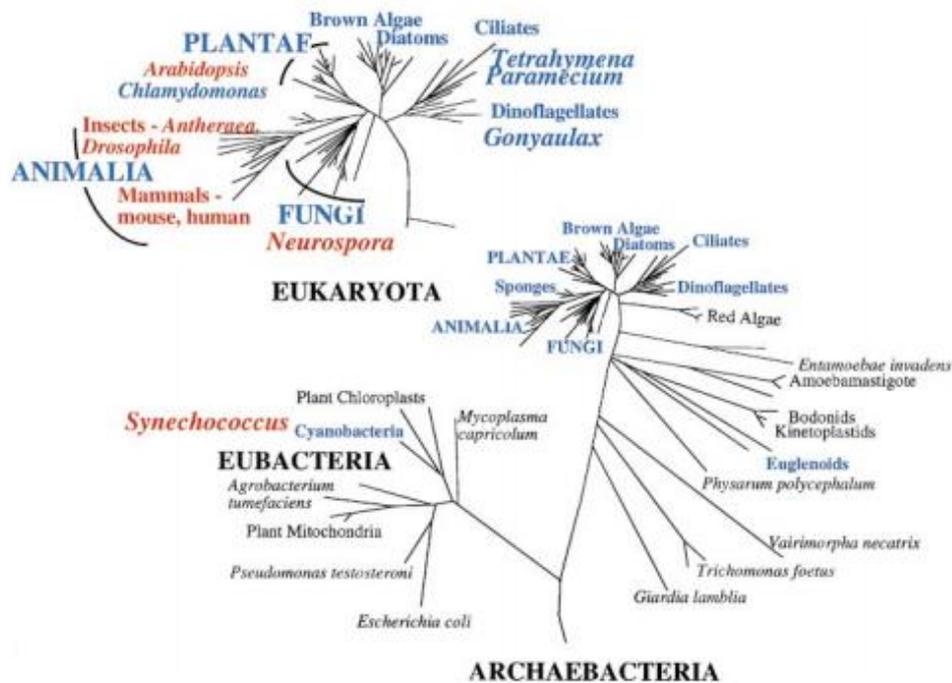
*“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”.*

Albert Einstein

### 1. O ritmo biológico: contexto histórico

As observações de ritmos na natureza e no homem são antigas, datando das descrições de Hipócrates (460-370 a.c.) e Galeno (130 - 200 d.c.) sobre a recorrência de alguns sinais e sintomas exibidos durante determinadas doenças. No entanto, somente em 1729 o ritmo biológico foi estudado cientificamente (Foster e Kreitzman, 2004). Jean Jacques d'Ortus Mairan (1678-1771), um astrônomo francês, observando uma planta, percebeu que suas folhas apresentavam movimentos periódicos, abriam-se durante o dia e dobravam-se à noite. Intrigado por esse comportamento, Mairan decidiu investigar se aquele fenômeno biológico era simplesmente uma resposta à luz do sol. Na tentativa de elucidar a questão, realizou um experimento no qual a planta permaneceria em um ambiente totalmente isolado, sem a informação do ambiente. Ele notou que as folhas, mesmo na condição de isolamento de luz, continuavam a exibir o movimento periódico, concluindo então que o ritmo diário de abertura-dobramento das folhas não requeria o ritmo diário da luz solar (Mairan, 1729). Este experimento marcou o início dos trabalhos experimentais com ritmos biológicos. Entretanto, o caráter endógeno do ritmo biológico só foi comprovado após os experimentos do botânico De Candolle com a mesma planta sensitiva, porém sob luz constante. De Candolle observou que a periodicidade continuava a existir mesmo sob iluminação constante, mas que o período do ritmo era menor que 24 horas.

Hoje é notório que ritmos biológicos são encontrados desde organismos mais primitivos até mamíferos, demonstrando a conspicuidade da expressão dessas oscilações (Figura 1).



**Figura 1. Sistemas Circadianos na Árvore Universal da Vida.** O comprimento das linhas corresponde à distância evolutiva entres os grupos, medida por taxas de mudanças em pequenas subunidades de genes rRNA. Os três maiores grupos de organismos - Archeobacteria, Eubacteria, e Eucariotos - divergem de um ancestral comum. Em azul são os grupos filogenéticos nos quais ritmos circadianos já foram descritos e/ou corresponde a sistemas circadianos experimentais bem estudados; em vermelho são dados os nomes e posições dos sistemas onde a genética e análise molecular do mecanismo do relógio teve progresso significativo (Dunlap, 1999).

## 2. Organização temporal

A vida surge como uma forma de movimentos permanentes, animais e plantas mudam conforme o clima, a hora do dia, as estações do ano, criando um cenário onde o ambiente está constantemente sujeito a alterações às quais os organismos respondem. Tais mudanças são consideradas como um aspecto essencial da organização dos seres vivos. A organização temporal interna devidamente sincronizada com o meio ambiente é fundamental para a manutenção da saúde e sobrevivência dos animais. O tempo como uma variável é frequentemente negligenciado quando se considera a interação entre o

organismo e o meio ambiente. No entanto, a vida na Terra está submetida a ciclos geofísicos que impõem um ciclo claro-escuro de 24 horas, sendo a adaptação temporal, ou seja o ajuste de sua fisiologia e comportamento aos sinais externos, fundamental para a sobrevivência das espécies (Golombek e Rosenstein, 2010). Os organismos teriam enfrentado a seleção natural em intervalos de oportunidade e adversidade que se repetem com frequências precisas e previsíveis, propiciando que aqueles portando um programa temporal inato responsável por oscilações circadianas fossem selecionados. Estas são responsáveis por orquestrar a fisiologia e o comportamento permitindo que os organismos se antecipem a mudanças ambientais diárias (Pittendrigh, 1993). Desta forma, os processos evolutivos teriam explorado esta previsibilidade e selecionado programas temporais inatos responsáveis pelas oscilações circadianas dos seres vivos (Pittendrigh, 1993).

Portanto, admitir o tempo como dimensão fundamental da organização dos seres vivos implica em reconhecer o caráter determinante que a organização temporal exerce sobre a viabilidade das espécies, e que essas manifestações de organização temporal definem o que conhecemos por ritmos biológicos (Cerejido, 1988; Pittendrigh, 1993).

Ritmos endógenos são encontrados em todos os animais estudados até o momento, demonstrando sua ubiquidade e evidenciando sua importância. Dentro desse ponto de vista, ritmos podem ser entendidos como a manifestação de um relógio biológico endógeno codificado geneticamente e que pode ser sincronizado com as diversas pistas ambientais, as quais se manifestam com periodicidade previsível (Menna-Barreto, 2003). Dentre estas pistas ambientais, o ciclo claro-escuro aparece como um importante agente de ajuste de oscilações endógenas que se manifestam em aproximadamente 24 horas.

Muitos dos conceitos fundamentais associados com a relação temporal entre organismos e ambiente foram originalmente apresentados pelo trabalho pioneiro e hipóteses fundamentais de Jürgen Aschoff e, principalmente, Colin Pittendrigh

(Pittendrigh, 1993; Daan, 2000). A existência de um relógio biológico faz um ritmo viável até mesmo na ausência de ciclos ambientais, numa situação de livre curso, assegurando, assim, que as funções internas apresentem a sua relação temporal em condições constantes. Por exemplo, o ciclo de atividade-reposo em seres humanos é mantido mesmo sob condições de isolamento e está atrelado à temperatura corporal (Aschoff, 1965).

Desde os primeiros relatos sobre a importância das pistas ambientais para a sincronização dos organismos, foi proposta a teoria de “fuga da luz” por Pittendrigh (1993), o qual sugeria que as altas temperaturas encontradas na fase clara do dia seriam nocivas para a estabilidade de enzimas e processos fisiológicos, assim como a radiação ultravioleta representaria uma ameaça para a estrutura de ácidos nucleicos dos seres vivos. Esta associação pode ter sido o resultado de uma co-evolução entre os sistemas de percepção luminosa (fotorreceptores) e os centros geradores de ritmos (osciladores endógenos) às mesmas pressões seletivas: os ciclos diários de temperatura e luminosidade.

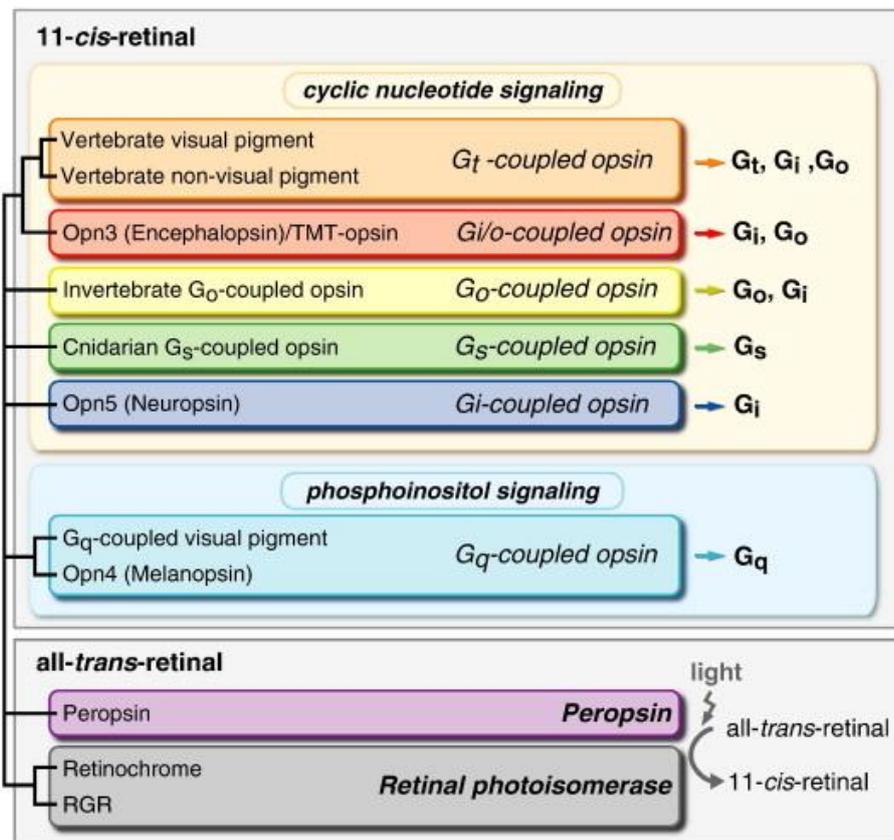
Um estudo recente utilizando *Drosophila melanogaster* aponta que o fotorreceptor rodopsina, classicamente presente na retina e associado à detecção de luz para formação de imagem, é responsável pela discriminação de temperatura neste animal, permitindo a escolha por ambientes onde a temperatura esteja dentro da zona de conforto térmico. Animais com mutação no gene que codifica a rodopsina perdem a capacidade da termodiscriminação e, curiosamente, a inserção da melanopsina, foto-pigmento de vertebrados responsável pelo ajuste do relógio central pela luz em mamíferos, foi capaz de restaurar este comportamento na *Drosophila* (Shen et al., 2011). Estes achados corroboram a hipótese da co-evolução dos sistemas de fotorrecepção/ termorrecepção e osciladores endógenos frente aos ciclos diários de temperatura e luminosidade proposta inicialmente por Pittendrigh (1965). (Para revisão Pittendrigh, 1993).

### 3. Detecção do sinal luminoso

A geração de ritmos biológicos é fundamental para a sobrevivência da maioria das espécies, pois propicia que os ajustes internos coincidam com a fase mais adequada do ciclo ambiental, permitindo aos animais a antecipação e sincronização dos eventos internos com os ciclos ambientais, fenômeno este conhecido como arrastamento. Contudo, a seleção dessa característica no curso da evolução não teria sido possível caso estes animais não possuíssem a capacidade de detectar variações ambientais. É dentro deste cenário que se destaca uma importante classe de moléculas, capaz de detectar estímulos luminosos e enviar esta informação para os centros processadores. Tais moléculas são conhecidas como fotopigmentos e possuem uma porção proteica - uma opsina - e uma porção não proteica - o cromóforo, substância responsável pela detecção do sinal luminoso (Van Der Horst e Hellingwerf, 2004). Uma mudança na conformação do cromóforo pela absorção do fóton promove uma alteração da proteína que garante a comunicação do processo e subsequente disparo de uma via de sinalização. As opsinas de eucariotos possuem sete domínios transmembrânicos, são acopladas a proteínas G e sensíveis à estimulação em diferentes comprimentos de onda. Podem ser distribuídas em oito famílias, sendo cada família correspondente a uma proteína G específica: (1) opsinas visuais de vertebrados, acopladas à proteína  $G_t$ , (2) encefalopsina/opsina *teleost multiple tissue* (tmt, OPN3) acoplada a proteína  $G_i/G_0$ , (3) melanopsina/OPN4, acoplada a proteína  $G_q$ , (4) opsina de invertebrados, acoplada a proteína  $G_0$ , (5) neuropsinas/OPN5, acopladas a  $G_i$ , (6) opsinas de cnidários, acopladas a proteína  $G_s$ , (7) peropsina, (8) retinal fotoisomerase, sendo as duas últimas famílias consideradas como fotoisomerases (Figura 2, Koyanagi e Terakita, 2014).

A família de pigmentos fotorreceptores que tem sido caracterizada mais detalhadamente é a família de opsinas visuais, a qual inclui a rodopsina. Dentre as diversas

possibilidades de funções das rodopsinas nas diferentes espécies animais (Koyanagi e Terakita, 2014), destaca-se a da rodopsina presente na retina dos vertebrados, responsável pela percepção de luz e formação de imagem (Terakita, 2005). Entretanto, outra classe de opsinas que vem ganhando muito destaque nos últimos anos é a família das opsinas acopladas a proteína  $G_q$ , a qual inclui a melanopsina, hoje bem estabelecida como fundamental para o ajuste do relógio biológico de mamíferos aos ciclos claro-escuro (Panda et al., 2002, 2003).



**Figura 2. Diversidade Funcional de Opsinas.** As opsinas de eucariotos são classificadas funcional e filogeneticamente em 8 famílias. Membros das 6 primeiras famílias ligam-se ao cromóforo 11-*cis*-retinal e formam fotopigmentos que ativam vias de sinalização em resposta a ativação de diferentes proteínas G, como mostrado no esquema acima. Duas diferentes vias são ativadas: envolvendo nucleotídeos cíclicos, por  $G_t$ ,  $G_i$ ,  $G_o$  e  $G_s$  e sinalização envolvendo fosfoinositídeos por opsina acoplada a proteína  $G_q$ . Membros dos grupos restantes, peropsina e

fotoisomerase retinal ligam *all-trans*-retinal como cromóforo e a luz promove a isomerização para *11-cis*-retinal (Koyanagi e Terakita, 2014).

Uma das características que distinguem as opsinas dos outros receptores acoplados a proteínas G é um resíduo de lisina na sétima alça, que é o local de ligação do cromóforo *11-cis*-retinal, um aldeído da vitamina A, pela base de Schiff. O cromóforo é estabilizado na opsina através dessa ligação, que possui pouca estabilidade, sendo necessária a presença de um contra-íon, neste caso o glutamato, que promove estabilidade da ligação. O retinal interage com fóton de luz absorvendo a energia e promovendo a isomerização do *11-cis*-retinal em *all-trans*-retinal, o que leva à mudança de conformação da opsina, ativação da proteína G e consequente desencadeamento da via de sinalização. Esses dois processos conferem estabilidade suficiente ao cromóforo, porém não são os únicos fatores que influenciam na sua estabilização. Todos os aminoácidos que cercam a região de ligação do cromóforo acabam influenciando essa estabilização e, quanto mais aminoácidos participarem da estabilização da ligação, mais energia será necessária para transformar o retinal de *11-cis* para *all-trans* (Terakita, 2005).

Inicialmente as células fotorreceptoras eram classificadas em duas diferentes famílias, fotorreceptores de invertebrados ou rabdoméricos e fotorreceptores de vertebrados ou ciliares. Essa classificação era baseada nas diferenças entre as vias de sinalização, a morfologia e a especialização das células fotorreceptoras (Koyanagi e Terakita, 2014). Uma dessas diferenças estava na forma de re-isomerização do retinal (regeneração do cromóforo). Nos vertebrados, a transformação de *11-cis*-retinal em *all-trans*-retinal leva ao desacoplamento dessa molécula da porção proteica, sendo considerada, portanto monoestável. Já em opsinas de invertebrados, o cromóforo permanece ligado à proteína, mesmo após a isomerização, sendo considerado biestável.

Esse conceito de mono- e biestabilidade também fortalecia essa abordagem. Recentemente essa classificação foi alterada, uma vez que fotorreceptores rabdoméricos foram encontrados em vertebrados e fotorreceptores ciliares em invertebrados (Provencio et al., 1998; Arendt et al., 2003; Isoldi et al., 2005) e que algumas opsinas de vertebrados, como por exemplo as melanopsinas, foco deste trabalho, apresentam as duas formas de estabilidade do cromóforo em teleósteos (Davies et al., 2011).

#### **4. Melanopsina: histórico**

Em 1998, foi descoberta uma nova opsina em melanóforos de *Xenopus laevis*, denominada melanopsina (*Opn4*, Provencio et al., 1998), que foi posteriormente identificada na retina de *Xenopus* e de todas as classes de vertebrados estudadas até o momento (Bellingham et al., 2006, Davies et al., 2010). Vertebrados não mamíferos apresentam diferentes tipos de opsinas não visuais que estão presentes não apenas na retina, mas também em órgãos pineais intracraniais e até mesmo em fotorreceptores localizados no cérebro, sendo essas as responsáveis pela sincronização do organismo com a luz ambiente (Golombek e Aguilar-Roblero, 2003).

Em contraste, os mamíferos dependem exclusivamente de fotorreceptores presentes na retina para realizar tal sincronização (Foster, 1998). Estudos realizados com camundongos *knockout* para cones e bastonetes (*rdrd*) demonstraram que esses animais ainda eram capazes de exibir comportamentos relacionados à sincronização com ciclos ambientais claro-escuro mesmo na ausência dessas células fotorreceptoras, enquanto a enucleação bilateral levava à perda da ritmicidade locomotora, sugerindo assim a presença de um terceiro fotorreceptor presente na retina de mamíferos (Freedman et al., 1999). Outra evidência que suportava essa ideia era o fato de pessoas cegas ainda serem capazes de

ajustar seus ritmos ao ciclo claro-escuro (Milies et al., 1977; Orth et al., 1979; Czeisler et al., 1995; Sack et al., 2000).

Experimentos clássicos (Stephan e Zucker, 1972; Ralph et al., 1990) demonstraram que o relógio biológico central de mamíferos é constituído por dois núcleos hipotalâmicos chamados supraquiasmáticos (NSQ), cuja fisiologia detalharemos adiante. Através da marcação radioativa retrógrada das células do núcleo supraquiasmático de camundongos, foi possível a identificação de uma subpopulação de células presente na retina, chamadas de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs) (Berson et al., 2002). Em paralelo a este estudo, Provencio e colaboradores indicaram a melanopsina presente nessa mesma população de células ganglionares como a possível molécula responsável pelo ajuste dos ritmos aos ciclos ambientais (Provencio et al., 2002).

A partir de então, diversos grupos iniciaram a busca pela resposta de qual seria de fato o fotopigmento envolvido na sincronização dos relógios biológicos. Um dos estudos pioneiros nesta busca utilizou camundongos *knockout* para melanopsina mantidos em escuro constante e estimulados por um pulso de luz azul por 15 minutos. Estes animais apresentaram avanço de fase nos ritmos locomotores, entretanto este efeito foi mais pronunciado em animais que expressavam melanopsina (Panda et al., 2002). No mesmo ano, outro grupo de pesquisadores utilizou uma abordagem similar e demonstrou que um pulso de luz promove tanto um avanço de fase nos ritmos locomotores quanto um aumento no período circadiano desses animais. Ainda, um pulso de luz aplicado na fase escura do ciclo claro-escuro promoveu uma indução de *c-fos* em camundongos selvagem e *knockout* para melanopsina, entretanto a magnitude dessa resposta foi 40% menor em animais *knockout* (Ruby et al., 2002). Posterior a esses achados, Panda e colaboradores (2003), utilizando camundongos *knockout* para *Opn4* combinados com homocigotos *rdrd*,

demonstraram que a melanopsina é essencial para sincronizar o oscilador circadiano central destes animais.

A expressão da melanopsina na retina e em tecidos não retinianos sugeria um papel desta opsina na visão e na fotorrecepção não visual, assim como no controle fótico da pigmentação da pele de anfíbios, abertura pupilar e fisiologia circadiana de mamíferos. Com a descoberta da melanopsina abriu-se uma nova perspectiva no estudo das opsinas e de sua função na percepção luminosa.

Estudos filogenéticos apontam que a melanopsina apresenta somente 27% de semelhança na sequência de aminoácidos dos domínios transmembrânicos com opsinas visuais de vertebrados, e segrega junto com opsinas de invertebrados quando submetida à análise cladística (Bellingham e Foster, 2002). Segundo estes autores, membros de uma mesma família de opsinas apresentam 85% de semelhança em sua sequência de aminoácidos, sendo assim, o fato da sequência de aminoácidos dos domínios transmembrânicos da melanopsina de camundongo ser apenas 58% idêntica à sequência de *Xenopus*, e a de *Danio rerio* 68% idêntica à de camundongo e 56% idêntica à de *Xenopus*, levou ao desenvolvimento de novas estratégias experimentais a fim de esclarecer essa questão.

Levando em consideração essas informações estruturais da melanopsina, Bellingham e colaboradores levantaram a hipótese de haver mais de um gene para essa opsina nas diferentes classes de vertebrados. Em 2006, foram identificados novos genes de melanopsina em *Gallus gallus*, *Danio rerio* e *Xenopus laevis*. Essas sequências revelaram a existência de dois genes de melanopsina bastante distintos em diversos vertebrados não mamíferos. Um desses genes, chamado de *Opn4m* (*mammalian-like*), representa o verdadeiro ortólogo da melanopsina de mamíferos. A sequência originalmente encontrada em *Xenopus laevis* e hoje sabidamente existente nos vertebrados não mamíferos é, na

verdade, representante de um gene diferente, que foi denominado *Opn4x* (*Xenopus-like*). Posterior a esses achados, confirmamos em nosso laboratório que tanto *Opn4x*, quanto *Opn4m* são expressos em melanóforos dérmicos de *X. laevis* (Bluhm et al., 2012, Moraes et al., 2014a, b).

Curiosamente, esse gene *Opn4x* foi perdido no genoma dos mamíferos. Análise genômica da sequência de *Opn4x* de galinhas com o locus *Opn4* de mamíferos não conseguiu identificar o gene *Opn4x* em nenhum membro dessa classe. Para investigar essa aparente falta de um ortólogo *Opn4x* em mamíferos, Bellingham e colaboradores (2006) decidiram determinar uma detalhada localização genômica para *Opn4x* em galinhas para comparar com regiões homólogas do genoma humano. As análises revelaram diversas regiões que são homólogas com porções do cromossomo 4 de galinhas adjacente ao locus da *Opn4x*, no entanto, sua ordem foi alterada, indicando um significativo rearranjo intracromossômico nesta região. Estes dados sugerem que o locus ancestral *Opn4x* dos mamíferos tenha sido apagado durante essa reorganização cromossômica.

Recentemente foi demonstrado que, diferentemente de outras espécies de vertebrados não mamíferos estudadas até o momento, o teleósteo *Danio rerio* expressa 5 melanopsinas, *Opn4m1*, *Opn4m2*, *Opn4m3*, *Opn4x1* e *Opn4x2*. Todos os cinco genes são expressos na retina do animal adulto sendo *Opn4m3* a mais abundante e *Opn4m1* a opsina menos expressa (Davies et al., 2011). Em adição a esses achados, nosso laboratório demonstrou a presença dos cinco genes da melanopsina na linhagem de células embrionárias de *Danio*, ZEM-2S (Ramos et al., 2014); entretanto a opsina mais expressa neste modelo foi *Opn4m1*, seguida de *Opn4m2*.

Apesar de elucidada a questão das variações interespecíficas da melanopsina, ainda se faz necessário um estudo mais detalhado sobre sua funcionalidade, para que então possa

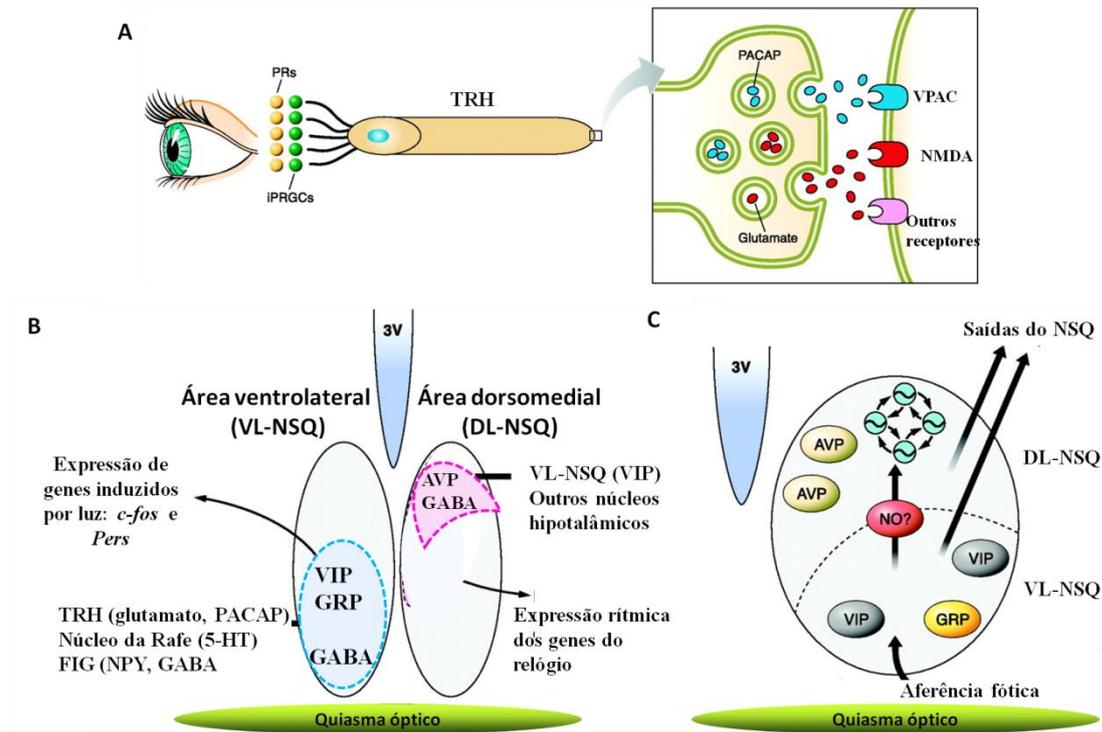
ser esclarecida a aparente redundância da existência de duas ou mais melanopsinas em vertebrados não mamíferos.

### **5. O relógio biológico central de mamíferos**

Nesta seção, daremos uma descrição resumida da anatomia e fisiologia do relógio central de mamíferos, já que é deste que se tem um conhecimento mais profundo.

A luz visível do sol ou de fontes artificiais, em particular o espectro azul (480 nm), fornece estímulo específico para as ipRGCs - células ganglionares fotossensíveis - na retina e, assim, faz a mediação da informação temporal sobre o dia e a noite para o relógio mestre que, como já mencionado, situa-se no núcleo supraquiasmático (NSQ) de mamíferos. Com esta informação, o NSQ ajusta seu ritmo ao ciclo claro-escuro ambiental, sincronizando o restante do organismo ao mesmo (Golombek e Rosenstein, 2010). A principal aferência para o NSQ vem da retina através do trato retino-hipotalâmico (TRH), cuja importância no arrastamento circadiano foi demonstrada a partir de experimentos clássicos de lesão (Johnson et al., 1988).

A comunicação da retina com o NSQ feita pelo TRH, uma via monossináptica, utiliza o sinal de glutamato, bem como do peptídeo hipofisário ativador de adenilil ciclase (PACAP, Ebling, 1996; Hannibal, 2002; Chen et al., 1999; Figura 3). Evidências apontam para o glutamato como o principal sinal fótico para ajustar o relógio circadiano, uma vez que (1) este é liberado mediante a estimulação elétrica do TRH; (2) diferentes receptores glutamatérgicos foram encontrados no NSQ, incluindo receptores ionotrópicos NMDA, AMPA, e metabotrópicos; e (3) algumas subunidades do receptor de NMDA no NSQ exibem alterações circadianas (Meijer et al., 1988; Mikkelsen et al., 1993; Eling, 1996).



**Figura 3. Representação Esquemática da Entrada Fóptica pela Retina até os Núcleos Supraquiasmáticos.** (A) A luz é percebida pela retina via melanopsina presente nas células ganglionares e essa informação enviada através do trato retino-hipotalâmico aos núcleos supraquiasmáticos. (B) Subdivisão do NSQ em áreas ventrolateral e dorsomedial. Na área VL-NSQ neurônios que expressam genes do relógio em resposta a luz são diretamente inervados pelo trato retino-hipotalâmico (TRH), aferências do núcleo da rafe e do folheto intergeniculado. À direita no esquema, a área DM-NSQ que é composta por neurônios que sintetizam os neurotransmissores arginina-vasopressina (AVP) e GABA. Esta região expressa os genes de relógio de maneira rítmica e recebe inervação da área VL-NSQ e de outras áreas hipotalâmicas. 3V, terceiro ventrículo. (C) Acoplamento entre as regiões ventrolateral e dorsomedial do NSQ. Neurônios da área ventrolateral transmitem a informação fóptica para a parte dorsal do núcleo possivelmente através do óxido nítrico (NO). Adaptado de Golombek e Rosenstein, 2010.

As células do núcleo ventrolateral são inervadas pelo TRH e expressam vários genes, como *c-fos* e os genes do relógio *Per1* e *Per2* em resposta à estimulação fóptica (Yan et al, 1999; Hamada, et al., 2004), ao passo que a região DM-NSQ mostra uma oscilação circadiana da expressão destes genes. *Per1* e *Per2* são regulados diferencialmente nas áreas ventrolateral e dorsomedial (Yan et al, 1999). A porção dorsomedial não possui

comunicação com o TRH, mas muitos de seus neurônios que expressam AVP são intrinsecamente rítmicos (Yan et al., 1999). Outros mecanismos de sincronização intra-NSQ incluem os neurotransmissores NO e GABA (Liu e Reppert, 2000; Golombek e Rosenstein, 2010) que podem retransmitir as informações de ajuste de fase da região dorsal do NSQ (Figura 3 C). Além do seu papel como um mensageiro intracelular, o NO também atua na transmissão da informação fótica por difusão dentro do NSQ como um mensageiro extracelular, uma vez que facilmente pode se difundir entre as células. Desta forma, ele também pode atuar como um sinal extracelular rápido e específico para o acoplamento de osciladores neuronais individuais no NSQ. Estudos utilizando sequestrador de NO sugerem que a sinalização extracelular deste neurotransmissor é necessária para o arrastamento circadiano por luz (Plano et al., 2007).

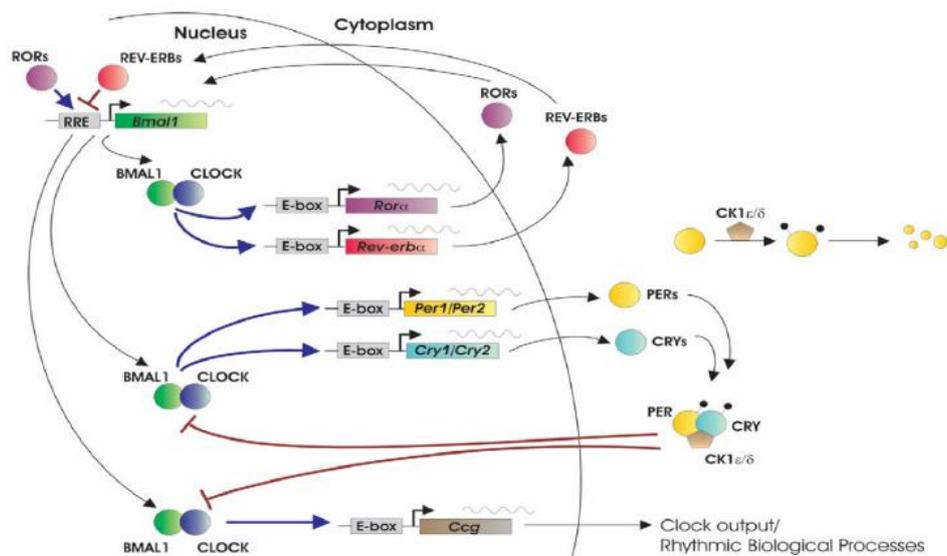
### **6. Maquinaria molecular do relógio**

A organização circadiana é fornecida em nível celular por um relógio molecular, que é um oscilador baseado na transcrição e tradução de macromoléculas formadas por genes e proteínas do relógio e por genes controlados pelo relógio, *clock controlled genes* (CCGs) que estão presente no sistema nervoso central e também em tecidos periféricos (Albrecht e Eichele, 2003; Buhr e Takahashi, 2013; Zhang et al., 2014).

O funcionamento do relógio circadiano envolve mecanismos de retroalimentação positiva e negativa (Yamazaki et al., 2000; Reppert e Weaver, 2002). De acordo com o modelo clássico de regulação dos ritmos, a maquinaria molecular é composta por quatro genes/proteínas e seus parálogos: *Clock* (*Npas2*), *Bmal1* (*brain and muscle Arnt-like protein 1*), *Period* (*Per1*, 2, e 3), *Cryptochrome* (*Cry1* e 2), os quais promovem em conjunto a geração do ritmo endógeno. Nos mamíferos, as proteínas dos genes *Clock* e *Bmal1*, que possuem um domínio *basic helix loop helix* (bHLH), formam um heterodímero

e funcionam como fator de transcrição para a ativação de genes que possuem a sequência E-box na sua região promotora, em particular os genes *Per* e *Cry* (Figura 4) (Albrecht e Eichele, 2003).

As proteínas PER e CRY formam oligômeros com uma caseína quinase (CK)1ε e CK 1δ que, após serem fosforilados, são transportados do citoplasma para o núcleo. Uma vez no núcleo, o dímero PER/CRY bloqueia a transcrição de seus respectivos genes ao interagir com CLOCK/BMAL1 inibindo sua ação (Young e Kay, 2001; Okamura et al., 2002; Albrecht e Eichele, 2003). Como consequência, os níveis de RNAm e de proteína de PER e CRY vão decrescendo até o ponto em que se tornam insuficientes para reprimir a atividade de CLOCK/BMAL1, reiniciando um novo ciclo (Yoo et al., 2005). Embora a inibição de CLOCK/BMAL1 não seja um evento bem compreendido, dados da literatura indicam que CRY poderia atuar como um repressor através da ligação primária a CLOCK/BMAL1, enquanto que a ação de PER só é exercida na presença de CRY, o qual promove o deslocamento do heterodímero da região E-box do promotor (Ye et al., 2014).



**Figura 4. Funcionamento da Maquinaria Molecular do Relógio.** CLOCK/BMAL1 se dimerizam no citoplasma formando um complexo proteico que irá ser translocado ao núcleo e

controlar a transcrição de genes alvo através da ligação à sequência E-box presente no promotor destes genes (Ko e Takahashi, 2006).

Além do controle da transcrição de *Per* e *Cry*, CLOCK/BMAL1 inicia outra alça de *feedback*, ativando a transcrição de *Rev-erba* e *Rora*, cujas proteínas competem entre si pela ligação ao elemento responsivo ao ROR (ROREs) presente no promotor de *Bmal1*, onde terão ações antagônicas: ROR ativa a transcrição de *Bmal1* enquanto que REV-ERB a inibe (Ko e Takahashi, 2006). As proteínas REV-ERB  $\alpha$  aumentam com a indução da transcrição de *Clock/Bmal1* e vão para o núcleo, ligando-se ao promotor de *Bmal1* reprimindo-o. Quando a proteína REV-ERB 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 (Reppert e Weaver, 2001; Albrecht e Eichele, 2003). O acúmulo de proteínas PER e CRY se mantém em antifase com a transcrição de *Rev-Erba* (Gachon et al., 2004). Todos esses ciclos em conjunto levam cerca de 24 h para se completarem e a variação das concentrações dessas diferentes proteínas ao longo do dia constitui a base molecular do relógio biológico.

Modificações pós-traducionais, como a atividade de fosforilação de caseínas quinase (CK I  $\epsilon$  e  $\delta$ ), também são essenciais para a regulação rítmica desses diferentes fatores, propiciando estabilidade e translocação nuclear adequadas. Sua relevância foi demonstrada em organismos mutantes que não expressavam essas quinases e apresentavam fenótipos com ritmos circadianos alterados (Gachon et al., 2004).

Como a informação rítmica se propaga do oscilador central para o restante do organismo? Essa comunicação é feita pelo controle da produção e/ou liberação de neuropeptídeos, neurotransmissores, hormônios, fatores de transcrição, moléculas de sinalização intracelular, dentre outros, que irão regular a atividade dos neurônios dos NSQs que, por sua vez, sincronizam o restante do organismo através de inervações diretas sobre o



## 7. Relógios periféricos

Nos anos 90, os estudos da expressão dos genes do relógio trouxeram para a comunidade científica um resultado inesperado. Diferentes grupos observaram em tecidos periféricos a transcrição de genes do relógio, os quais exibiam um perfil cíclico (Balsalobre et al., 1998; Zylka et al., 1998). Estes trabalhos mostraram pela primeira vez a expressão desses genes fora do núcleo supraquiasmático. Trabalhos pioneiros demonstraram que fibroblastos tratados por altas concentrações (choque) de soro fetal bovino apresentavam ritmos robustos de expressão dos genes do relógio (Balsalobre et al., 1998) e que, em cultura de órgãos de ratos transgênicos tendo o gene da luciferase incorporado na região promotora do gene *Per1* (*Per1:Luc*), a expressão deste gene se mostrava rítmica (Yamazaki et al., 2000). Em adição a esses achados, Yagita e colaboradores (2001) mostraram, também por registros de bioluminescência, que cultura de fibroblastos apresentavam oscilações auto-sustentadas e osciladores autônomos em cada célula, semelhante ao observado em NSQ. Elegantes estudos de dois diferentes grupos propuseram que o NSQ seria o responsável por sincronizar as populações celulares dos tecidos periféricos e assim manter as células em fase (Sakamoto et al., 1998; Guo et al., 2006).

Através do estudo com ratos transgênicos *Per1:Luc* Yamazaki e colaboradores (2000) demonstraram que fatias de NSQ apresentavam ritmo constante de expressão de *Per1*, enquanto explantes derivados do pulmão e fígado rapidamente perdiam suas oscilações, indicando que a via de comunicação do relógio central com os relógios periféricos poderia ser importante para a manutenção dos ritmos periféricos. A perda gradual da oscilação dos relógios periféricos na ausência de sinais do NSQ sugere que o ajuste de fase dos osciladores periféricos seja diariamente controlado pelo marcapasso central. A partir desses achados acreditava-se que este conceito de controle rítmico do

oscilador central sobre os periféricos era baseado em relações de subordinação, onde o relógio central possuiria dominância sobre os periféricos (Ripperger e Schibler, 2001; Carr e Whitmore, 2005). 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) e hoje esse conceito foi reestruturado levando-se em consideração uma maior integração dos sistemas periféricos e central para a geração de uma resposta rítmica homeostática. Outra importante evidência que corrobora essa ideia é a forte conexão do sistema endócrino com o sistema circadiano. Tem sido, desde há muito tempo, reconhecido que a liberação de muitos hormônios apresenta variação ao longo de 24 horas (Andrews e Folk, 1964) e, recentemente, avanços na biologia molecular e medicina demonstraram que a comunicação do sistema circadiano e endócrino não é apenas unidirecional, mas sim bidirecional, incluindo uma retroalimentação endócrina sobre a função do relógio central (Tsang et al., 2013).

Ciclos de alimentação são considerados *zeitgebers* dominantes para vários órgãos de mamíferos, incluindo rim, pâncreas e músculo cardíaco (Damiola et al., 2000), entretanto os resultados mais pronunciados de arrastamento alimentar foram observados no fígado (Hara et al., 2001; Stokkan et al., 2001).

Em paralelo aos estudos realizados com mamíferos, muitos grupos vêm buscando entender a sincronização de tecidos periféricos em animais que percebem luz fora da retina. Estudos utilizando *Drosophila* e *Danio rerio Per:Luc* mostraram que existem osciladores periféricos independentes em diferentes tecidos desses organismos (Plautz et al., 1997; Carr e Whitmore, 2005). A partir destes estudos, diversos outros laboratórios demonstraram a independência dos osciladores periféricos, os quais provavelmente devem conter elementos sincronizadores próprios.

Foi demonstrada no peixe *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish*, a expressão de seis genes *Crys*, *cry1a*, *1b*, *2a*, *2b*, *3* e *4*, e quatro genes *Pers*, *per1a*, *1b*, *2* e *3*. Todos esses genes exibem padrão cíclico de expressão em ciclo claro-escuro, o qual persiste em escuro constante, exceto *Per2* (Cahill, 2002). Entretanto somente *Per2* e *Cry1a* são conhecidos por serem induzidos por luz (Vatine et al., 2011), e parecem ter um papel crítico no *reset* do relógio circadiano.

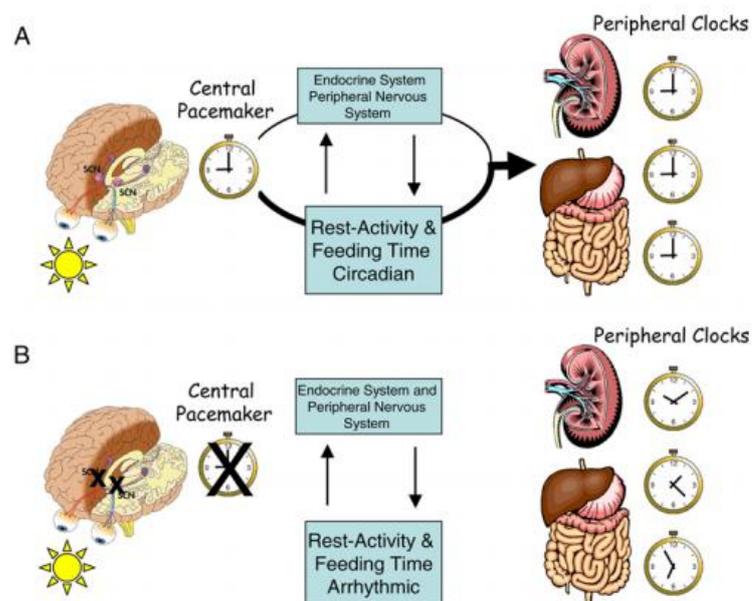
Estudos em linhagens celulares e tecidos fotossensíveis de *Danio rerio* revelaram que estímulos luminosos são capazes de regular a transcrição de genes de relógio de forma fase-dependente (Whitmore et al., 1998; Vallone et al., 2004; Carr e Whitmore, 2005; Tamai et al., 2005; Ramos et al., 2014). Nestes estudos, os autores sugerem diferentes fotorreceptores como responsáveis por este efeito biológico, tais como criptocromos (Tamai et al., 2007), TMT (Moutsaki et al., 2003; Cavallari et al., 2011) e melanopsinas (Cavallari et al., 2011; Ramos et al., 2014).

Estudos de nosso laboratório revelaram que células da linhagem embrionária ZEM-2S de *Danio rerio* expressam 5 melanopsinas *Opn4* e quando submetidas a ciclo claro-escuro (12:12 CE), essas células apresentam ritmos circadianos robustos na expressão de *Per1* e *Cry1b*, indicando que a presença de um fotorreceptor é capaz de sincronizar a expressão de genes de relógio neste modelo celular em resposta a luz (Farhat et al., 2009).

Fotorreceptores, cones e bastonetes, de *Xenopus laevis* possuem um relógio circadiano bem estudado que controla a síntese e liberação de melatonina (Cassone, 1998). Análise da expressão dos genes do relógio na retina de *X. laevis in vivo* mostrou que *Per1* e *Per2* são ritmicamente expressos em ciclo claro-escuro e que entre todos os criptocromos expressos, somente *Cry1* apresenta robusto ritmo nessas condições (Zhu e Green, 2001). Demonstramos, em melanóforos de *X. laevis*, que a exposição da cultura a 12:12 CE induziu ritmicidade na expressão de *Opn4x* (Moraes et al., 2014a).

Também em células da retina de embrião de galinha mantidas em 12:12 CE foi observado um padrão rítmico de transcrição para *Clock*, *Per2*, *Opn4m*, *N-Acetiltransferase* e *Tirosina Hidroxilase* (Lima et al., 2011).

Se compararmos osciladores centrais e periféricos, é notório que ambos apresentam características praticamente idênticas no que se refere ao mecanismo molecular de controle dos ritmos, exceto pela diferença de comportamento quando são colocados em cultura. Osciladores centrais em cultura mantêm a expressão rítmica dos genes do relógio, enquanto que osciladores periféricos não são capazes de sustentar esse ritmo por muitos dias, perdendo gradualmente sua oscilação (Yamasaki et al., 2000). *In vivo*, o oscilador central atua promovendo o acoplamento dos relógios periféricos e assim garantindo a homeostase do organismo. Na ausência do oscilador central, os relógios periféricos passam a manifestar seu ritmo endógeno, onde cada órgão, tecido e célula assume seu próprio período (Figura 6) (Gachon et al., 2004).



**Figura 6. Sincronização do Sistema Circadiano em Mamíferos.** (A) Arrastamento fóico do relógio central, que promove um sinal de acoplamento sobre os inúmeros osciladores periféricos. (B) Após lesão do NSQ, os relógios periféricos continuam oscilando, mas as fases não são mais

ajustadas entre si, e os animais passam a apresentar comportamentos arrítmicos (Gachon et al., 2004).

Postulou-se, então, que osciladores periféricos de mamíferos dependem de sinais sincronizadores neurais ou humorais do oscilador central no NSQ para manter a homeostase do organismo (Yamazaki *et al.*, 2000), ao contrário do que ocorre em organismos com tecidos periféricos fotossensíveis, capazes de se sincronizarem com o ciclo claro-escuro até mesmo quando isolados (Whitmore et al., 2000). Entretanto, é importante destacar que outros fatores abióticos podem atuar como sincronizadores nas diferentes espécies e nos vários tipos celulares (Balsalobre et al., 1998; 2000; Akashi e Nishida, 2000; Yagita e Okamura, 2000; Yagita et al., 2001) dentre eles a temperatura, que vem ganhando grande destaque na comunidade científica por ser um importante agente arrastador dos ritmos biológicos (Buhr et al., 2010).

### **8. Endotelinas**

Vertebrados ectotérmicos apresentam células pigmentares, os cromatóforos, responsáveis pelo ajuste da cor do animal graças à migração rápida de pigmentos, permitindo que estes animais possam se confundir com o ambiente. Essa rápida migração de pigmentos está sob controle de sistemas neurais e/ou hormonais (Bagnara e Hadley, 1973). Diversos hormônios e neurotransmissores estão envolvidos nesta modulação, tais como  $\alpha$ -MSH (hormônio estimulante de melanócitos) produzido na *pars intermedia* da glândula hipófise ou pela própria pele, MCH (hormônio concentrador de melanina) produzido por neurônios hipotalâmicos do núcleo *lateralis tuberis*, melatonina, a principal indolamina produzida pela glândula pineal, catecolaminas do sistema nervoso simpático e medula adrenal, prolactina sintetizada na *pars distalis* de vertebrados e, em aves, na *pars*

*tuberalis* da hipófise, e endotelinas (ETs), produzidas pelas células endoteliais e pelos queratinócitos (Bagnara e Hadley, 1973; Fujii et al., 1993; Filadelfi et al., 1996; 2002; 2004; Fujita e Fujii, 1997; Camargo et al., 1999).

Endotelinas (ET) são potentes peptídeos vasoconstritores, inicialmente isolados e identificados em cultura de células endoteliais de aorta porcina, sendo constituídos por 21 aminoácidos (Yanagisawa et al., 1988). São encontrados três genes humanos distintos, endotelina-1 (ET-1) clássica, endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3) (Bloch et al., 1989, Yanagisawa e Masaki, 1989). Dadas as diferenças estruturais e farmacológicas das três isoformas de endotelina humana, levantou-se a hipótese de que estes peptídeos desempenhassem papéis fisiológicos distintos, possivelmente por interagirem com diferentes subtipos de receptores para endotelina (Inoue et al., 1989).

De fato, três subtipos de receptores para ETs foram identificados na década de 90, apresentando as seguintes ordens de afinidade:  $ET_A$ ,  $ET-1 \geq ET-2 > ET-3$  (Arai et al., 1990),  $ET_B$ ,  $ET-1 = ET-2 = ET-3$  (Sakurai et al., 1990) e  $ET_C$ ,  $ET-3 > ET-1 = ET-2$  (Karne et al., 1993).  $ET_A$  e  $ET_B$  foram clonados a partir de material genético de mamíferos (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990), enquanto que  $ET_C$  foi caracterizado em melanóforos de *Xenopus laevis* (Karne et al., 1993). Todos os receptores para endotelinas apresentam sete alças transmembrânicas, e pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1992; Karne et al., 1993).

Inicialmente, acreditava-se que apenas as células endoteliais vasculares produzissem endotelina, no entanto atualmente sabe-se que ETs, em geral, podem ser sintetizadas por diversos outros tecidos (Rubanyi e Polokoff, 1994) e que tanto aqueles, como outros tecidos, expressam diferentes receptores de ETs, propiciando a ativação das mais diversas vias de sinalização intracelular. Os receptores de ET mais amplamente estudados são os  $ET_A$ , os quais apresentam maior afinidade pela endotelina-1. Para estes receptores têm sido

descritas, na literatura, diversas vias de sinalização intracelular, tais como da fosfolipase C (PLC) (Sokolovsky, 1991), da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Aramori e Nakanishi, 1992), da produção de AMPc (Sokolovsky et al., 1994) e de GMPc (Sharaga-Levine e Sokolovsky, 1996), do aumento nos níveis de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) citosólico (Koizumi et al., 1994), e da cascata de sinalização por proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Kasuya et al., 1994).

Em várias espécies de peixes teleósteos, as ETs induzem a agregação pigmentar em melanóforos (Fujii et al., 1993; Hayashi et al., 1996; Ramanzini et al., 2006) através da ativação de PLC e consequente aumento de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP<sub>3</sub>), elevação da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> e ativação de uma proteína quinase C dependente de cálcio (Fujii et al., 1993; Hayashi et al., 1996; Murata e Fujii, 2000). Em células GEM-81 de eritroforoma do teleósteo *Carassius auratus*, que expressam rodopsina e receptor para endotelina subtipo ET<sub>A</sub>, foi demonstrado que SRTX S6c, análogo de ET, modula os níveis de RNAm para rodopsina de forma tempo- e dose dependente. Essa modulação envolve a ativação de uma PKC e da via das MAPKs (Lopes et al., 2010).

Em anfíbios, ET-1, 2 e 3 atuam promovendo o escurecimento da pele em *Rana catesbeiana* e *Bufo ictericus* (Filadelfi et al., 1996), entretanto ET-3 é a mais potente em promover esta resposta. De fato, o receptor ET<sub>C</sub>, clonado em *Xenopus laevis*, é ativado preferencialmente por ET-3, a qual desencadeia escurecimento ou dispersão de grânulos de melanina (melanossomos) dependente da dose (Karne et al., 1993; Camargo et al., 1999; Fujii, 2000).

Na epiderme humana, os melanossomos melanizados são transferidos dos melanócitos para os queratinócitos vizinhos que, por sua vez, sintetizam e secretam ET-1, a qual atua sobre os melanócitos de maneira parácrina (Imokawa et al., 1986; 1992). A radiação UV estimula os melanócitos via secreção de endotelina a qual atua como agente

mitogênico e melanogênico nos próprios melanócitos (Yada et al., 1991; Imokawa et al., 1992; 1995).

Além do papel da endotelina sobre sistemas pigmentares, tem sido estudado o seu efeito sobre a sincronização/indução da transcrição de genes do relógio (Yagita e Okamura, 2000; Takashima et al., 2006; Farhat et al., 2009). Como dito anteriormente, endotelina-3 promove dispersão de grânulos de melanina em melanóforos de *Xenopus laevis* (Karne et al., 1993), efeito similar ao da luz. No entanto, apesar de em células embrionárias ZEM-2S do peixe *Danio rerio*, a luz ser também um importante sinalizador que sincroniza a expressão de genes do relógio (Farhat et al., 2009), endotelina não atua como sincronizador neste tipo celular. Em contraste, em fibroblastos de mamíferos tem sido descrito que endotelina rapidamente induz a transcrição de *Per2* (Yagita e Okamura, 2000) através da mobilização de cálcio intracelular (Takashima et al., 2006).

No mesmo estudo com células embrionárias ZEM-2S em cultura, foi observado um efeito dose-dependente da endotelina sobre a expressão de *Opn4m2*. O tratamento com endotelina-1  $10^{-10}$  e  $10^{-11}$  M promoveu forte ativação da transcrição, enquanto que em maiores concentrações ( $10^{-8}$  e  $10^{-9}$  M) houve inibição da expressão de *Opn4m2* na maioria dos tempos analisados (Farhat et al., 2009).

Estes estudos em conjunto levantam a hipótese de que, em modelos animais onde esteja presente alguma opsina, a informação de luz e hormônio, neste caso endotelina, poderiam exercer funções diferentes no controle da maquinaria molecular dos genes do relógio.

### 9. Modelo de estudo: melanóforos de *Xenopus laevis*

Os melanóforos embrionários de *Xenopus laevis* vêm sendo amplamente utilizados em estudos sobre farmacologia hormonal, citoesqueleto e migração de pigmentos, vias de sinalização celular (Salim e Ali, 2011) entre outros. Entretanto, nenhum dos autores tem considerado o papel dos genes do relógio nesses diferentes processos fisiológicos. É importante destacar ainda que os melanóforos de *Xenopus* apresentam a capacidade de rapidamente responderem a luz com translocação de seus grânulos de melanina pelo citoplasma (Rollag, 1993). Essa habilidade de migração dos grânulos de melanina é também desencadeada por uma série de hormônios, e é facilmente observável em células pigmentares de vertebrados ectotérmicos, o que os torna uma ferramenta útil para estudar os principais eventos envolvendo a expressão de genes específicos e suas funções.

Durante estágios embrionários ou larvais de peixes e anfíbios, momento em que os cromatóforos apresentam independência do sistema nervoso e/ou endócrino, pode ocorrer resposta direta à luz (Ohta, 1983, Miyashita et al., 1996; Moriya et al., 1996). Com o desenvolvimento ontogenético, essa resposta torna-se dependente do controle neural e/ou endócrino e só reaparece, na maioria dos casos, se os cromatóforos forem desnervados ou colocados em cultura primária (Fujii, 2000). De fato os melanóforos embrionários de *Xenopus*, modelo utilizado nesta tese, apresentam respostas diretas a estimulação por luz (Rollag, 1993), fenômeno este que, como já mencionado, envolve a participação da melanopsina (Isoldi et al., 2005). Posteriormente foi identificada a presença da maquinaria molecular dos genes do relógio neste modelo, colocando-o como um possível candidato a relógio periférico (Bluhm et al., 2012; Moraes et al., 2014b).

Assim, estudos utilizando o modelo de melanóforo de *Xenopus* vêm trazendo importantes contribuições na compreensão da fisiologia da pigmentação (Isoldi et al., 2010; Moraes et al., 2014a,b). Em 2005, nosso grupo em colaboração com I. Provencio

(Isoldi et al., 2005) demonstrou pela primeira vez o mecanismo de sinalização da melanopsina. Através da análise de dispersão de grânulos de melanina em resposta a estimulação por luz branca, na presença ou ausência de diferentes bloqueadores de vias de sinalização, foi proposta a participação da via dos fosfoinositídeos. Neste mesmo estudo, foi demonstrado um aumento na produção de GMPc em resposta a luz, entretanto o bloqueio de PKG não foi capaz de inibir a resposta de dispersão, deixando em aberto o papel do GMPc neste tipo celular. Posteriormente, Isoldi e colaboradores (2010) continuaram investindo no estudo dos mecanismos intracelulares da pigmentação, porém agora, na tentativa de entender os possíveis *crosstalk* entre as vias de sinalização da luz e do hormônio  $\alpha$ -MSH, uma vez que estes dois estímulos promovem o mesmo efeito sobre a pigmentação, ou seja, dispersam grânulos de melanina neste modelo, entretanto ativando diferentes mensageiros intracelulares. Recentemente, foi avaliado o efeito da endotelina sobre as melanopsinas (Moraes et al., 20014a), da melatonina e do  $\alpha$ -MSH sobre os genes do relógio e melanopsinas (Bluhm et al., 2012; Moraes et al., 2014b). Melanopsinas, *Opn4x* e *Opn4m*, exibem uma robusta variação temporal em ciclos claro-escuro. Quando endotelina foi administrada nessa condição o ritmo de expressão das melanopsinas foi abolido e um aumento pronunciado do RNAm foi observado para *Opn4x*. Embora seja bem descrito na literatura que endotelina atua como potente sincronizador (Nakahata et al., 2006), este efeito não foi observado nos melanóforos de *Xenopus* (Moraes et al., 2014a). Semelhantemente, embora melatonina e  $\alpha$ -MSH tenham sido utilizados como potenciais sincronizadores da expressão gênica, nenhum efeito sobre a sincronização foi observado (Moraes et al., 2014b).

Em adição a esses achados, sabe-se que a tirosinase, enzima chave na síntese de melanina (Hearing, 2011), possui uma sequência E-box na região de seu promotor (Murre et al., 1989; Bentley et al., 1994; Camp et al., 2003; Murisier e Beermann, 2006). Como já

mencionado, as proteínas dos genes do relógio são capazes de controlar a transcrição de genes através desse elemento E-box, impondo um padrão rítmico de expressão, caracterizando estes genes como CCGs (Storch et al., 2002; McIntosh et al., 2010). Dessa forma o gene da enzima tirosinase poderia ser considerado um CCG e a produção e/ou dispersão de melanina poderia ser um dos processos modulados por um mecanismo temporal. Essas informações em conjunto tornam os melanóforos de *Xenopus* um promissor modelo de relógio periférico para investigar mecanismos biológicos envolvendo luz e hormônios.

# OBJETIVO

*“O tempo é relativo e não pode ser medido exatamente do mesmo modo e por toda a parte.”*

Albert Einstein

Desde a descoberta da melanopsina em melanóforos de *Xenopus laevis* em 1998, diversos estudos foram realizados a fim de identificar sequências dessa molécula em outras classes de vertebrados. A partir de 2006, com a descoberta de dois diferentes genes para a melanopsina em vertebrados não mamíferos, e a constatação de que mamíferos apresentam apenas um desses genes, sendo este essencial para o ajuste dos ritmos biológicos ao ciclo claro-escuro, tornou-se necessária uma investigação mais detalhada sobre a função das melanopsinas em vertebrados não mamíferos. Atualmente se sabe que melanóforos de *X. laevis* apresentam duas melanopsinas, *Opn4x* e *Opn4m*, e expressam a maquinaria dos genes do relógio, podendo ser considerados como possíveis candidatos a desempenharem a função de relógios periféricos. Somado a isso, até o presente momento, os resultados no que se refere à localização e quantificação proteica são ainda muito escassos em vertebrados não mamíferos, sendo a maior parte oriunda de modelos de mamíferos. Baseado nessas informações, e que os melanóforos apresentam respostas biológicas a luz, é instigante esclarecer a funcionalidade das melanopsinas presentes neste modelo, sua localização proteica, bem como a relação entre estimulação das melanopsinas e ativação dos genes do relógio. Ainda mais, o hormônio endotelina exerce o mesmo efeito que a luz, causando dispersão de melanossomos em *Xenopus laevis* e atua promovendo a sincronização dos genes do relógio em *Danio rerio*. Com base nesta fundamentação, objetivou-se:

- Identificar a presença e localização das proteínas OPN4x e OPN4m em melanóforos de *Xenopus laevis*.
- Determinar os efeitos tempo-dependentes da luz sobre a expressão dos genes do relógio em melanóforos de *Xenopus laevis*.
- Determinar o papel das melanopsinas na resposta dos genes de relógio a luz em melanóforos de *Xenopus laevis*.

## OBJETIVO

- Esclarecer o mecanismo de transdução do sinal luminoso em melanóforos de *Xenopus laevis*.
- Determinar os efeitos tempo- e dose-dependentes da endotelina sobre a expressão dos genes do relógio em melanóforos de *Xenopus laevis*.
- Verificar se endotelina atua como agente sincronizador em melanóforos de *Xenopus laevis*.

# MATERIAL E MÉTODOS

*“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”.*

Roger Von Oech

### 1. Cultura de melanóforos de *Xenopus laevis*

Melanóforos de *X. laevis* gentilmente doados pelo Professor Mark Rollag (Uniformed Services University of the Health Sciences, Maryland, EUA, originalmente adquiridos da ATCC, Virginia, EUA) foram mantidos em meio L-15 (Atena, São Paulo, Brasil) 60%, 5 mg/L insulina/transferrina/selênio, suplemento de hipoxantina/timidina 1x, 10% de soro fetal bovino não-inativado, 1% de antibiótico/antimicótico (10.000 U/mL penicilina/10.000 µg/mL estreptomicina/ 25µg/mL anfotericina B) (todos da Gibco, California, EUA), pH 7,5, em estufa a 25°C. O meio de cultura foi trocado semanalmente e as células subcultivadas (1:3) quando atingiam a confluência nos frascos. Para tanto foram removidas com solução Tyrode/EDTA (NaCl 8,0 g/L; KCl 0,2 g/L; NaHCO<sub>3</sub> 1,0 g/L; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 g/L; MgCl<sub>2</sub> 1,0 g/L; EDTA 1,86 g/L) e transferidas para novos frascos.

Para a realização dos experimentos, a concentração de soro fetal bovino foi reduzida para 2% e retinaldeído (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) foi adicionado a fim de obter-se uma concentração final de 10<sup>-7</sup> M.

### 2. Determinação da presença das proteínas melanopsinas OPN4x e OPN4m por ensaio imunocitoquímico

A expressão e localização das proteínas nos melanóforos foram avaliadas por ensaio de imunocitoquímica. Neste processo, as preparações fixadas e permeabilizadas foram incubadas com anticorpos específicos para as proteínas em questão. A localização dos anticorpos primários foi visualizada com anticorpos secundários conjugados com o fluoróforo Cy3.

Anticorpos anti-melanopsina de *Xenopus* foram desenvolvidos em coelhos inoculados com os antígenos OPN4x porção N-terminal e OPN4m porção C-terminal (Covance, New Jersey, EUA), conforme sequências apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos Antígenos Inoculados em Coelhos

	Sequência	Fonte da obtenção
<i>Xenopus laevis</i> <b>OPN4x</b>	Met- Asp- Leu- Gly- Lys- Thr- Val- Glu- Tyr- Gly- Thr- His- Arg- Gln- Asp- Cys	Covance, produzido em coelho, não comercial.
<i>Xenopus laevis</i> <b>OPN4m</b>	Cys- Leu- Gly- Ser- Leu- Leu- Arg- Val- Lys- Arg- Arg- Asp- Ser- Arg- Ser	Covance, produzido em coelho, não comercial.

Os melanóforos foram semeados em uma densidade de  $10^4$  células/poço em lâminas de 8 poços, específicas para imunocitoquímica de células em cultura. O meio continha retinaldeído  $10^{-7}$  M e 2% de soro fetal bovino. Vinte e quatro horas após a semeadura, o meio foi removido e as células foram fixadas em 4% de paraformaldeído diluído em PBS, a  $4^\circ$  C durante 1 h. Após o período de fixação, as células foram lavadas com PBS 3 vezes por 10 min. Em seguida, os sítios não específicos foram bloqueados com 3% de soro de cabra (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) diluído em PBS durante 30 min a  $4^\circ$  C. Após novas lavagens com PBS (3x, 10 min), as células foram incubadas *overnight* a  $4^\circ$  C com o anticorpo primário para OPN4x ou com o anticorpo primário para OPN4m, nas concentrações 1:100 a 1:5000 em tampão de incubação. Após 3 lavagens de 10 min com PBS, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho, conjugado ao fluoróforo Cy3 (feito em cabra, Jackson Immunoresearch, Pennsylvania, EUA) na diluição 1:500 em tampão de incubação, por 1 h, protegidas de luz, à temperatura ambiente. Anticorpos primários e secundários foram preparados em tampão de incubação contendo 1% de albumina de soro bovino, 0,25% de carragenina lambda e 0,3% de Triton X-100 (todos Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS por 10 min e receberam meio aquoso Vectashield contendo DAPI (Vector Laboratories, California,

EUA), sendo recobertas com lamínulas. As imagens foram obtidas em microscópio invertido de fluorescência Axiovert 40 CFL (Zeiss, Alemanha).

Para determinar a especificidade dos anticorpos, o mesmo protocolo foi utilizado para os ensaios de competição. Utilizamos os peptídeos antigênicos usados para inoculação dos coelhos nas seguintes diluições: 1mg/mL, 0,1mg/mL, 0,01mg/mL, 0,001mg/mL, 0,0001mg/mL, 0,00001mg/mL. Os anticorpos anti-OPN4m e anti-OPN4x (separadamente) na diluição 1:1000 foram adicionados às soluções dos peptídeos respectivos e incubados em temperatura ambiente durante 1 a 2 horas sob agitação. Controles positivos foram realizados na presença dos anticorpos específicos e na ausência dos peptídeos. Como controle negativo foram utilizados os pré-soros (obtidos dos coelhos antes das inoculações) respectivos.

### 3. Ensaio de dispersão de grânulos de melanina

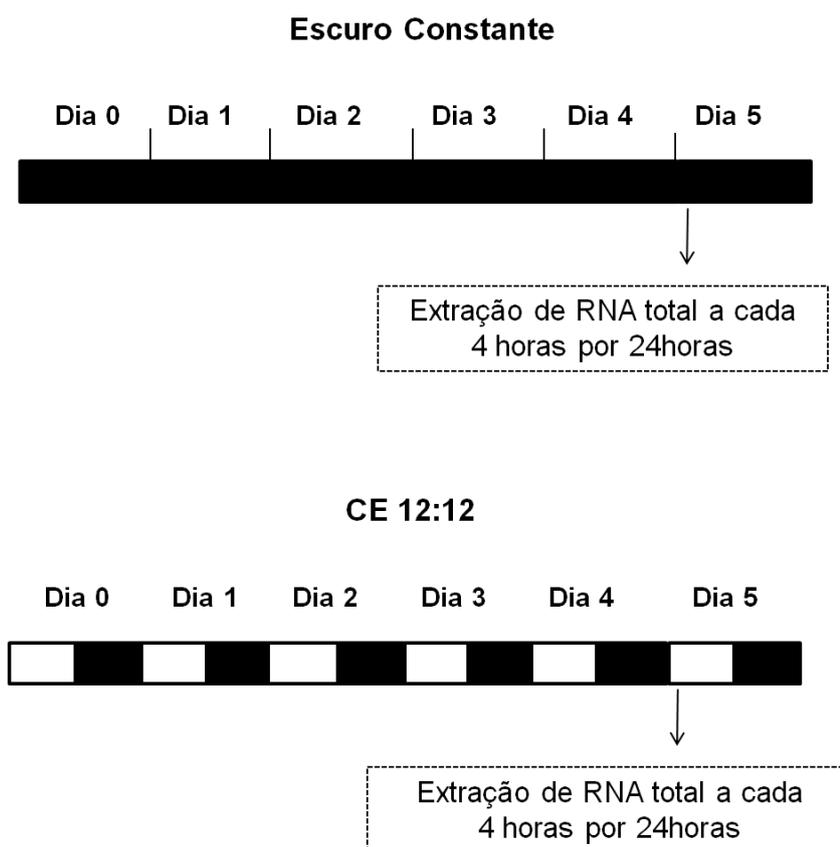
Melanóforos foram semeados ( $5 \times 10^4$  células/poço em placa de 96 poços) e mantidos em escuro constante (EC) por 24 h e então divididos em seis grupos: (1) células mantidas em EC; (2) células estimuladas por luz branca (600 lux –  $87,85 \mu\text{watts/cm}^2$ , Ecolume *full-spectrum*, lâmpada de luz branca, modelo YZ8W, São Paulo, Brasil) por 10 min; (3) células estimuladas por luz azul LED (600 a 650 lux -  $87,85$  a  $95,17 \mu\text{watts/cm}^2$ , 450 – 475nm, Golden plus, São Paulo, Brasil) por 10 min; (4) células tratadas com endotelina-3  $10^{-8}$  M por 1, 2 e 6 horas; (5) células tratadas com endotelina-3  $10^{-9}$  M por 1, 2 e 6 horas; (6) células tratadas com endotelina  $10^{-8}$  M por 1 hora e estimuladas com luz azul por 10 min no início do tratamento hormonal.

A dispersão dos melanossomos foi quantificada por absorvância absoluta a 530 nm em um leitor de placa (SpectraMax 250, Molecular Devices, Germany). Análise por ANOVA *one-way* seguida de Tukey foi utilizada para determinar diferenças estatísticas

entre as absorvâncias de grupos estimulados por luz, tratados ou não com endotelina-3 e o controle. A significância das diferenças entre doses hormonais e grupo controle e entre tempos foi determinada por ANOVA *two-way* seguida por Bonferroni.

#### **4. Expressão temporal dos genes de relógio *Per1*, *Per2*, *Clock* e *Bmal1* em melanóforos submetidos a ciclo claro-escuro (12:12 CE, luz branca) ou escuro constante (EC)**

Melanóforos de *Xenopus laevis* foram semeados ( $2 \times 10^6$  células/frascos de  $25\text{cm}^2$ ) em meio utilizado para os protocolos experimentais, como acima descrito no item 1. As células foram submetidas a ciclo claro-escuro com 600 lux ( $87,85 \mu\text{watts}/\text{cm}^2$ ) de intensidade (Ecolume full-spectrum, lâmpada de luz branca, modelo YZ8W) ou em escuro constante por 5 dias, sem nenhum tipo de manipulação. No início do sexto dia, o RNA total foi extraído a cada 4 horas por 24 horas (Figura 7). Foi utilizada luz vermelha de baixa intensidade (aproximadamente 20 lux, 7W Konex bulb, filtro *Safe-Light* GBX-2, Kodak, Nova Iorque, EUA) para a manipulação das células em escuro (trocas de meio, extração de RNA etc.).



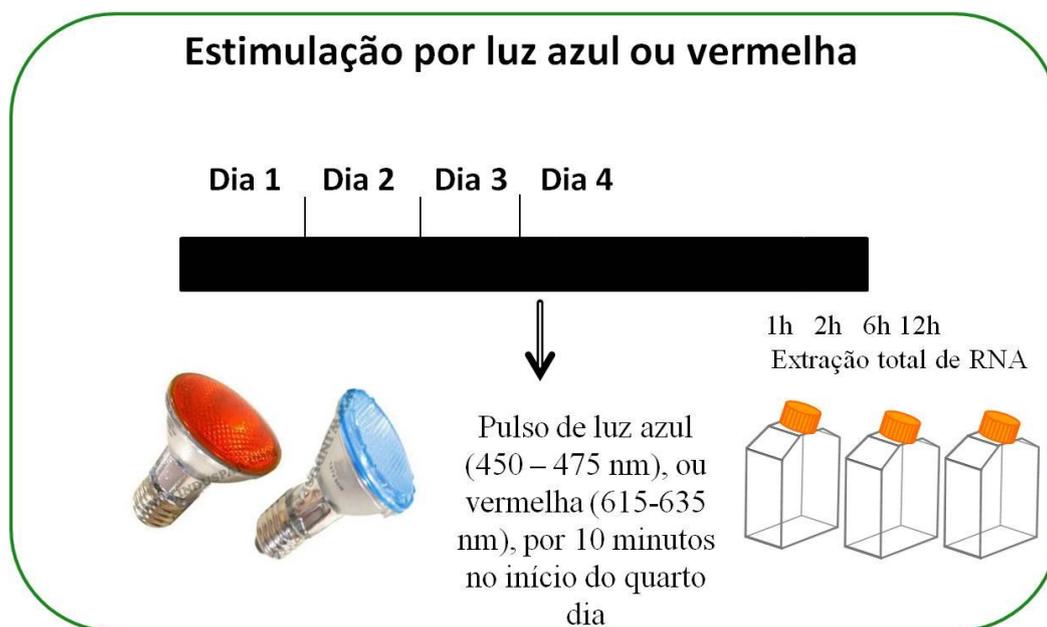
**Figura 7. Protocolo de Escuro Constante (EC) e Ciclo 12:12 Claro-Escuro (CE).** As células foram mantidas em EC ou CE por 5 dias sem nenhuma manipulação. No sexto dia, o RNA total foi extraído a cada 4 horas por um período de 24 horas.

### **5. Expressão dos genes de relógio *Per1*, *Per2*, *Clock* e *Bmal1* em melanóforos submetidos a pulsos de luz azul ou vermelha**

Os melanóforos de *Xenopus laevis* foram semeados em uma densidade de  $2 \times 10^6$  células/frasco de 25 cm<sup>2</sup> e mantidos em escuro constante por três dias, após o que, de acordo com dados da literatura, tecidos periféricos e células em cultura não mais exibem ritmos circadianos (Yamasaki et al., 2000; Car e Whitmore, 2005). No início do quarto dia, as células foram separadas em três grupos: (1) células controle, em escuro constante; (2) células estimuladas por LED azul (450-475nm, 4,6 watts, Golden plus, São Paulo, Brasil)

com intensidade aproximada de 600 a 650 lux (87,85 a 95,17  $\mu\text{watts}/\text{cm}^2$ ) por 10 min; (3) células estimuladas por LED vermelha (615-635 nm, 3 watts, Golden plus, São Paulo, Brasil) com intensidade aproximada de 600 a 650 lux (87,85 a 95,17  $\mu\text{watts}/\text{cm}^2$ ) por 10 min. O RNA total foi extraído das células dos grupos controle e estimulados 1, 2, 6 e 12 horas após o pulso de luz (Figura 8).

As lâmpadas foram chamadas de azul ou vermelha de acordo com o uso derivado da sensação de cores humana (Bruno e Svoronos, 2005). A intensidade da luz escolhida baseou-se no fato de que a estimulação por LED azul (470 nm) em 4,8  $\text{mW}/\text{cm}^2$  é suficiente para causar uma redução de 73% da viabilidade das células do epitélio pigmentar retiniano (EPR) (Nakanishi-Ueda et al., 2013).



**Figura 8. Protocolo de Estimulação dos Melanóforos por Luz Azul ou Vermelha.** Células foram mantidas 3 dias em escuro constante e no início do quarto dia receberam um pulso de luz azul ou vermelha por 10 min. O RNA total foi extraído 1, 2, 6 e 12 horas após a estimulação por luz.

### **6. Expressão dos genes de relógio *Per1*, *Per2*, *Clock* e *Bmall* em melanóforos submetidos a pulso de luz azul na presença de inibidores de componentes de vias de sinalização**

Para investigar as possíveis vias de sinalização disparadas por estímulo luminoso que levassem à ativação dos genes do relógio, as células foram separadas em 4 grupos: (1) células controle negativo em escuro constante; (2) células em escuro constante na presença de inibidores específicos; (3) células controle positivo em escuro constante, submetidas a pulso de luz azul por 10 min, como descrito no item 5; (4) células em escuro constante, submetidas a pulso de luz azul na presença de inibidores específicos. Os inibidores foram adicionados à cultura 30 min antes do estímulo de luz e permaneceram durante todo o experimento. Baseado nos resultados obtidos no protocolo 5, o efeito dos inibidores sobre as vias de sinalização foi avaliado para *Per1* e *Per2* no seu ponto de maior expressão, 6 horas após o pulso de luz azul. Foram utilizados os seguintes inibidores: inibidor de fosfolipase C - PLC (U73122) e inibidor de proteína quinase C - PKC (Ro31-8220) (Enzo Life Sciences, Nova Iorque, EUA), ambos em concentração de  $10^{-7}$  M. Os inibidores foram dissolvidos em DMSO (concentração máxima de 0,1% no meio de cultura). As concentrações utilizadas destes fármacos e dos que serão apresentados nos itens 7 e 8 basearam-se nos estudos de Isoldi e colaboradores (2005; 2010).

### **7. Expressão dos genes de relógio *Per1*, *Per2* e *Bmall* em melanóforos tratados com ativador de guanilil ciclase (YC-1)**

Para investigar a participação da cascata de sinalização da proteína quinase G, PKG, via aumento de GMPc, na ativação dos genes do relógio, os melanóforos de *Xenopus* foram mantidos em escuro constante e tratados com o ativador de guanilil ciclase. O delineamento experimental e execução foram realizados conforme protocolo proposto no

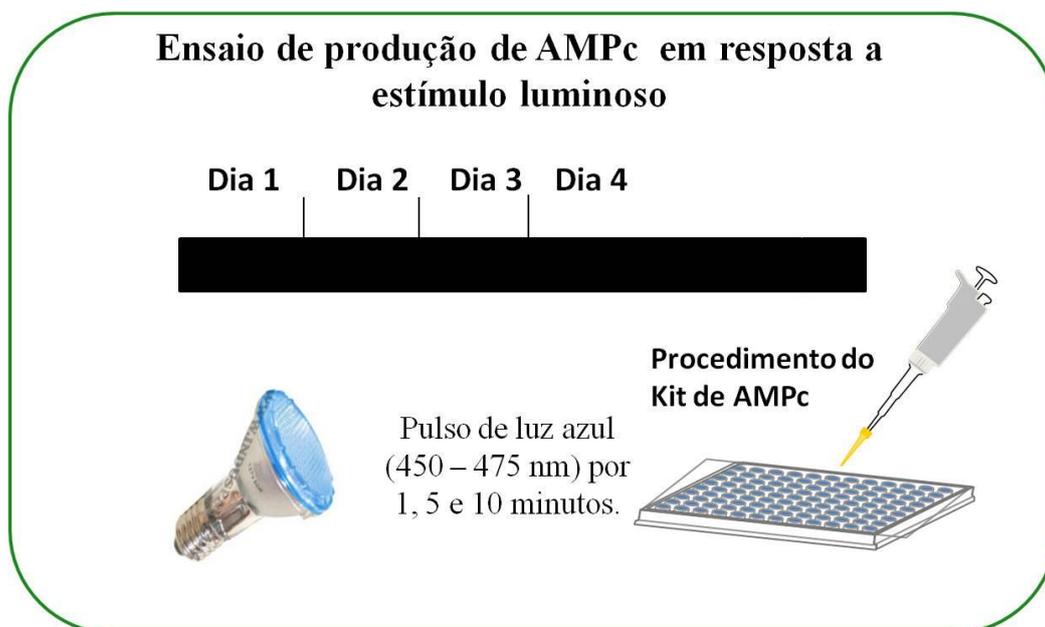
item 5, estimulação por luz azul.

As células foram divididas em 3 grupos: (1) células controle negativo em escuro constante; (2) células controle positivo em escuro constante, submetidas a pulso de luz azul por 10 min no início do quarto dia; (3) células mantidas em escuro constante, tratadas com ativador de guanilil ciclase, YC-1 (Enzo Life Science, EUA)  $10^{-7}$  M no início do quarto dia. Para efeito de padronização, foi considerado como tempo mínimo de atuação do ativador o mesmo tempo utilizado para incubação dos inibidores, ou seja, 30 min antes do pulso de luz. O ativador permaneceu em contato com as células durante todo o experimento. O RNA total foi extraído 6 horas após o final do estímulo luminoso. O ativador de guanilil ciclase foi dissolvido em água MilliQ.

### **8. Quantificação de AMPc em melanóforos submetidos a pulso de luz azul**

Melanóforos de *Xenopus laevis* foram semeados em densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço em placa de seis poços e mantidos em escuro constante por três dias antes do experimento. Previamente ao experimento, todas as placas foram tratadas por 15 min com o inibidor de fosfodiesterase isobutilmetilxantina (IBMX, Enzo LifeSciences, Nova Iorque, EUA)  $10^{-4}$  M, o qual permaneceu no meio durante todo o ensaio. As células foram separadas em 3 grupos: (1) células controle negativo em escuro constante; (2) células controle positivo em escuro constante, tratadas com o ativador de adenilil ciclase, forskolina (Enzo LifeSciences, Nova Iorque, EUA),  $10^{-5}$  M por 15 min; (3) células em escuro constante, submetidas a pulso de luz azul (450-475 nm) por 1, 5 ou 10 min (Figura 9). Ao término do estímulo, as células foram lisadas e as amostras transferidas para placas de 96 poços do *kit* e processadas de acordo com as instruções do fabricante do mesmo (*Direct Cyclic AMP*, Enzo LifeSciences, Nova Iorque, EUA). A concentração de AMPc foi determinada por leitura de absorbância no leitor de placa SpectraMax 250 (Molecular

Devices, Alemanha) a uma densidade óptica de 405 nm, analisada com auxílio do programa GraphPad Prism 5.1.

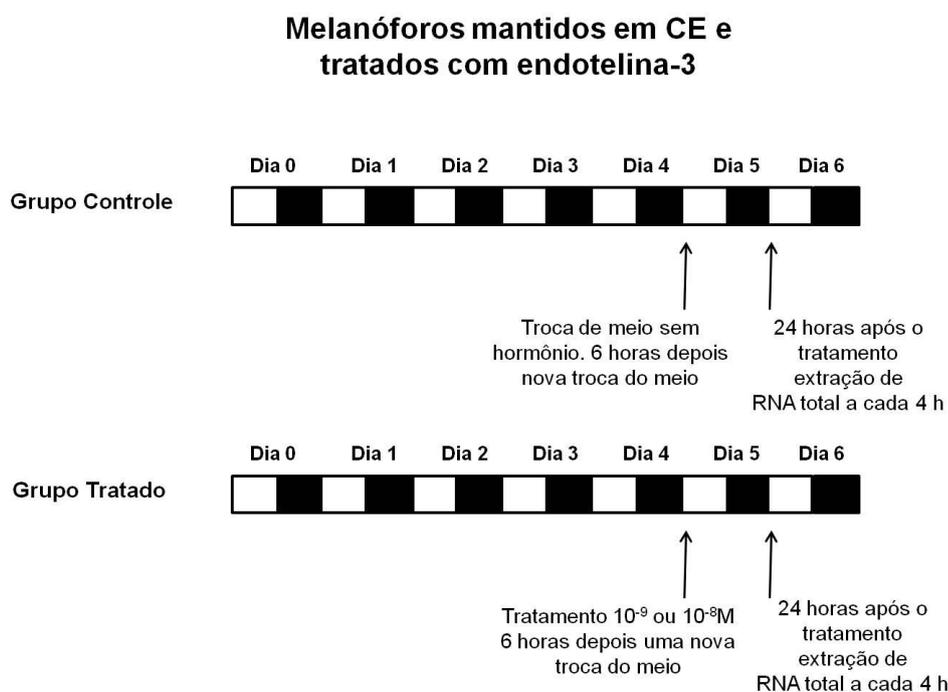


**Figura 9. Protocolo para Quantificação de AMPc em Resposta ao Pulso de Luz Azul (450 – 475 nm).** A produção de AMPc foi medida em resposta a pulsos de 1, 5 e 10 min de luz azul. Como controle positivo foi aplicado um ativador da adenilil ciclase, forskolina, em escuro constante.

### **9. Expressão temporal dos genes de relógio *Per1*, *Per2*, *Clock* e *Bmal1* em melanóforos tratados com endotelina-3**

As células foram mantidas por 5 dias em ciclo claro-escuro 12:12 CE (Figura 10). Às 8:00 h do sexto dia, as células foram separadas em 3 grupos: (1) células controle em ciclo claro-escuro; (2) células em ciclo claro-escuro tratadas com endotelina  $10^{-8}$  M por 6 horas; (3) células em ciclo claro-escuro tratadas com endotelina  $10^{-9}$  M por 6 horas. Após o período de 6 horas, uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. As garrafas controle (grupo 1) sofreram as duas trocas de meio, sem adição de hormônio.

Vinte e quatro horas após o início do tratamento, o RNA total foi extraído a cada 4 horas por 24 horas.



**Figura 10. Protocolo de Estimulação dos Melanóforos por Endotelina-3 em Ciclo Claro-Escuro.** Melanóforos foram mantidos 5 dias em 12:12 CE e foram tratados com endotelina-3 em duas diferentes concentrações  $10^{-9}$  e  $10^{-8}$  M no 5º dia por 6 horas. O RNA total foi extraído ao longo do 6º dia a cada 4 horas.

### 10. Silenciamento da melanopsina *Opn4x*

Para verificar a funcionalidade das melanopsinas OPN4x e OPN4m nas respostas observadas em melanóforos de *Xenopus laevis*, estes foram transfectados com siRNAs, desenhados pelo programa da Dharmacon (Colorado, EUA) e sintetizados pela Ambion (California, EUA). Foram geradas três sequências de oligonucleotídeos complementares a sequências do RNA mensageiro do gene da melanopsina *Opn4x* (Tabela 2).

## MATERIAL E MÉTODOS

Os siRNAs foram incorporados às células com auxílio do *kit* de transfecção *GenMute™ siRNA Transfection* (SignaGen Laboratories, Maryland, EUA). Para tanto as células foram semeadas, 24 horas antes da transfecção, em garrafas de 25cm<sup>2</sup>, em uma densidade celular de aproximadamente 50% de confluência (2x10<sup>6</sup> células/garrafa). No dia do procedimento experimental, o meio de cultivo foi substituído por meio fresco 30 min antes da transfecção. Conforme instruções do fabricante, para cada 1 mL de meio de cultivo foram adicionados 100 µL de *GenMute Transfection Buffer* (1x) e 4 µL de *GenMute Reagent*. Os siRNAs foram utilizados na concentração final de 50 nM. A confirmação da transfecção foi feita através da análise em microscópio invertido de fluorescência (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Alemanha), utilizando-se oligonucleotídeo marcado com fluoróforo. A eficiência do silenciamento foi acompanhada por PCR quantitativo 3, 6 e 12 horas após a transfecção. Para o grupo controle foi utilizado volume de água *nuclease-free* (Ambion, EUA) equivalente ao volume de siRNA.

**Tabela 2. Sequências dos siRNAs para Silenciamento da Melanopsina *Opn4x***

<i>Xenopus laevis</i> <i>Opn4x</i> siRNA-1	Sense: 5'CCACUACAGUCCAUUCAUUU 3' Antisense: 3'UUCCACUACAGUCCAUUCAAU 5'
<i>Xenopus laevis</i> <i>Opn4x</i> siRNA-2	Sense: 5'GCCUCAAGGAAGAAAAUAAU 3' Antisense: 3'UUGCCUCAAGGAAGAAAAUA 5'
<i>Xenopus laevis</i> <i>Opn4x</i> siRNA-3	Sense: 5'GCCCAAAGGAAAUUCUUUUU 3' Antisense: 3'UUGCCCAAAGGAAAUUCUUUU 5'
<i>Xenopus laevis</i> <i>Opn4x</i> siRNA-4	Sense: 5'GGUCUGGACUGGAUUUAUUU 3' Antisense: 3'UUGGUCUGGACUGGAUUUAUA 5'

### 11. Extração de RNA total

Após o descarte do meio, foi adicionado 1 mL de *Tri-Reagent-LS* (Ambion, California, EUA) diretamente sobre as células. O lisado celular foi coletado em *ependorf* e incubado por 5 min à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação das proteínas nucleares. Ao lisado celular foram adicionados 200 µL de BCP (1-bromo-3-cloropropano, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), seguido de agitação vigorosa por 15 seg e incubação em temperatura ambiente por 10 min. Após centrifugação a 12.000 x g por 15 min a 4°C, separou-se a fase superior (500 µL) que contém RNA. O RNA foi precipitado com a adição de 650 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), por 10 min em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 35 min a 4°C. O sobrenadante foi removido, o RNA lavado com 1,3 mL de etanol 75% (2x), evaporado em temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (H<sub>2</sub>O DEPC, Ambion, California, EUA). Para remoção de eventual contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase (*kit turboDNA-free<sup>TM</sup>*, Life Technologies, California, EUA). Adicionou-se a cada amostra, 10% do volume de *10x Turbo DNase Buffer*, 1 µL de *Turbo DNase*, seguindo-se incubação de 30 min, a 37°C. Logo após, foram acrescentados 3µL ou 10% do volume do reagente de inativação da *DNase*, seguindo-se incubação de 2 min em temperatura ambiente, período durante o qual as amostras foram agitadas por 2 a 3 vezes. Após centrifugação a 10.000 x g por 2 min, o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo *ependorf* e a concentração de RNA foi determinada por leitura a OD<sub>260</sub> e a qualidade pela razão OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop, Delaware, EUA).

### 12. RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

RT-PCR foi realizado com 1 µg de RNA total, utilizando 1 µL de oligonucleotídeos randômicos (50 µg/µL) e 1 µL de dNTPs 10 mM (Life Technologies, California, EUA), em reação com volume final de 13 µL ajustado com H<sub>2</sub>O-DEPC. As amostras foram aquecidas por 5 min a 65°C e a seguir transferidas para cuba com gelo por 1 min. Posteriormente foram adicionados 4 µL de tampão para PCR (5x), 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de inibidor de ribonuclease (40 U/µL) e 1 µL da enzima *Superscript III* (200 U/µL) (todos reagentes da Life Technologies, California, EUA), para um volume final de 20 µL. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada por 5 min a 25°C e, a seguir, por 50 min a 50°C. A reação foi interrompida por incubação a 70°C por 15 min. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subseqüentes de PCR quantitativo.

### 13. PCR quantitativo

Os pares de *primers* e as sondas específicos para cada gene utilizados nos protocolos abaixo (Tabela 3) foram baseados nas seqüências obtidas pelo GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), desenhados abrangendo introns usando o programa *Primer Quest* (IDT, Iowa, EUA) e sintetizados também pela IDT. As reações de PCR quantitativo foram feitas através de dois protocolos distintos, multiplex (tecnologia *Taqman*) e *SYBR Green*.

Para as reações de PCR quantitativo por protocolo multiplex foram preparadas soluções contendo os *primers* nas concentrações de 300 nM para genes de interesse e 50 nM para RNA 18S, sondas nas concentrações de 200 nM para genes de interesse e 50 nM para RNA 18S (Tabela 3). Para as reações de multiplex foram feitas as seguintes combinações de *primers* e sondas: (1) *Opn4x*, *Per2* e RNA 18S; (2) *Per1*, *Clock*, *Bmal1* e RNA 18S. Para *Opn4m*, foram usados pares de *primers* específicos em concentração final

de 300 nM e 50nM para os *primers* do RNA 18S (Tabela 3), em soluções independentes e a amplificação foi verificada pela incorporação do fluoróforo *SYBR Green*.

Para os ensaios de PCR quantitativo multiplex foi utilizado, além dos *primers* e probes, *Platinum qPCR Supermix 2x* (Life Technologies, California, EUA) suplementado para 400 µM de dNTPS, 6 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,1 U/µL de Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies, California, EUA), e H<sub>2</sub>O DNaseRNase-free (Life Technologies, California, EUA) para volume final de 29 µL/poço. Essa solução foi alíquotada (cada alíquota suficiente para 3,5 poços) em tubos, e o cDNA de cada amostra adicionado a um tubo. As soluções já com cDNA foram então distribuídas em triplicatas nos poços da placa de PCR. Controles negativos foram incluídos rotineiramente, feitos sem cDNA.

Nos ensaios para *Opn4m*, foram preparadas soluções contendo os *primers*, *SYBR*<sup>®</sup> *GreenER*<sup>™</sup> *qPCR SuperMix for iCycler*<sup>®</sup> 2x (Life Technologies, California, EUA) e H<sub>2</sub>O DNaseRNase-free (Life Technologies, California, EUA). Cada solução foi alíquotada (48 µL, sendo cada alíquota suficiente para 2 poços) em tubos *ependorf* e o cDNA de cada amostra foi adicionado a tubos independentes de acordo com o gene analisado: 5 µL para *Opn4m*, 0,5 µL para RNA 18S. As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa experimental (23 µL/poço), com duplicatas para cada gene. Controles negativos feitos sem cDNA foram incluídos rotineiramente. O fluoróforo *SYBR Green* intercala-se ao DNA durante sua amplificação, promovendo um aumento da fluorescência (Nath et al., 2000). O *SYBR Green* intercala-se a qualquer fita de DNA que está sendo amplificada, não sendo específico. Para determinar se houve amplificação de produtos inespecíficos, são obtidas *melting curves*. Durante essa fase, a temperatura é aumentada em 0,5°C a intervalos de tempo determinados e a fluorescência dos poços obtida em cada fase. As curvas ideais mostram apenas um pico de queda de fluorescência em cada poço, numa temperatura que coincide com a *melting temperature* do produto esperado (quando o

produto se dissocia). Quando há produtos inespecíficos, eles formam outro(s) pico(s) de fluorescência em diferentes temperaturas, sendo esses poços imediatamente excluídos da análise.

As sequências dos *primers* e sondas utilizados estão indicadas na Tabela 3, tendo sido usado RNA 18S como normalizador dos experimentos conforme descrito na literatura (Goidin et al., 2001; Schmid et al., 2003; Aerts et al., 2004; Zhu et al., 2005; McCurley et al., 2008).

Tabela 3. Sequências dos *Primers* e Sondas para os Ensaios de PCR Quantitativo

	<i>Sequências</i>	<i>Concentração final</i>
RNA 18S X03205.1	<b>For:</b> 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	50 nM
	<b>Bac:</b> 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	50 nM
	<b>Pr:</b> 5'/TexasRed/TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC/BHQ/2/-3'	50 nM
<i>Opn4x</i> <i>Xenopus laevis</i> NM_00108564.1	<b>For:</b> 5'-TCTTGAAT TTAAGGAGGAAAAGTG-3'	300 nM
	<b>Bac:</b> 5'-TGCTGCCTGCTGATTATGTGA-3'	300 nM
	<b>Pr:</b> 5'-6-FAM-AATGTGGAGCTTGGCACCATTACTTGGC-BHQ_1-3'	200 nM
<i>Opn4m</i> <i>Xenopus laevis</i> DQ384639.1	<b>For:</b> 5'-AGGGCAGTGCTAATCCTTTCAGGT-3'	300 nM
	<b>Bac:</b> 5'-AATCCCAGGTGCAGGATGTCAGAA-3'	300 nM
<i>Per1</i> <i>Xenopus laevis</i> NM_001085703.2	<b>For:</b> 5'-TGAAGGCCCTTAAAGAGCTAAAGA-3'	300 nM
	<b>Bac:</b> 5'-TTGCCAGTGTGCCAGACTTG-3'	300 nM
	<b>Pr:</b> 5'/5Cy5/TCGGCTCCCATCAGAGAAGAGGCTAAAAG/3BHQ_2/-3'	200 nM
<i>Per2</i> <i>Xenopus laevis</i> NM_001087629.1	<b>For:</b> 5'-AAGGAACTGGGAGAGACTCATACT-3'	300 nM
	<b>Bac:</b> 5'-AAACACAGTCTGTCACTTCCGTTACT-3'	300 nM
	<b>Pr:</b> 5'-5Cy5/ATGCACCGAGGAGGACTGCCCA/3BHQ_2/-3'	200 nM
<i>Bmal1</i> <i>Xenopus laevis</i> AY894836.1	<b>For:</b> 5'TCCCACGTGCAACGCC 3'	300 nM
	<b>Bac:</b> 5'CGGGCCATGCGCAG 3'	300 nM
	<b>Pr:</b> 5'/56FAM/TGTCCCGGAAGCTGGATAAACTCACTGT/3BHQ_1/3'	200 nM
<i>Clock</i> <i>Xenopus laevis</i> MN 001090385.2	<b>For:</b> 5' TCCCCTTTCCTGTGCAA 3'	300 nM
	<b>Bac:</b> 5'GTGTCAGTCCTGTGATGGGATAAC 3'	300 nM
	<b>Pr:</b> 5'/5HEX/AGAACACTTTTGCCCCATCCCACCA/3BHQ_1/3'	200 nM

For: *primer forward*; Bac: *primer backward*; Pr: sonda fluorescente; TexRd: Texas Red; Cy5: Cyanine 5; Hex: 6-carboxy-2, 4,4,5,7,7, -hexachlorofluorescein succinimidyl ester; FAM: carboxyfluorescein; 3BHQ\_1: Black hole quencher 1 (IDT); 3BHQ\_2: Black hole quencher 2 (IDT).

Todos os ensaios multiplex foram realizados em um termociclador iQ5 (BioRad, California, EUA), nas seguintes condições: 7 min a 95°C seguido por 45 ciclos de 30 seg a 95°C e 30 seg a 60°C, e os ensaios *Sybr Green* em um termociclador iCycler (BioRad, California, EUA) nas seguintes condições: 2 min a 50°C, 8:30 min a 95°C, seguido por 45 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C, 1 min a 95°C, 1 min a 55°C e 80 ciclos de 10 seg a 55°C, com aumento gradativo de 0,5°C.

A verificação da eficiência dos *primers* foi realizada através da construção de curva obtida por meio de uma diluição seriada de uma única amostra de cDNA (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) que posteriormente foi amplificada por PCR quantitativo em multiplex ou *Sybr Green*. Após o procedimento foi calculada a média das triplicatas ou duplicatas (de acordo com o protocolo utilizado) dos  $C_{Ts}$  para cada gene, que foram usados para construir o eixo Y do gráfico de regressão linear. Para cada ponto da curva foi calculado o log da diluição seriada do cDNA que compôs o eixo X. A eficiência para cada par de *primers* foi calculada de acordo com a equação  $10^{(-1/x)-1} * 100$ , onde x corresponde ao ângulo de inclinação da curva de regressão linear. As eficiências dos *primers* variaram de 79,5 a 105%.

### 14. Análise dos resultados

A análise dos dados foi feita pela comparação entre os  $C_{Ts}$  controle e experimentais, obtidos nas porções de crescimento geométrico das curvas, passando-se uma reta denominada limiar que cruza essas porções. Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar ( $C_T$ ), é encontrado o  $\Delta C_T$  que é a diferença entre esse valor para o gene de interesse e o valor para o RNA 18S. A seguir, foi obtido o  $\Delta\Delta C_T$ : (1) subtraindo o menor valor médio em EC dos valores encontrados para cada ponto temporal; (2) subtraindo o valor médio dos poços controle em EC dos valores dos poços experimentais (estímulo luminoso, na presença ou na ausência de inibidores, ou em EC na presença de ativador de

componente de via); ou (3) subtraindo o valor médio dos poços controle sem hormônio dos valores dos poços experimentais (tratamento com ET-3). Colocando-se  $\Delta\Delta C_T$  como exponencial negativo na base 2 ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) obteve-se o número de vezes que o gene está expresso em relação ao respectivo controle. Os valores de log foram obtidos para células provenientes de pelo menos 4 frascos, de dois experimentos independentes. Para determinar os níveis de significância entre os tempos, ou entre controle e experimentais, os dados logarítmicos foram comparados por ANOVA *one-way* seguida por teste de Tukey (significância quando  $p < 0,05$ ), e entre controle e grupos tratados com ET-3 por ANOVA *two-way* seguida por teste de Bonferroni (significância quando  $p < 0,05$ ).

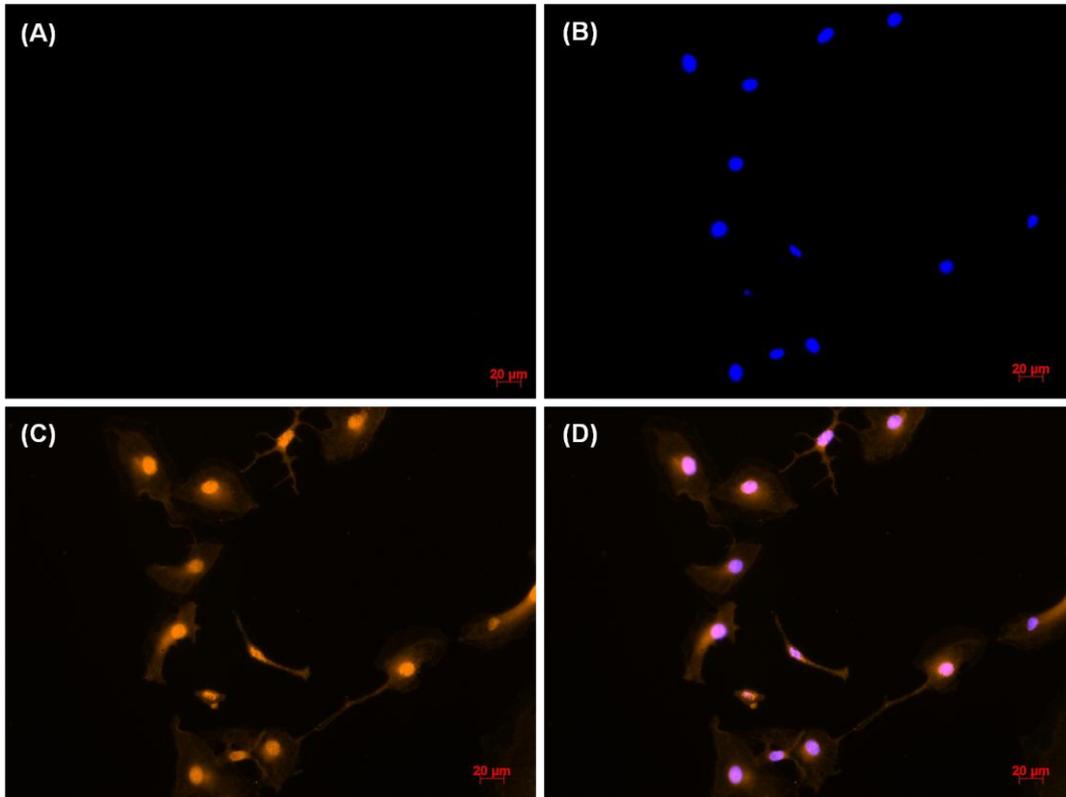
# **RESULTADOS**

*“A persistência é o caminho mais curto para o êxito”*

Charles Chaplin

### **1. Determinação da presença das proteínas melanopsinas OPN4m e OPN4x por ensaio imunocitoquímico**

O primeiro passo deste projeto foi a realização de ensaio de imunocitoquímica a fim de identificarmos a presença e a localização das proteínas das melanopsinas OPN4m e OPN4x. Para tanto, utilizamos anticorpos primários anti-melanopsinas encomendados por nosso laboratório, uma vez que os mesmos não são comercializados. Por essa razão inicialmente foi feito um painel de diluições com concentrações que variaram de 1:100 a 1:5000. Aqui serão apresentadas as imagens da imunocitoquímica nas diluições que apresentaram melhor marcação, 1:100 a 1:500, embora tenha sido possível identificar imunopositividade até a diluição 1:1000. Esta foi utilizada para os ensaios de competição dos anticorpos primários, uma vez que o recomendado para este ensaio é o uso da menor concentração ainda efetiva de anticorpo. Foi possível observar boa marcação para os dois anticorpos, anti-OPN4m e anti-OPN4x nas seguintes diluições: 1:100 (Figuras 11 e 14), 1:250 (Figuras 12 e 15), 1:500 (Figuras 13 e 16).



**Figura 11. Imunocitoquímica de Melanóforos de *Xenopus laevis* Mostrando as Células Imunopositivas para o Anticorpo Anti-OPN4m na Diluição 1:100.** Nesta e nas Figuras 12 e 13: (A) pré-soro; (B) núcleos marcados em azul (DAPI); (C) em laranja (Cy3) células positivas para OPN4m, (D) sobreposição de (B) e (C). As imagens foram analisadas em microscópio invertido de fluorescência Zeiss.

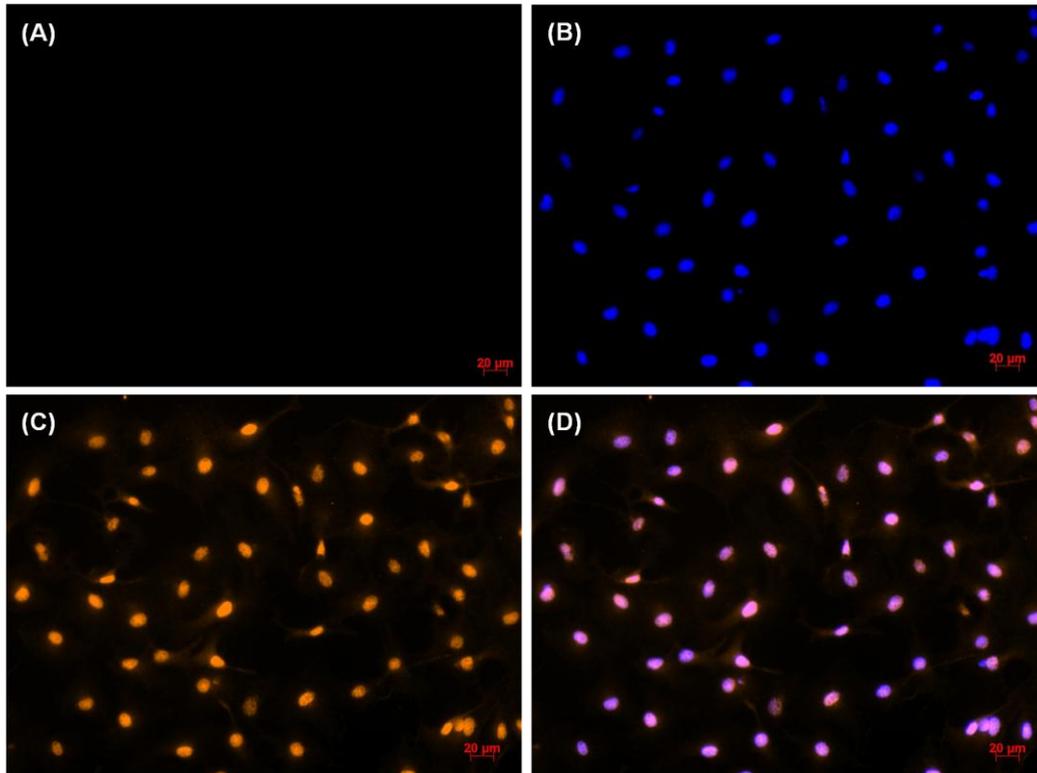


Figura 12. Imunocitoquímica de Melanóforos de *Xenopus laevis* Mostrando as Células Imunopositivas para o Anticorpo Anti-OPN4m na Diluição 1:250.

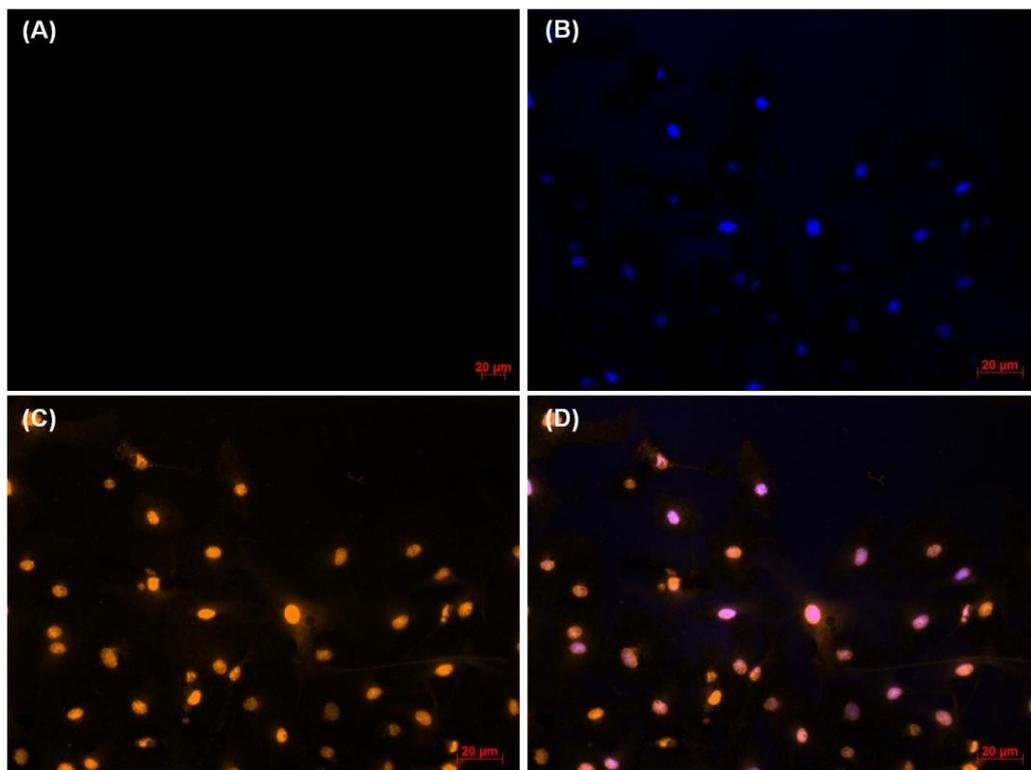
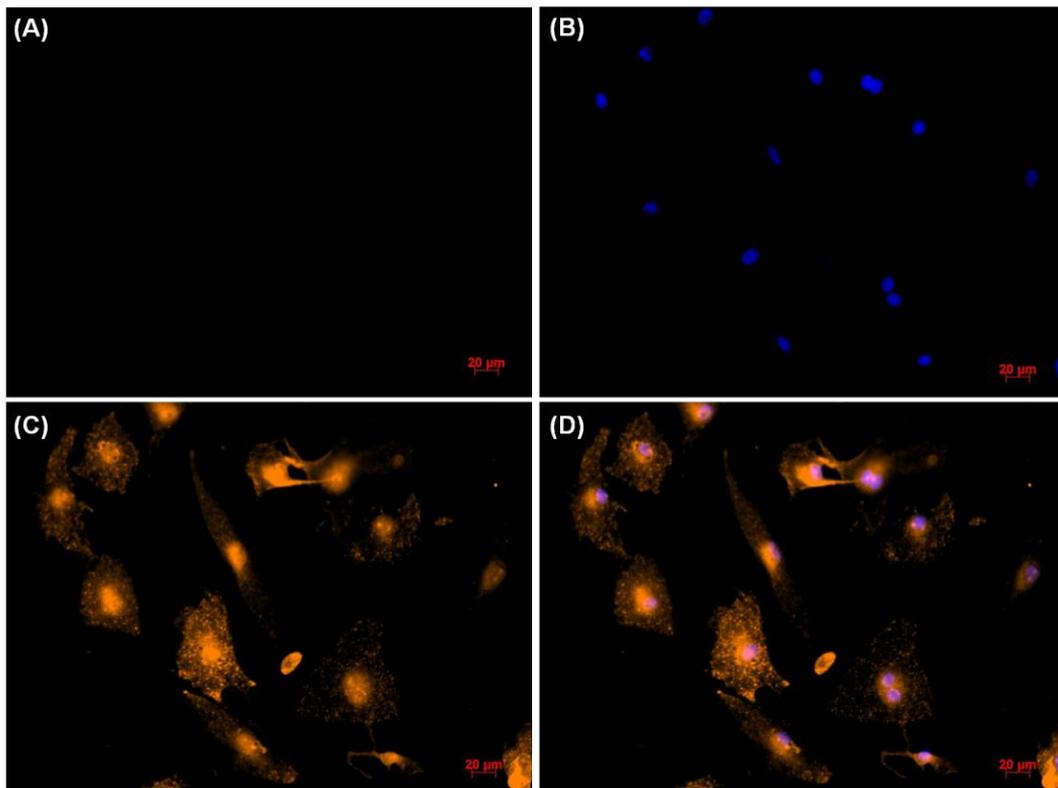


Figura 13. Imunocitoquímica de Melanóforos de *Xenopus laevis* Mostrando as Células Imunopositivas para o Anticorpo Anti-OPN4m na Diluição 1:500.



**Figura 14. Imunocitoquímica de Melanóforos de *Xenopus laevis* Mostrando as Células Imunopositivas para o Anticorpo Anti-OPN4x na Diluição 1:100.** Nesta e nas Figuras 15 e 16: (A) pré-soro; (B) núcleos marcados em azul (DAPI); (C) em laranja (Cy3) células positivas para OPN4x, (D) sobreposição de (B) e (C). As imagens foram analisadas em microscópio invertido de fluorescência Zeiss.

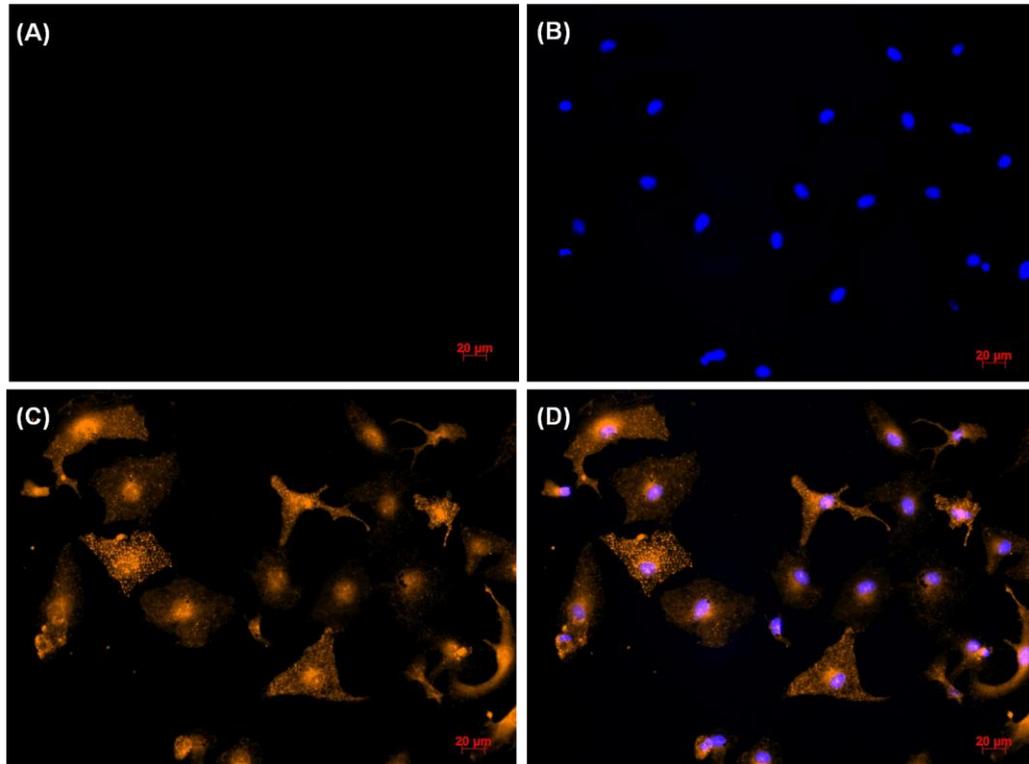


Figura 15. Imunocitoquímica de Melanóforos de *Xenopus laevis* Mostrando as Células Imunopositivas para o Anticorpo Anti-OPN4x na Diluição 1:250.

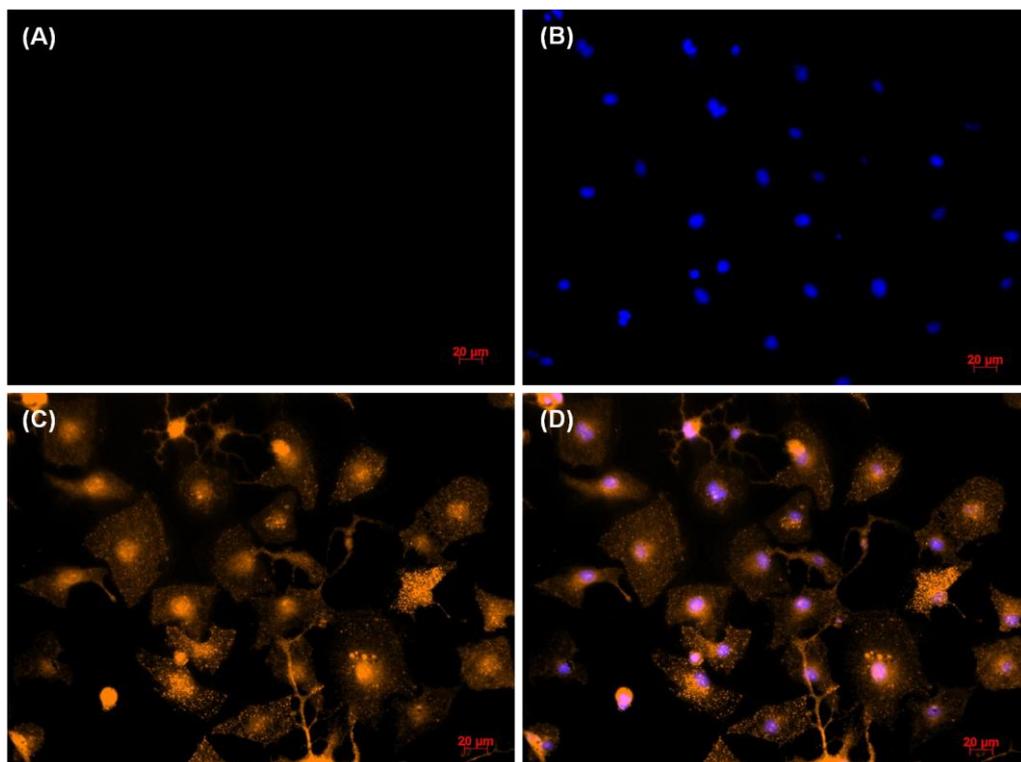
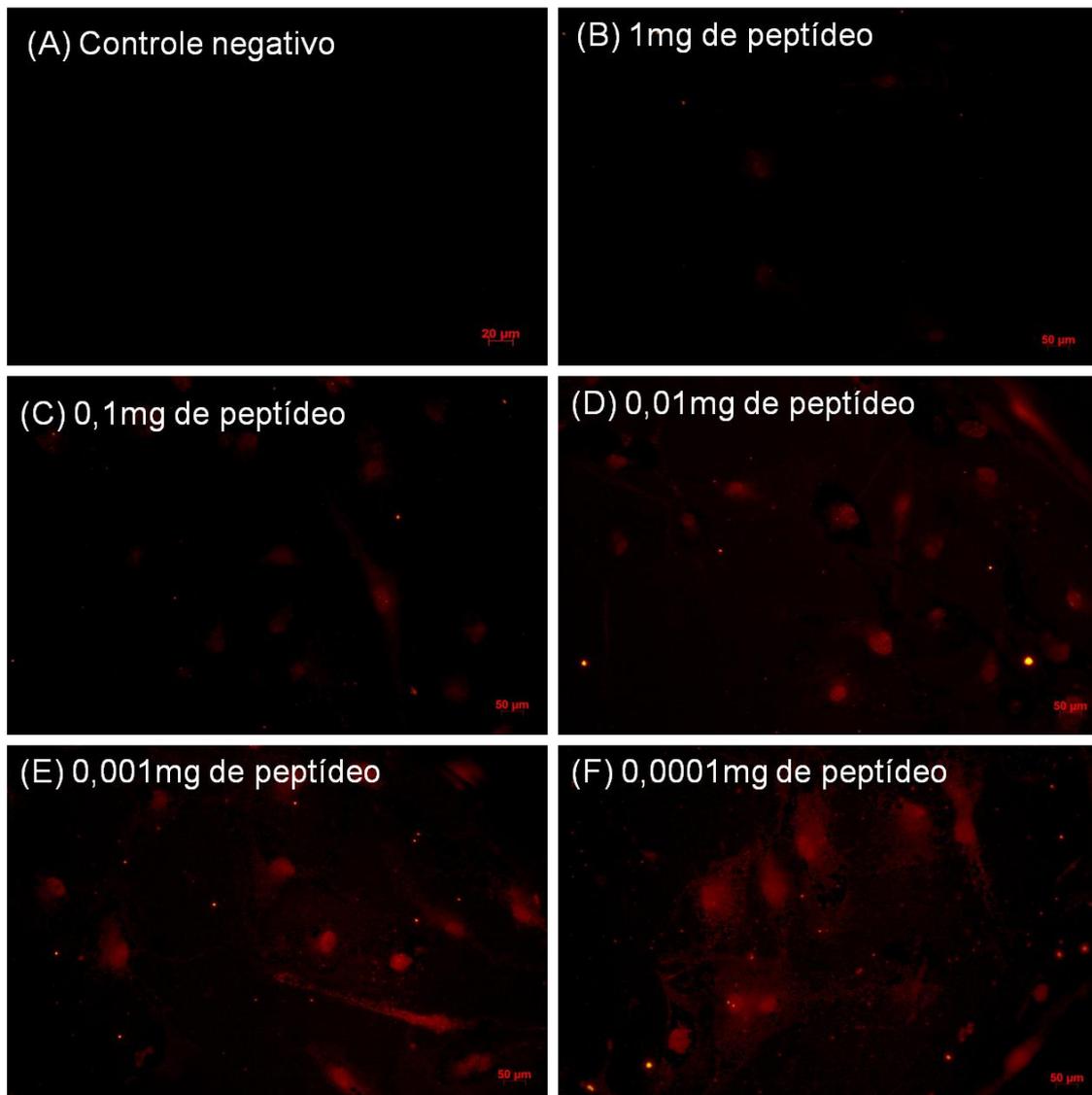


Figura 16. Imunocitoquímica de Melanóforos de *Xenopus laevis* Mostrando as Células Imunopositivas para o Anticorpo Anti-OPN4x na Diluição 1:500.

Os resultados mostraram reação de imunopositividade para as duas proteínas de melanopsinas, OPN4m (Figuras 11 a 13) e OPN4x (Figuras 14 a 16). A proteína OPN4m está presente na região nuclear, indicando uma localização no núcleo da célula ou membrana nuclear (Figuras 12 D e 13 D). Uma marcação citoplasmática fraca é observada na diluição 1:100 do anticorpo anti-OPN4m (Figura 11C e D), contudo esse resultado pode ser explicado pela alta concentração de anticorpo usado neste ensaio, uma vez que nas maiores diluições 1:250 (Figura 12 C e D) e 1:500 (Figura 13 C e D) essa marcação deixa de ser observada restando apenas imunopositividade na região nuclear. Diferente do que foi observado para a proteína OPN4m, a proteína OPN4x está localizada em toda a célula, com forte marcação na membrana, citoplasma e próximo do núcleo nas três diluições utilizadas, com destaque para a região do citoplasma e membrana (Figura 14 a 16 C e D).

A especificidade do anticorpo secundário ao anticorpo primário também foi testada. Células do grupo controle foram incubadas com pré-soro (soro obtido do coelho previamente a imunização) e anticorpo secundário. Pode-se observar uma ausência de marcação nestas preparações para os dois anticorpos utilizados, demonstrando a especificidade do anticorpo secundário para os anticorpos anti-melanopsinas (Figura 11 A a 16 A).

Para comprovar a especificidade dos anticorpos primários anti-melanopsinas, ensaios de competição com os respectivos peptídeos antigênicos foram realizados. A incubação prévia do anticorpo anti-OPN4x na diluição 1:1000 com os peptídeos antigênicos correspondentes na concentração de 1 mg/mL impede completamente a ligação anticorpo-proteína, desta maneira demonstrando a especificidade da ligação (Figura 17). O ensaio de competição para o anticorpo anti-OPN4m não apresentou resultados contundentes, sendo necessária sua repetição.



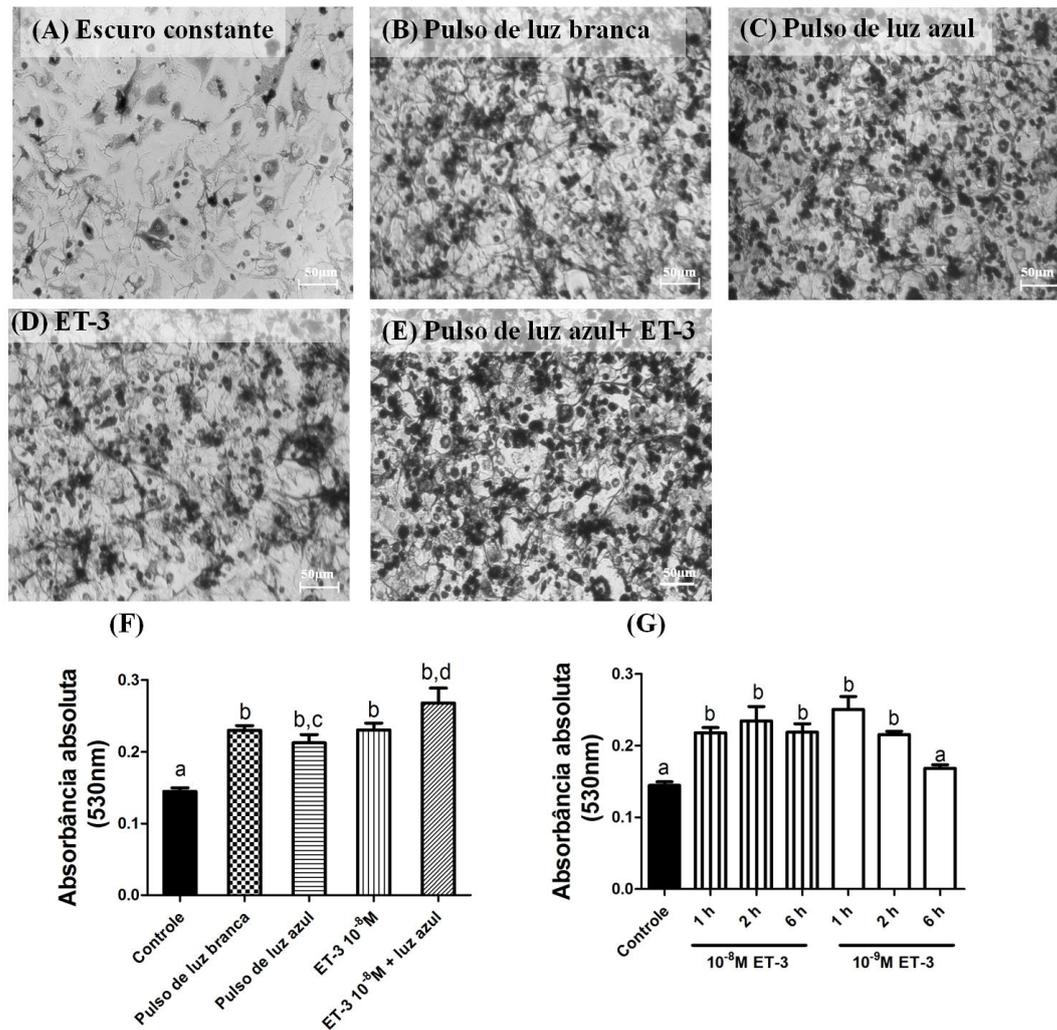
**Figura 17. Ensaio de Competição em Imunocitoquímica para OPN4x.** (A) controle negativo pré-soro; (B) (C) (D) (E) e (F) anti-OPN4x 1:1000 previamente incubado com peptídeo antigênico (B) 1 mg/mL; (C) 0,1 mg/mL; (D) 0,01 mg/mL; (E) 0,001 mg/mL; (F) 0,0001 mg/mL.

## 2. Ensaio de dispersão de grânulos de melanina

Foi realizado o ensaio de dispersão com estímulos de 10 min de luz branca ou azul (460-480 nm, comprimento de onda específico que estimula as melanopsinas) e/ou tratamento com endotelina-3 em duas diferentes concentrações,  $10^{-8}$  e  $10^{-9}$  M por 1, 2 e 6 horas.

Como os ensaios de dispersão em resposta a luz e hormônio foram avaliados temporalmente, foi realizado um experimento controle que mediu a absorbância, em escuro constante na ausência de qualquer estimulação, ao longo dos mesmos períodos de tempo. Nessas células não foi observada variação alguma no estado de dispersão dos melanóforos nos tempos analisados.

Tanto luz branca (Figura 18 B) quanto luz azul (Figura 18 C) promoveram dispersão de melanossomos quando comparado ao controle sem estimulação (Figura 18 A). O tratamento com endotelina-3  $10^{-8}$  M promoveu aumento da dispersão (Figura 18 D) em todos os tempos analisados (Figura 18 G), enquanto que ET-3  $10^{-9}$  M aumentou a dispersão 1 e 2 horas após tratamento, sendo possível observar uma redução da dispersão 6 horas após aplicação do hormônio (Figura 18 G). Quando o pulso de luz azul foi aplicado na presença de endotelina-3  $10^{-8}$  M e a dispersão foi avaliada 1 hora após o início do tratamento foi possível observar uma maior dispersão em comparação ao grupo que somente recebeu pulso de luz azul (Figura 18 E, F, G).



**Figura 18. Luz e Endotelina Promovem Dispersão de Grânulos de Melanina.** (A – E) Fotomicrografias representando células mantidas em escuro constante por 24 horas e posteriormente submetidas às seguintes condições: (A) EC; (B) 1 hora depois da estimulação com pulso de luz branca; (C) 1 hora depois da estimulação com pulso de luz azul; (D) tratamento com ET-3 10<sup>-8</sup> M por 1 hora; (E) 1 hora depois da estimulação com luz branca e tratamento com ET-3 10<sup>-8</sup> M por 1 hora. Em F e G gráficos representando dispersão de melanossomos quantificada por absoluta absorbância: em (F) células estimuladas por luz branca, luz azul, ET-3 10<sup>-8</sup>M ou luz azul mais ET-3 10<sup>-8</sup>M; em (G) células depois de 1, 2 ou 6 horas de tratamento com ET-3 10<sup>-8</sup> M e 10<sup>-9</sup> M respectivamente. Letras significam diferenças estatísticas (*a* diferente de *b* e *c* diferente de *d*) ( $p < 0,05$ , ANOVA *one-way* seguida por teste de Tukey).

#### 4. Expressão dos genes de relógio *Per1*, *Per2*, *Clock* e *Bmall* em melanóforos submetidos a diferentes condições de iluminação

Baseando-nos nos resultados de dispersão dos grânulos de melanina por luz apresentados no item acima, nossa próxima questão foi investigar o efeito do ciclo claro-escuro na dinâmica de transcrição dos genes do relógio, uma vez que os melanóforos de *Xenopus laevis* apresentam grânulos de melanina no interior do citoplasma e os processos de mudança de cor obedecem a um padrão circadiano. Assim, investigamos se o ciclo 12:12 claro-escuro (CE) poderia atuar como um agente sincronizador para essas células, mantendo-as em EC ou CE por 5 dias e, a seguir, extraindo o RNA total a cada 4 horas por 24 horas.

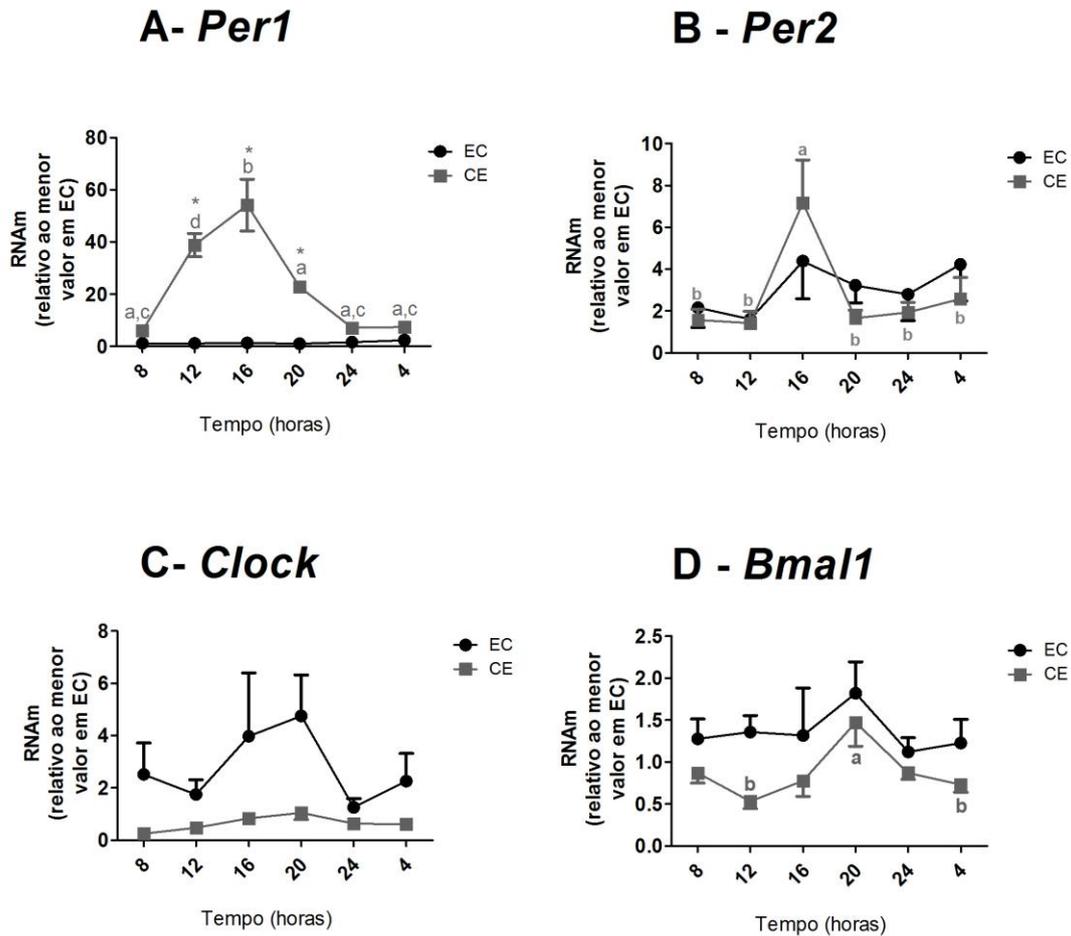
Quando as células foram mantidas em escuro constante por 5 dias, a expressão de *Per1* não variou ao longo do tempo (Figura 19 A). Em contraste com a condição de escuro, o regime de 12:12 CE induziu um robusto aumento na transcrição do RNAm, com maior expressão durante a fase clara. Foi observado um aumento do RNAm de *Per1* 4 horas após o acender da luz, com um pico às 16:00 horas, retornando aos valores basais na fase escura (Figura 19 A). Nesta condição é possível identificar um marcante padrão circadiano de expressão para *Per1*.

Similar ao que foi visto para *Per1*, a expressão de *Per2* em escuro constante não apresentou variação em 24 horas (Figura 19 B). Em 12:12 CE a maior expressão para *Per2* foi observada às 16:00 h, similar a *Per1*, entretanto esse pico não foi precedido de aumento gradual (Figura 19 B).

A expressão de *Clock* não apresentou variações temporais em nenhum dos protocolos analisados, EC ou CE (Figura 19 C).

Nenhuma variação estatística foi encontrada na expressão temporal de *Bmall* quando as células foram mantidas em escuro constante, contudo na condição de ciclo

claro-escuro uma sutil variação pode ser observada. O ponto de maior expressão foi às 20:00 h em comparação com a menor expressão às 12:00 horas (Figura 19 D).



**Figura 19. Expressão de *Per1* (A), *Per2* (B), *Clock* (C) e *Bmal1* (D) em Escuro Constante e Ciclo Claro-Escuro.** O RNA total foi extraído de células em frascos em duplicata a cada 4 horas com início às 8:00 horas (luz acende às 8:00 e apaga às 20:00 horas) após 5 dias em EC ou CE, seguido de análise por PCR quantitativo. Os valores são apresentados como a média (n= 4-6) ± EPM de expressão de cada gene normalizado pelo RNA 18S e expressos relativos ao menor valor em escuro constante. Letra *a* é diferente de *b*, *c* é diferente de *d* ( $p < 0,05$ , ANOVA *one-way* seguida de teste de Tukey). Asteriscos representam diferenças significativas entre EC e CE no mesmo ponto temporal por ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

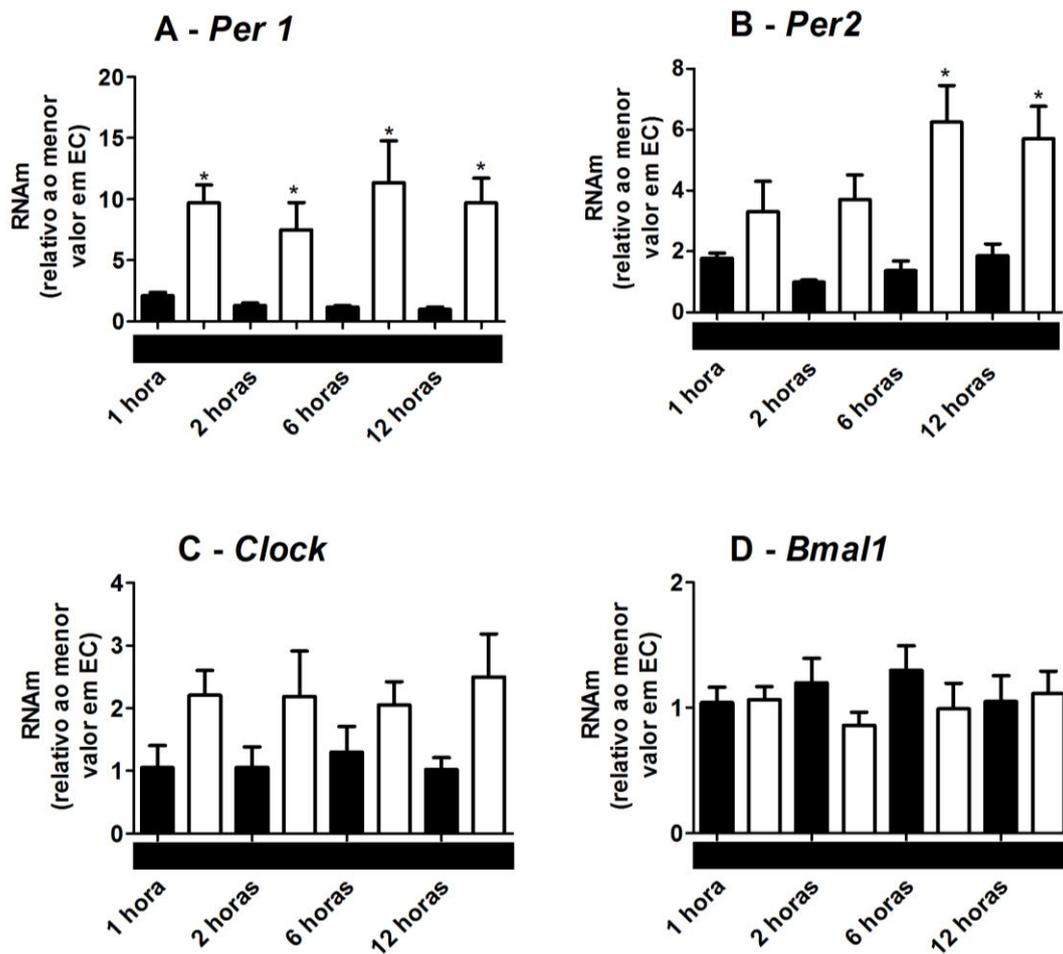
Uma vez que o ciclo claro-escuro foi capaz de impor um robusto ritmo de expressão de *Per1* e alterou o perfil de *Per2* e *Bmall*, nosso próximo passo foi investigar qual fotopigmento seria responsável por essa resposta. Para tanto, os melanóforos foram estimulados por luz azul, comprimento de onda específico que maximamente ativa as melanopsinas (Isoldi et al., 2005), seguido de extração de RNA total 1, 2, 6 e 12 horas após o estímulo.

O pulso de luz azul (600lux, 87,85 – 95,17  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ,  $2,19 \times 10^{14}$  fótons  $\text{s}^{-1} \text{cm}^{-2}$ , 450-475 nm) por 10 min induziu um aumento na expressão de *Per1* em todos os tempos analisados quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 20 A). No ponto de maior expressão, 6 horas, *Per1* teve um aumento de aproximadamente 12 vezes. Já para *Per2* um aumento da transcrição foi observado somente 6 e 12 horas após o pulso de luz azul (Figura 20 B), sendo que o horário de maior expressão, 6 horas, coincide com o de maior expressão de *Per1* (Figura 20 A e B).

Análise dos genes da alça positiva da maquinaria do relógio, *Clock* e *Bmall*, demonstrou ausência de variação temporal em resposta a luz azul em todos os pontos analisados (Figura 20 C e D), não havendo diferenças em relação ao que se vê em escuro constante.

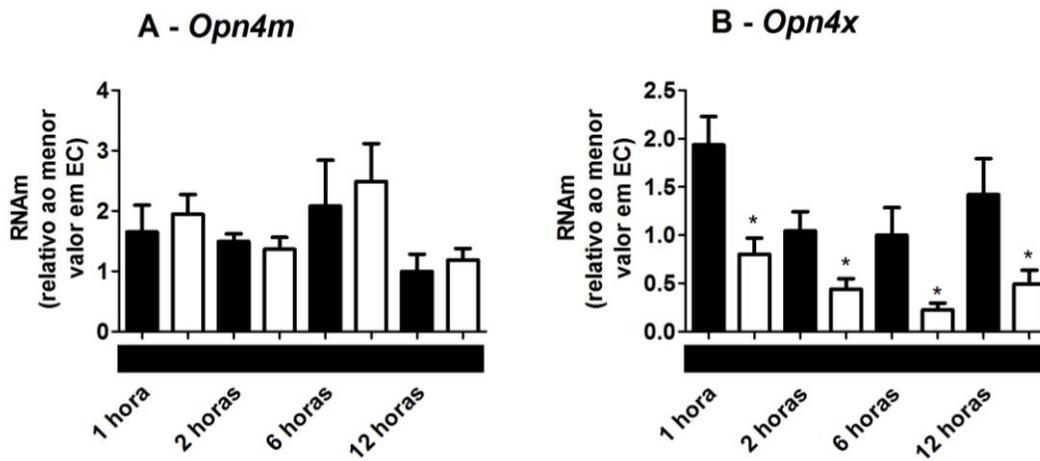
Como dito anteriormente, *Xenopus laevis* apresenta dois genes para melanopsinas, *Opn4m* e *Opn4x* (Belingham et al., 2006) e apenas *Opn4x* respondeu ao pulso de luz azul com uma diminuição da transcrição em todos os horários analisados (Figura 21 A e B).

Pulso de luz azul (450-475nm) por 10 minutos



**Figura 20.** Expressão de *Per1* (A), *Per2* (B), *Clock* (C) e *Bmal1* (D) em Melanóforos de *Xenopus laevis* Estimulados com Pulso de Luz Azul. Células foram mantidas 3 dias em escuro constante e estimuladas por luz azul ( $2,19 \times 10^{14}$  fótons  $s^{-1} cm^{-2}$ , 450-475 nm) por 10 min às 8:00 horas do quarto dia. Os valores são apresentados como a média ( $n= 4-6$ )  $\pm$  EPM de expressão de cada gene normalizado pelo RNA 18S e expressos relativos ao menor valor em escuro constante. Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo estimulado por luz e respectivo controle no mesmo ponto temporal por ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Barras pretas, controle em EC; barras brancas, resposta temporal após estimulação luminosa.

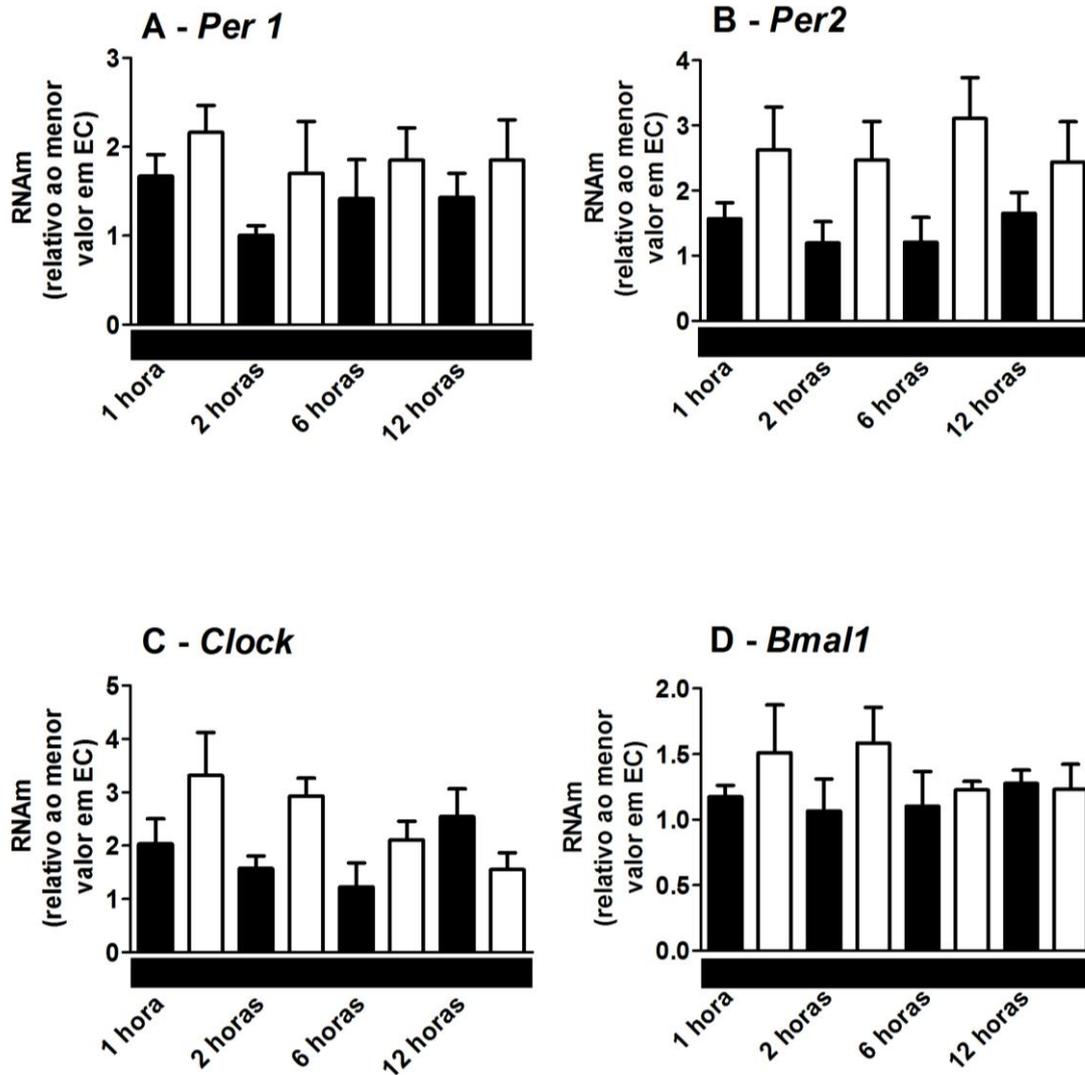
Pulso de luz azul (450-475nm) por 10 minutos



**Figura 21. Expressão de *Opn4x* (A) e *Opn4m* (B) em Melanóforos de *Xenopus laevis* Estimulados com Pulso de Luz Azul.** Células foram mantidas 3 dias em escuro constante e estimuladas por luz azul ( $2,19 \times 10^{14}$  fótons  $s^{-1} cm^{-2}$ , 450-475 nm) por 10 min às 8:00 horas do quarto dia. Os valores são apresentados como a média ( $n = 4-6$ )  $\pm$  EPM de expressão de cada gene normalizado pelo RNA 18S e expressos relativos ao menor valor em escuro constante. Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo estimulado por luz e respectivo controle no mesmo ponto temporal por ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Barras pretas, controle em EC; barras brancas, resposta temporal após estimulação luminosa.

A fim de reforçar a melanopsina como o provável candidato a fotopigmento responsável pelo ajuste dos genes do relógio aos ciclos claro-escuro, estimulamos os melanóforos por 10 min com luz vermelha (600 lux, 87,75 a 95,17  $\mu W/cm^2$ ,  $2,8 \times 10^{14}$  fótons  $s^{-1} cm^{-2}$ , 615-635 nm), comprimento de onda que não é capaz de ativar as melanopsinas. RNA total foi extraído nos mesmos tempos do protocolo anterior, 1, 2, 6 e 12 horas após estimulação. Confirmando nossa hipótese, nenhuma variação foi observada na expressão dos quatro genes de relógio em todos os tempos analisados (Figura 22 A, B, C e D).

Pulso de luz vermelha (615-635 nm) por 10 minutos



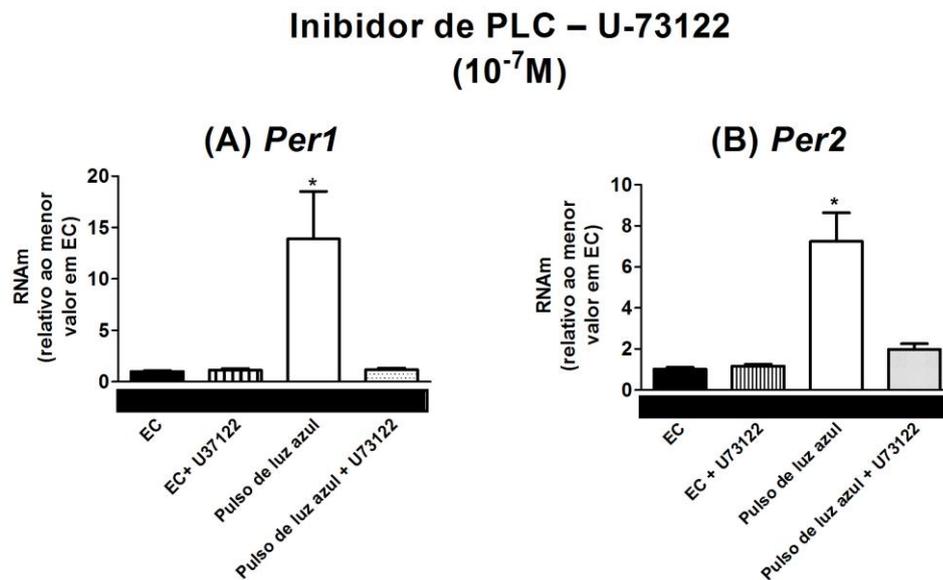
**Figura 22.** Expressão de *Per1* (A), *Per2* (B), *Clock* (C) e *Bmal1* (D) em Melanóforos de *Xenopus laevis* Estimulados com Pulso de Luz Vermelha. Células foram mantidas 3 dias em escuro constante e estimuladas por luz vermelha ( $2,8 \times 10^{14}$  fótons  $s^{-1} cm^{-2}$ , 615-635 nm) por 10 min às 8:00 horas do quarto dia. Os valores são apresentados como a média ( $n= 4-6$ )  $\pm$  EPM de expressão de cada gene normalizado pelo RNA 18S e expressos relativos ao menor valor em escuro constante. Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo estimulado por luz e respectivo controle no mesmo ponto temporal por ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . Barras pretas, controle em EC; barras brancas, resposta temporal após estimulação luminosa.

**5. Via de sinalização em melanóforos de *Xenopus laevis* em resposta a luz azul**

Após comprovarmos que o pulso de luz é capaz de alterar a expressão dos genes de relógio, colocando a melanopsina como provável candidato a intermediar esse processo, passamos a investigar a via de sinalização que leva à estimulação dos genes *Per*. Dados do nosso laboratório haviam demonstrado que a luz em 460 nm maximamente estimula as melanopsinas (ou uma delas) em melanóforos de *Xenopus laevis*, disparando a ativação de uma via de fosfoinosítídeos. Esta via leva a um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  e de GMPc (Isoldi et al., 2005, 2010). Curiosamente, o bloqueio da formação de GMPc não abole a dispersão pigmentar em resposta a luz, deixando em aberto o papel deste nucleotídeo na foto-resposta. Tendo estes fatos em mente, nossa hipótese seria que a melanopsina estimulada por luz aumentasse a expressão dos genes de relógio via fosfoinosítídeos com um possível *crosstalk* com a via do GMPc.

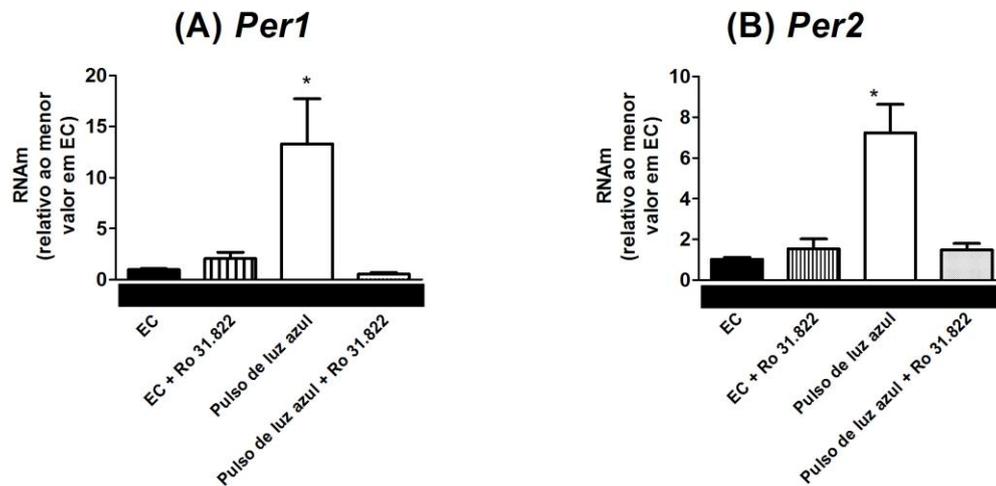
Para determinar as vias de sinalização envolvidas na resposta à luz, foram utilizados inibidores e ativadores de componentes das cascatas intracelulares, seguindo-se a análise da expressão de *Per1* e *Per2* 6 horas após o estímulo, uma vez que estes dois genes responderam ao pulso de luz azul com máxima expressão no ponto temporal em questão.

O inibidor de PLC, U-73122, na concentração  $10^{-7}$  M, inibiu o aumento da expressão evocado pela luz azul nos genes *Per1* e *Per2* (Figura 23 A e B). Semelhantemente, o inibidor de proteína quinase C, Ro 31-8220, na concentração  $10^{-7}$  M, também foi capaz de bloquear o aumento de expressão dos genes *Per* (Figura 24 A e B).



**Figura 23. Expressão de *Per1* (A) e *Per2* (B) em Melanóforos de *Xenopus laevis* Estimulados com Pulso de Luz Azul.** As células foram mantidas em escuro constante por 4 dias e então divididas em 4 grupos: (1) mantidas em escuro constante; (2) mantidas em escuro constante e tratadas com inibidor de PLC, U-73122, 10<sup>-7</sup> M; (3) estimuladas com luz azul por 10 min; (4) estimuladas com luz azul na presença do inibidor de PLC (aplicado 30 min antes, permanecendo durante todo o experimento). O RNA total foi extraído 6 horas após o final do estímulo luminoso. Os valores são apresentados como a média (n= 4-6) ± EPM de expressão de cada gene normalizado pelo RNA 18S e expressos relativos aos respectivos controles em escuro constante. Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo estimulado por luz e respectivo controle no mesmo ponto temporal por ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

### Inibidor de PKC – Ro 31.822 ( $10^{-7}$ M)

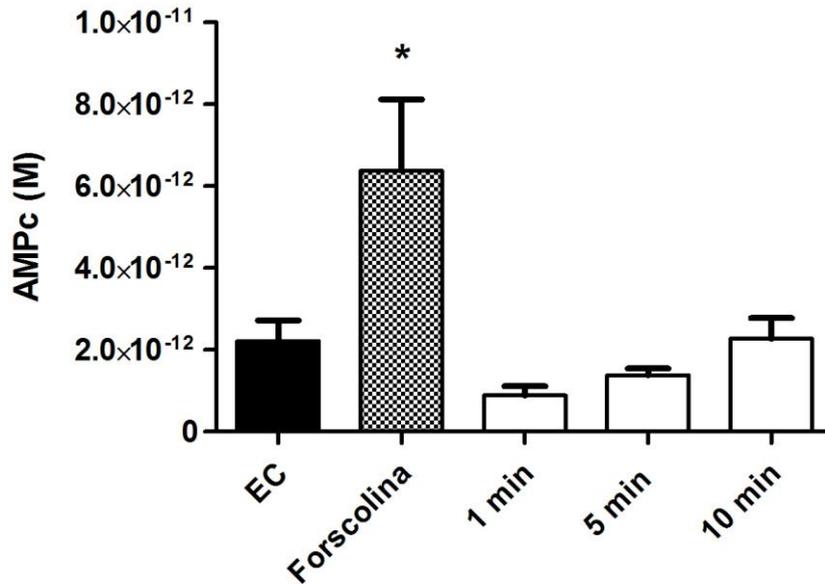


**Figura 24. Expressão de *Per1* (A) e *Per2* (B) em Melanóforos de *Xenopus laevis* Estimulados com Pulso de Luz Azul.** As células foram mantidas em escuro constante por 4 dias e então divididas em 4 grupos: (1) mantidas em escuro constante; (2) mantidas em escuro constante e tratadas com inibidor de PKC,  $10^{-7}$  M, Ro-31.822; (3) estimuladas com luz azul por 10 min; (4) estimuladas com luz azul na presença do inibidor de PLC (aplicado 30 min antes, permanecendo durante todo o experimento). O RNA total foi extraído 6 horas após o final do estímulo luminoso. Os valores são apresentados como a média ( $n = 4-6$ )  $\pm$  EPM de expressão de cada gene normalizada pelo RNA 18S e expressos relativos aos respectivos controles em escuro constante. Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo estimulado por luz e respectivo controle no mesmo ponto temporal por ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

Em neurônios dos NSQ está bem estabelecido que os ciclos claro-escuro estimulam o aumento de AMPc, levando à ativação de PKA, o que leva ao aumento da transcrição de *Per1*, o qual promove o *reset* do relógio (Golombek e Resenstien, 2010).

Por isso, quantificamos a produção de AMPc 1, 5 e 10 min após estimulação dos melanóforos por luz azul. Como controle positivo, o ativador de adenilil ciclase forskolina, na concentração  $10^{-4}$  M, foi aplicado em escuro constante. Nossos resultados demonstraram que não há variação na concentração deste nucleotídeo após os tempos analisados (Figura

25), sugerindo fortemente que esta via de sinalização não participa da ativação dos genes do relógio por luz azul neste modelo.

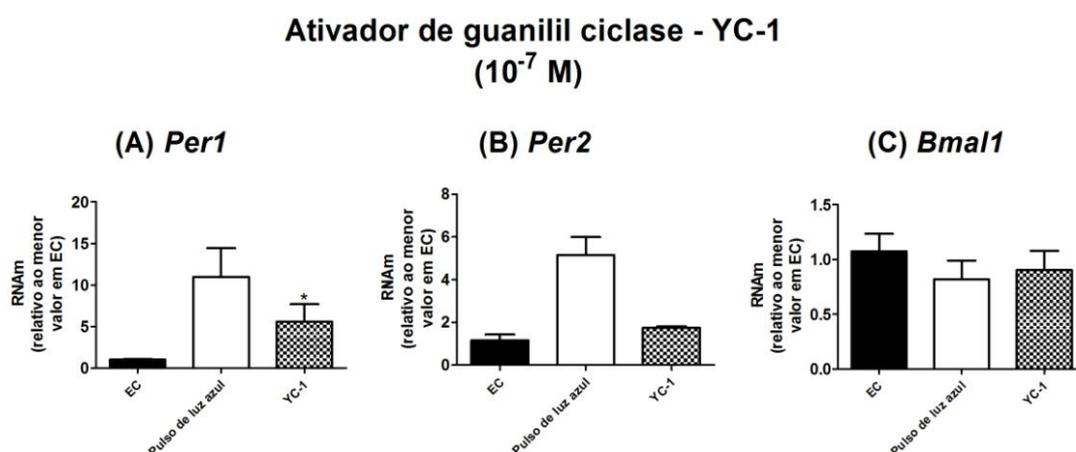


**Figura 25. Concentração de AMPc em Melanóforos de *Xenopus laevis*.** As células foram mantidas em EC e divididas em 3 grupos: (1) EC; (2) EC tratado com 10<sup>-4</sup> M de forscolina, ativador da adenilil ciclase (aplicado 30 min antes, permanecendo durante todo o experimento); (3) estimulado com luz azul por 1, 5 ou 10 min. Os valores são a média (n=3) da concentração de AMPc ± EPM. Asterisco indica diferença estatística em relação ao controle em escuro constante por ANOVA *one-way* seguida de teste de Tukey (p < 0,0001).

Outro importante mecanismo de sinalização que leva à estimulação de genes de relógio no NSQ é a via da proteína quinase G (PKG) (Golombek e Rosenstein, 2010). Neste caso, um pulso de luz dado no início ou no final da fase escura aumenta a concentração de cálcio intracelular, que ativa uma quinase dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina, CAMK II, a qual fosforila óxido nítrico sintase que, por sua vez, leva a ativação de guanilil ciclase, promovendo aumento de GMPc e consequente ativação de PKG. Em *Xenopus laevis*, o papel do GMPc ainda não havia sido elucidado. Para

solucionar essa questão utilizamos YC-1, ativador de guanilil ciclase, na concentração de  $10^{-7}$  M, sendo o RNAm quantificado após 6 horas de tratamento.

Analisamos a expressão de *Per1* e *Per2* uma vez que estes genes foram estimulados por luz, e objetivávamos mimetizar este efeito utilizando o ativador da guanilil ciclase. Para demonstrar que um eventual aumento da transcrição em resposta ao YC-1 fosse inespecífico, avaliamos também a expressão de *Bmal1*, já que este não havia apresentado variação após o pulso de luz azul. *Per1* apresentou um aumento da transcrição em resposta ao tratamento com YC-1 (Figura 26 A), enquanto este aumento não foi observado para *Per2* (Figura 26 B), ou para *Bmal1* (Figura 26 C).



**Figura 26. Expressão de *Per1* (A), *Per2* (B) e *Bmal1* (C) em Melanóforos de *Xenopus laevis* Estimulados com Pulso de Luz Azul ou YC-1.** As células foram mantidas em escuro constante por 4 dias e então divididas em 3 grupos: (1) mantido em escuro constante; (2) estimulado com luz azul por 10 min; (3) mantido em escuro constante e tratado com ativador de guanilil ciclase, YC-1,  $10^{-7}$  M (aplicado 30 min antes, permanecendo durante todo o experimento). O RNA total foi extraído 6 horas após o final do estímulo luminoso. Asterisco indica diferença estatística com relação ao controle em escuro por ANOVA *two-way*, seguida por teste de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Barras pretas, controle em EC; barras brancas, resposta temporal após estimulação luminosa; barras hachuradas, EC na presença de YC-1.

## 6. Expressão temporal dos genes de relógio *Per1*, *Per2*, *Clock* e *Bmal1* em melanóforos tratados com endotelina-3

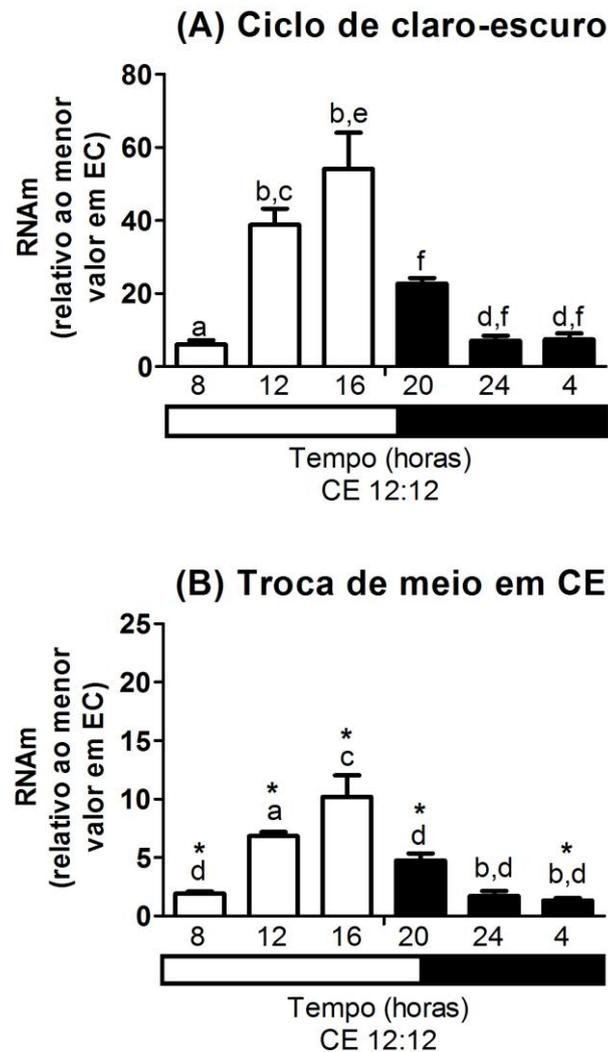
Os resultados apresentados abaixo tiveram como objetivo avaliar os efeitos da endotelina em diferentes condições de fotoperíodo sobre a expressão de genes de relógio em melanóforos de *X. laevis*. Estudos sobre a dinâmica de transcrição de genes do relógio em células tratadas com endotelina foram anteriormente realizados em nosso laboratório em *Danio rerio*, demonstrando que este hormônio atua de forma dose-dependente, e seu efeito varia conforme o gene analisado (Farhat et al., 2009).

Como já descrito anteriormente neste trabalho (Figura 19 A), um robusto padrão rítmico na expressão de *Per1* é induzido nos melanóforos submetidos a 12:12 CE, com maiores valores de RNAm durante a fase clara, evidenciado pela alta expressão às 12:00 e 16:00 horas. Quando as células sofreram trocas de meio nesta condição, a expressão do gene *Per1* mostrou-se inalterada, com maior transcrição na fase clara, apresentando um aumento gradual que se iniciou às 8:00 horas e continuou até as 16:00 horas (Figura 27 B), similar ao perfil que foi observado quando as células foram mantidas em CE sem nenhuma manipulação (Figura 19 A, repetida em 27 A).

Endotelina-3 na concentração  $10^{-8}$  M, além de diminuir a expressão de *Per1*, aboliu o perfil rítmico observado em 12:12 CE para este gene. Alterações pontuais podem ser observadas: um aumento na transcrição às 12:00 horas em comparação com os horários das 8:00 e 24:00 horas (Figura 28 A). Comparação realizada entre o grupo experimental e controle (troca de meio) evidenciou um avanço no pico de expressão de 16:00 para 12:00 horas, e um pequeno aumento da transcrição às 4:00 horas (Figura 28 B). Já na concentração mais baixa,  $10^{-9}$  M, o perfil de expressão é similar ao de 12:12 CE, apresentando dois pontos de maior transcrição, às 12:00 e 16:00 horas (Figura 28 C). A análise por ANOVA *two-way* claramente demonstra uma variação na transcrição de *Per1*,

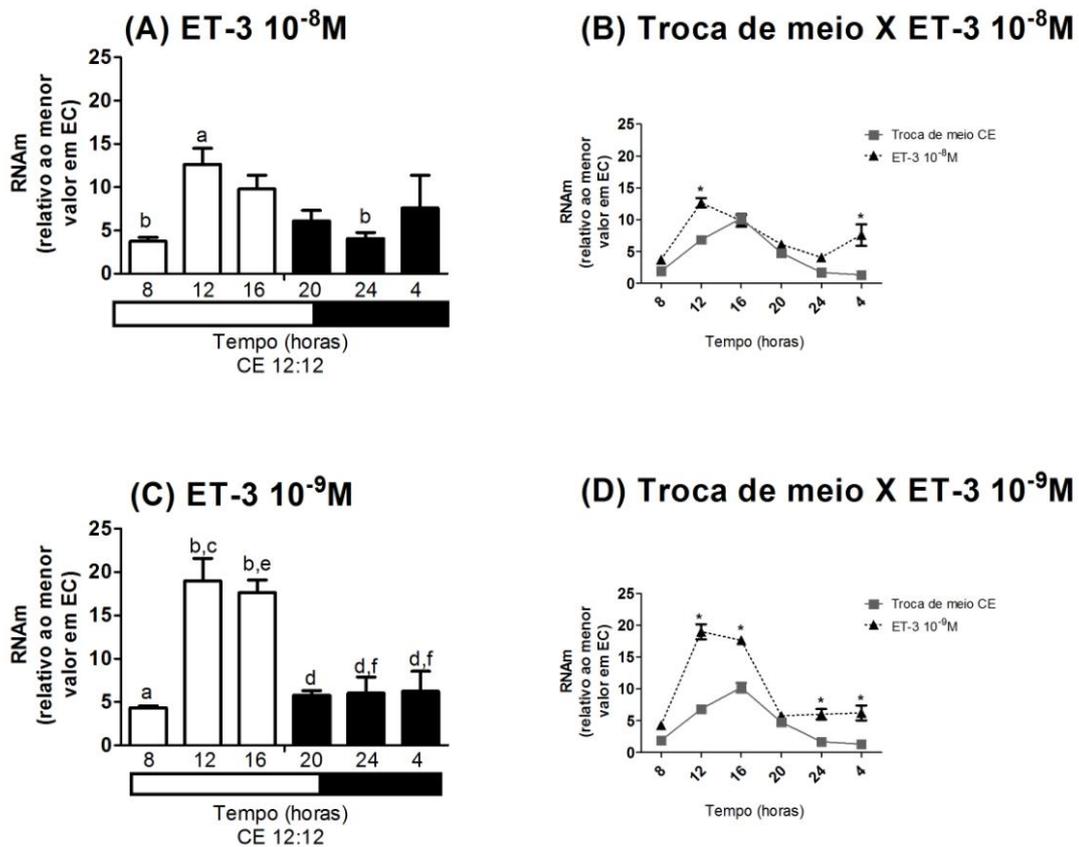
evidenciada pelo aumento às 12:00, 16:00, 24:00 e 4:00 horas em relação a seus respectivos controles temporais (Figura 28 D). Entretanto essa amplitude é menor, se comparada a células mantidas em 12:12 CE (Figura 27 A e B).

Interessantemente, o perfil de expressão de *Per1* em ciclo claro-escuro não se alterou depois de duas trocas de meio ou do tratamento com endotelina-3 na concentração  $10^{-9}$  M, entretanto a amplitude da resposta foi diminuída (Figura 27 A e B, 28 D). Em 12:12 CE sem manipulação, foi observado um aumento da transcrição de 80x (Figura 27 A), que é reduzido para 10x com trocas de meio (Figura 27 B), para 15x com o tratamento com endotelina-3  $10^{-8}$  M (Figura 28 C) ou  $10^{-9}$  M (Figura 28 D) (comparação feita entre os pontos de maior expressão em CE e os diferentes tratamentos).

***Per1***

**Figura 27. Expressão de *Per1* em Ciclo Claro-Escuro em Melanóforos Submetidos a Trocas de Meio.** (A) Melanóforos mantidos 5 dias em 12:12 CE (n=4-6); (B) Melanóforos mantidos 5 dias em 12:12 CE, sendo submetidos no sexto dia a duas trocas de meio (n= 4-6 frascos). O RNA total foi extraído por 24 horas a cada 4 horas, iniciando às 8:00 horas, para análise da expressão gênica por PCR quantitativo. Valores são apresentados como a média  $\pm$  EPM da expressão do gene *Per1* normalizada por RNA 18S, expressos em relação ao menor valor em escuro constante (Figura 19 A). Letras significam diferenças estatísticas (*a* diferente de *b*; *c* diferente de *d*; *e* diferente de *f*) ( $p < 0,05$ , ANOVA *one-way* seguida por teste de Tukey). Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo não manipulado e grupo que recebeu trocas de meio (ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni  $p < 0,05$ ).

*Per1*

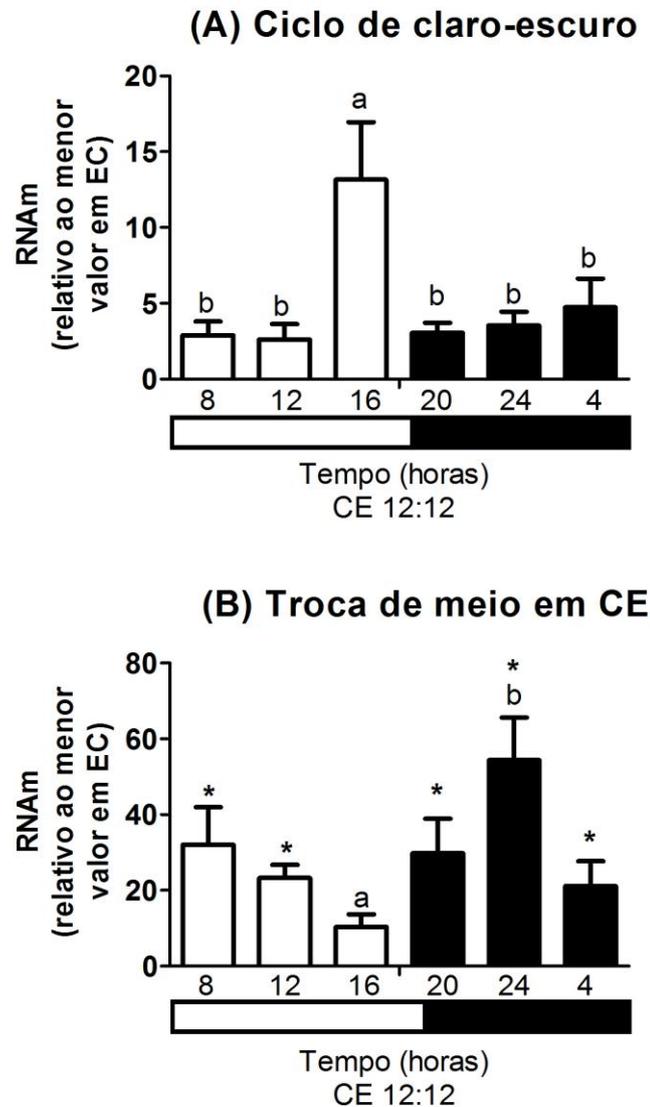


**Figura 28. Expressão de *Per1* em Ciclo Claro-Escuro em Melanóforos Tratados com Endotelina-3.** Células foram mantidas por 6 dias em 12:12 CE. No sexto dia, os melanóforos foram tratados com (A e B) endotelina-3 10<sup>-8</sup> M por 6 horas (n=4-6) ; (C e D) endotelina-3 10<sup>-9</sup> M por 6 horas (n = 3-6). Após 6 horas de tratamento, o meio foi trocado para remoção do hormônio. O RNA total foi por 24 horas a cada 4 horas, iniciando às 8:00 horas, para análise da expressão gênica por PCR quantitativo. Valores são apresentados como a média ± EPM da expressão do gene *Per1* normalizada por RNA 18S, expressos em relação ao menor valor em escuro constante (Figura 19 A). Letras significam diferenças estatísticas (*a* diferente de *b*; *c* diferente de *d*; *e* diferente de *f*) ( $p < 0,05$ , ANOVA *one-way* seguida por teste de Tukey). Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo tratado com endotelina-3 e respectivo controle com trocas de meio (ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni  $p < 0,05$ ).

Diferente do que foi observado para *Per1*, a expressão de *Per2* não apresentou perfil rítmico em melanóforos submetidos a ciclo claro-escuro (Figura 19 B, repetida em 29 A), entretanto é possível observar uma variação na transcrição ao longo das 24 horas, com um pico de expressão às 16:00 horas. Quando as células receberam duas trocas de meio, o pico de expressão foi alterado das 16:00 para as 24:00 horas, destacando que nesta condição o horário de menor expressão ocorreu às 16:00 horas (Figura 29 B).

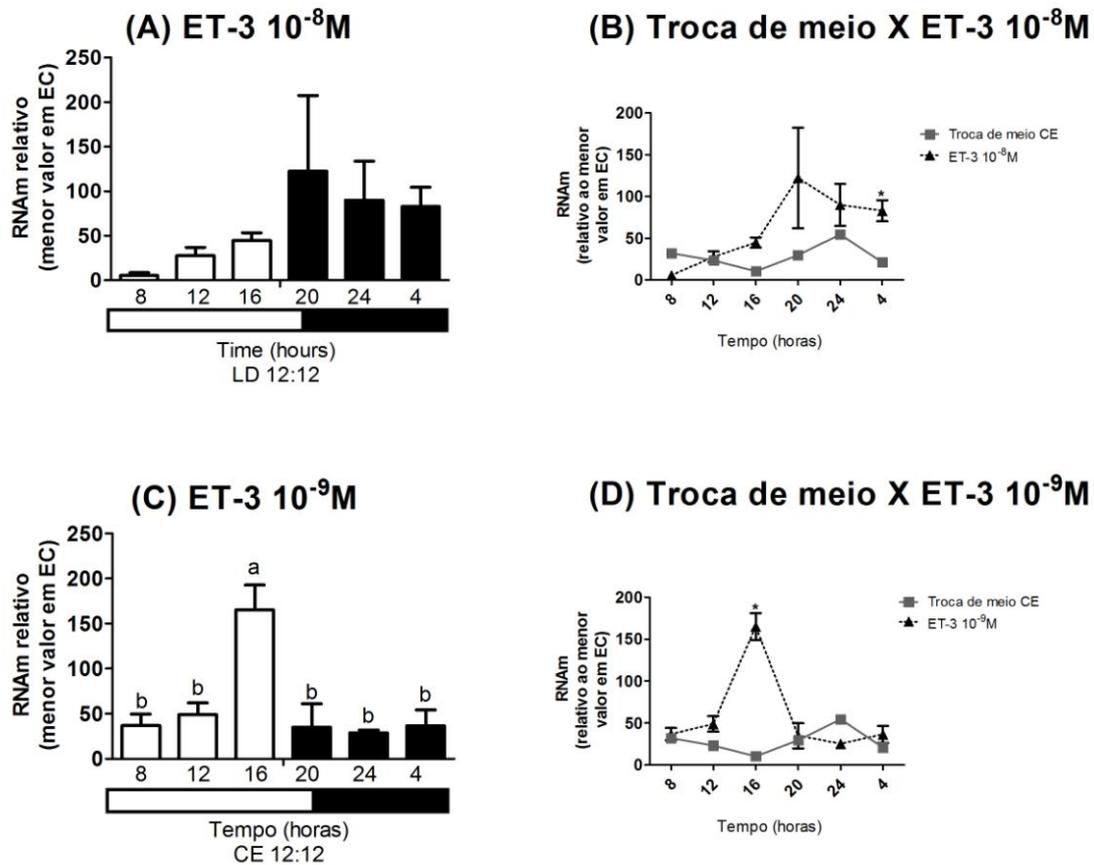
O tratamento com endotelina-3  $10^{-9}$  M promoveu uma forte ativação da transcrição de *Per2*, mostrando níveis de RNAm com um aumento de 200x em relação ao ponto de menor expressão (Figura 30 C) e em relação ao seu respectivo controle (trocas de meio) (Figura 30 D). Interessantemente, o tratamento nesta concentração restabelece o perfil de expressão visto em 12:12 CE, pois após o tratamento com endotelina-3  $10^{-9}$  M é possível observar um pico no mesmo horário (16:00 horas). Por outro lado, tratamento com a maior concentração parece não alterar o perfil ou amplitude de maneira significativa (Figura 30 A e B).

*Per2*



**Figura 29. Expressão de *Per2* em Ciclo Claro-Escuro em Melanóforos Submetidos a Trocas de Meio.** (A) Melanóforos mantidos 5 dias em 12:12 CE (n=4-6); (B) Melanóforos mantidos 5 dias em 12:12 CE, sendo submetidos no sexto dia a duas trocas de meio (n= 4-6 frascos). O RNA total foi extraído por 24 horas a cada 4 horas, iniciando às 8:00 horas, para análise da expressão gênica por PCR quantitativo. Valores são apresentados como a média ± EPM da expressão do gene *Per2* normalizada por RNA 18S, expressos em relação ao menor valor em escuro constante (Figura 19 B). Letras significam diferenças estatísticas (*a* diferente de *b*) ( $p < 0,05$ , ANOVA *one-way* seguida por teste de Tukey). Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo não manipulado e grupo que recebeu trocas de meio (ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni  $p < 0,05$ ).

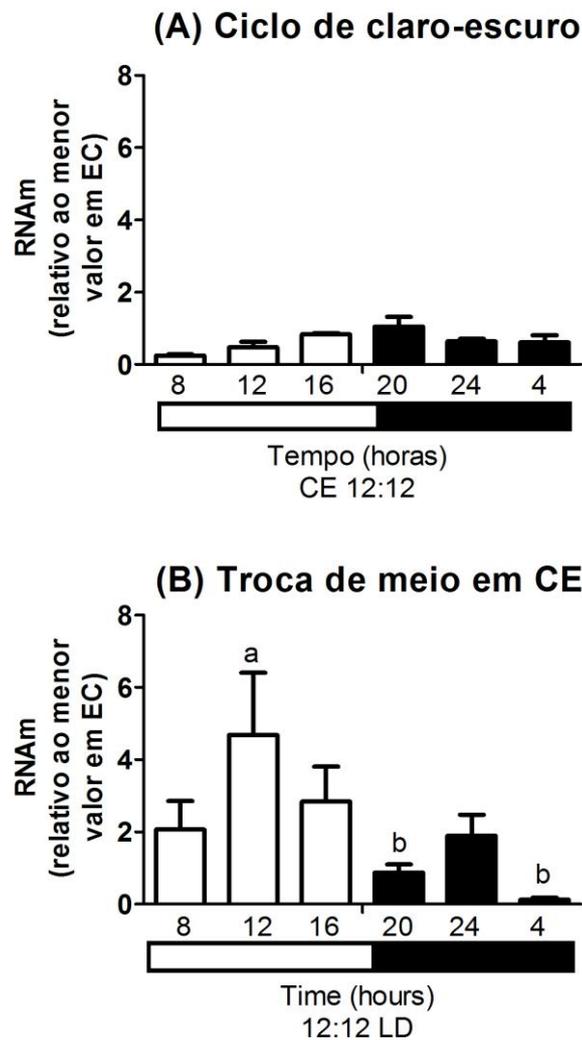
*Per2*



**Figura 30. Expressão de *Per2* em Ciclo Claro-Escuro em Melanóforos Tratados com Endotelina-3.** Células foram mantidas por 6 dias em 12:12 CE. No sexto dia, os melanóforos foram tratados com (A e B) endotelina-3 10<sup>-8</sup> M por 6 horas (n=4-6) ; (C e D) endotelina-3 10<sup>-9</sup> M por 6 horas (n = 3-6). Após 6 horas de tratamento, o meio foi trocado para remoção do hormônio. O RNA total foi extraído por 24 horas a cada 4 horas, iniciando às 8:00 horas, para análise da expressão gênica por PCR quantitativo. Valores são apresentados como a média ± EPM da expressão do gene *Per2* normalizada por RNA 18S, expressos em relação ao menor valor em escuro constante (Figura 19 B). Letras significam diferenças estatísticas (*a* diferente de *b*) (*p*<0,05, ANOVA *one-way* seguida por teste de Tukey). Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo tratado com endotelina-3 e respectivo controle com trocas de meio (ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni *p* < 0,05).

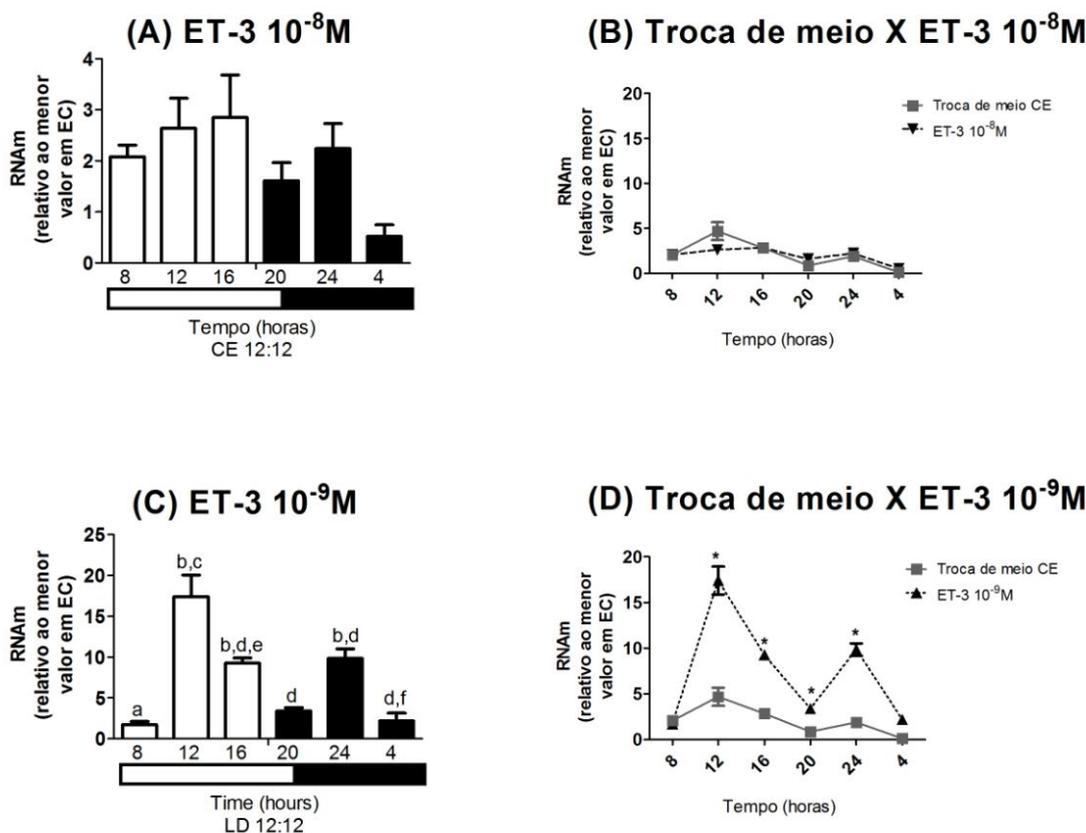
Claramente o ciclo claro-escuro não exerce influência sobre a expressão de *Clock*, uma vez que nenhuma variação na transcrição pode ser detectada em células mantidas em 12:12 CE por 5 dias (Figura 19 C, repetida em 31 A). Entretanto, após duas trocas de meio, uma alteração na transcrição ao longo do tempo é evidenciada. O ponto de maior expressão de *Clock* ocorre às 12:00 horas em comparação aos horários das 20:00 e 4:00 horas, e dessa forma um perfil rítmico é observado com maiores expressões na fase clara (Figura 31 B).

O tratamento com endotelina  $10^{-8}$  M não exerceu efeito algum sobre a transcrição de *Clock*, seja ao longo do tempo (Figura 32 A) ou em relação a seu controle (Figura 32 B). Entretanto, o tratamento com endotelina-3 na concentração  $10^{-9}$  M induziu um efeito bifásico sobre a expressão de *Clock*, mostrando aumento da transcrição às 12:00 e 24:00 horas quando comparado aos horários de menor expressão, 4:00, 8:00 e 20:00 horas (Figura 32 C). Em relação a seu controle, é possível observar um aumento na transcrição às 12:00, 16:00, 20:00 e 24:00 horas (Figura 32 D).

***Clock***

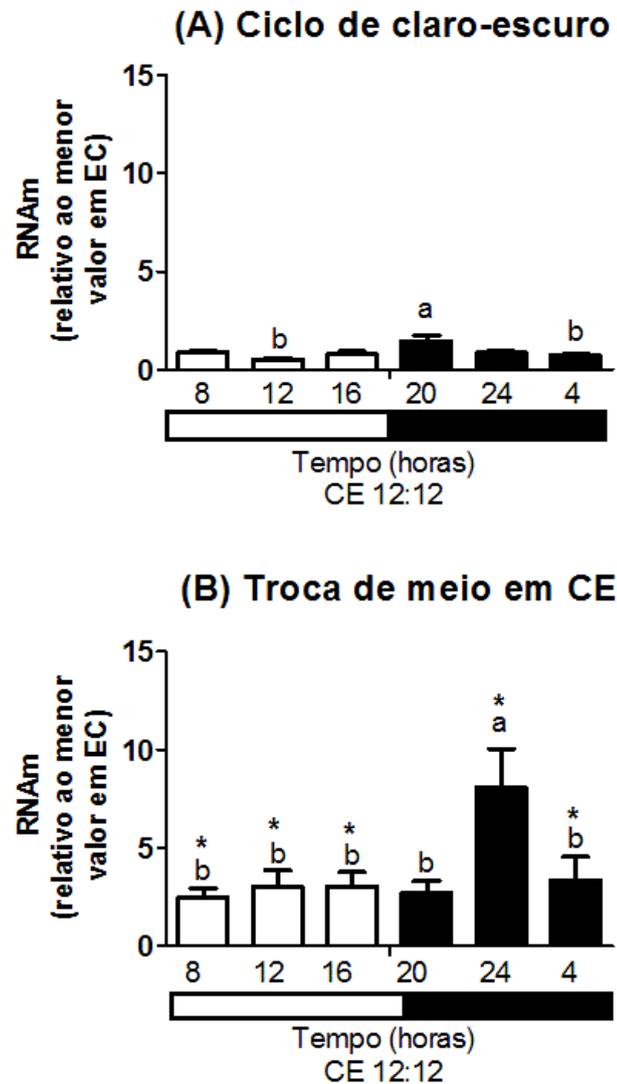
**Figura 31. Expressão de *Clock* em Ciclo Claro-Escuro em Melanóforos Submetidos a Trocas de Meio.** (A) Melanóforos mantidos 5 dias em 12:12 CE (n=4-6); (B) Melanóforos mantidos 5 dias em 12:12 CE, sendo submetidos no sexto dia a duas trocas de meio (n= 4-6 frascos). O RNA total foi extraído por 24 horas a cada 4 horas, iniciando às 8:00 horas, para análise da expressão gênica por PCR quantitativo. Valores são apresentados como a média  $\pm$  EPM da expressão do gene *Clock* normalizada por RNA 18S, expressos em relação ao menor valor em escuro constante (Figura 19 C). Letras significam diferenças estatísticas (*a* diferente de *b*) ( $p < 0,05$ , ANOVA *one-way* seguida por teste de Tukey). Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo não manipulado e grupo que recebeu trocas de meio (ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni  $p < 0,05$ ).

**Clock**



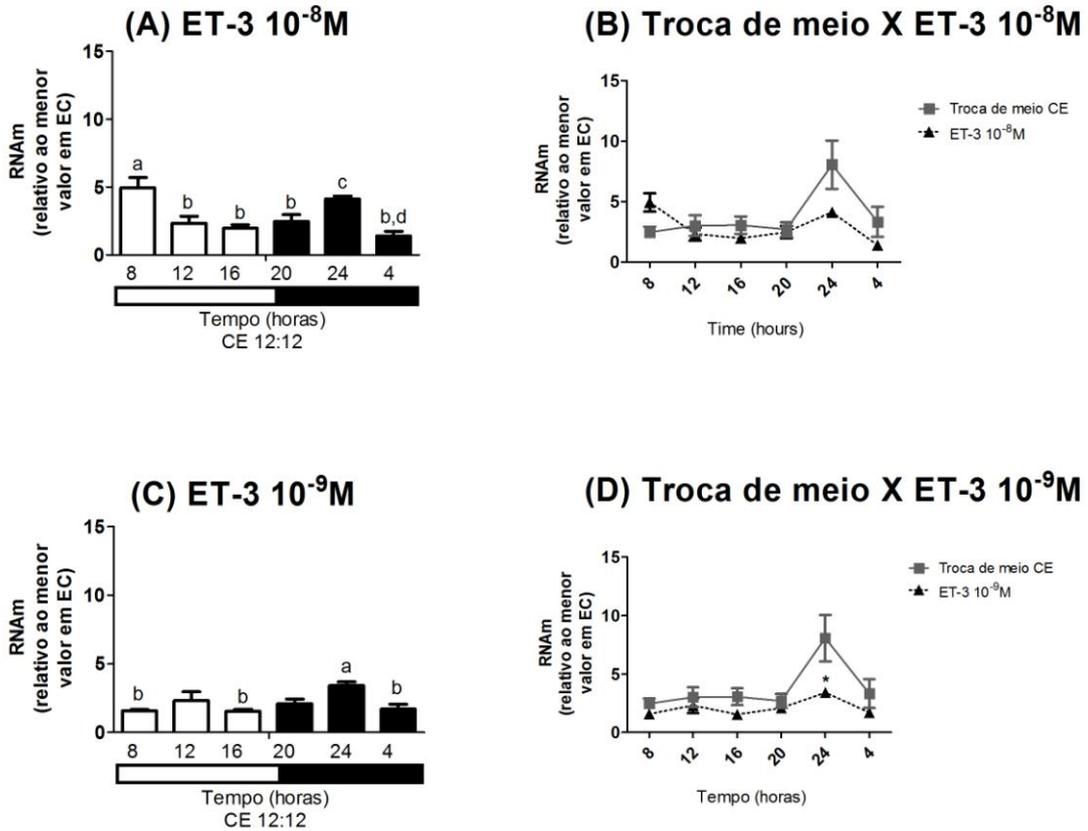
**Figura 32. Expressão de *Clock* em Ciclo Claro-Escuro em Melanóforos Tratados com Endotelina-3.** Células foram mantidas por 6 dias em 12:12 CE. No sexto dia, os melanóforos foram tratados com (A e B) endotelina-3 10<sup>-8</sup> M por 6 horas (n=4-6) ; (C e D) endotelina-3 10<sup>-9</sup> M por 6 horas (n = 3-6). Após 6 horas de tratamento, o meio foi trocado para remoção do hormônio. O RNA total foi extraído por 24 horas a cada 4 horas, iniciando às 8:00 horas, para análise da expressão gênica por PCR quantitativo. Valores são apresentados como a média ± EPM da expressão do gene *Clock* normalizada por RNA 18S, expressos em relação ao menor valor em escuro constante (Figura 19 C). Letras significam diferenças estatísticas (*a* diferente de *b*; *c* diferente de *d*; *e* diferente de *f*) (*p*<0,05, ANOVA *one-way* seguida por teste de Tukey). Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo tratado com endotelina-3 e respectivo controle com trocas de meio (ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni *p* < 0,05).

Similar ao que foi visto para *Clock*, a expressão de *Bmal1* em fotoperíodo 12:12 CE parece não sofrer forte influência do ciclo claro-escuro. Uma pequena variação no RNAm foi observada ao longo do tempo, com maior expressão às 20:00 horas em comparação com 12:00 e 4:00 horas (Figura 33 A). Após as trocas de meio foi possível identificar um pico de expressão às 24:00 horas em relação aos demais horários e também um aumento da transcrição em todos os horários analisados em relação ao grupo não manipulado submetido a ciclo claro-escuro, exceto no horário das 20:00 horas (Figura 33 B). O tratamento com endotelina-3 evocou pequenas variações na transcrição de *Bmal1* nas duas doses analisadas. Na maior dose,  $10^{-8}$  M, o horário de maior expressão foi às 8:00 horas, seguido por 24:00 horas (Figura 34 A), mas nenhuma variação do perfil foi evidenciada pela análise por ANOVA *two-way* em relação ao controle (Figura 34 B). Na concentração de  $10^{-9}$  M, foi observado um pequeno aumento às 24 horas em relação às 8:00, 16:00 e 4:00 (Figura 34 C). Similar ao observado para a outra dose, nenhuma variação do perfil foi evidenciada através da análise por ANOVA *two-way* (Figura 34 D).

***Bmal1***

**Figura 33. Expressão de *Bmal1* em Ciclo Claro-Escuro em Melanóforos Submetidos a Trocas de Meio.** (A) Melanóforos mantidos 5 dias em 12:12 CE (n=4-6); (B) Melanóforos mantidos 5 dias em 12:12 CE, sendo submetidos no sexto dia a duas trocas de meio (n= 4-6 frascos). O RNA total foi extraído por 24 horas a cada 4 horas, iniciando às 8:00 horas, para análise da expressão gênica por PCR quantitativo. Valores são apresentados como a média  $\pm$  EPM da expressão do gene *Bmal1* normalizada por RNA 18S, expressos em relação ao menor valor em escuro constante (Figura 19 D). Letras significam diferenças estatísticas (*a* diferente de *b*) ( $p < 0,05$ , ANOVA *one-way* seguida por teste de Tukey). Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo não manipulado e grupo que recebeu trocas de meio (ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni  $p < 0,05$ ).

**Bmal1**

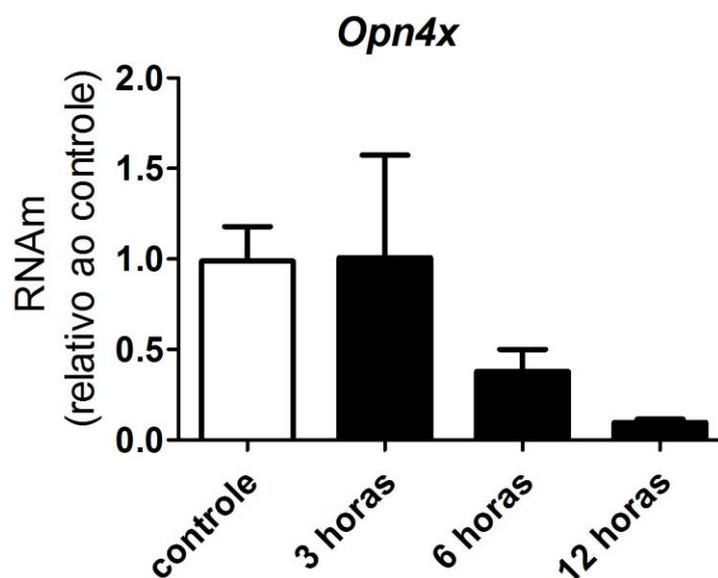


**Figura 34. Expressão de *Bmal1* em Ciclo Claro-Escuro em Melanóforos Tratados com Endotelina-3.** Células foram mantidas por 6 dias em 12:12 CE. No sexto dia, os melanóforos foram tratados com (A e B) endotelina-3 10<sup>-8</sup> M por 6 horas (n=4-6) ; (C e D) endotelina-3 10<sup>-9</sup> M por 6 horas (n = 3-6). Após 6 horas de tratamento, o meio foi trocado para remoção do hormônio. O RNA total foi extraído por 24 horas a cada 4 horas, iniciando às 8:00 horas, para análise da expressão gênica por PCR quantitativo. Valores são apresentados como a média ± EPM da expressão do gene *Bmal1* normalizada por RNA 18S, expressos em relação ao menor valor em escuro constante (Figura 19 D). Letras significam diferenças estatísticas (*a* diferente de *b*; *c* diferente de *d*) (p<0,05, ANOVA *one-way* seguida por teste de Tukey). Asteriscos representam diferenças significativas entre grupo tratado com endotelina-3 e respectivo controle com trocas de meio (ANOVA *two-way* seguida de teste de Bonferroni p < 0,05).

### 7. Silenciamento da melanopsina *Opn4x*

A dificuldade de transfecção de células de organismos não mamíferos constitui em si um obstáculo para o silenciamento. Vários métodos de transfecção como eletroporação, choque de cálcio, lipofectamina e até a utilização de nanotubos de carbono de acordo com tecnologia desenvolvida na UFMG em colaboração com a Profa. Dra. Maristela Poletini foram ineficientes na linhagem de melanóforos de *Xenopus laevis*. Entretanto o *kit GenMute* da empresa SignaGen mostrou-se eficiente na transfecção para este tipo celular e também em outras linhagens de não mamíferos em nosso laboratório. Possuímos 4 oligonucleotídeos (siRNA) para o silenciamento de *Opn4x*.

Três, 6 e 12 horas após a transfecção dos 4 siRNA de *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis*, foi quantificada a expressão dessa opsina por PCR quantitativo, evidenciando que a transfecção dessas células com os quatro siRNAs ao mesmo tempo, cada um na concentração de 50 nM, foi capaz de promover o silenciamento de *Opn4x* 12 horas após a transfecção (Figura 35).



**Figura 35. Silenciamento de *Opn4x* em Melanóforos de *Xenopus laevis* Transfectados com siRNAs.** A transfecção foi realizada no terceiro dia de cultivo e a expressão relativa de *Opn4x* analisada 3, 6 e 12 horas após transfecção. Cada barra corresponde a média  $\pm$  EPM (n=3) relativa ao valor do controle. Barra branca, grupo controle, na ausência do siRNA; barras pretas, grupo experimental, transfectado com siRNA.

# DISCUSSÃO

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

### 1. Melanóforos de *Xenopus*: modelo de relógio periférico

Os melanóforos de *Xenopus laevis* têm sido amplamente utilizados em estudos hormonais, ensaios farmacológicos, migração pigmentar e vias de sinalização celular (Salin e Ali, 2011). Entretanto até há alguns anos nenhum desses estudos considerava o papel dos genes do relógio nesses processos fisiológicos. A partir da descoberta da melanopsina (Provencio et al., 1998) essa abordagem foi incluída nos estudos e hoje temos mais dados disponíveis na literatura sobre a organização do sistema circadiano em *Xenopus*, os quais serão amplamente discutidos neste trabalho. Além da fantástica característica de migração dos grânulos de melanina pelo citoplasma da célula, que pode ser observada visualmente, os melanóforos apresentam-se como um excelente modelo de estudo de relógio periférico, uma vez que possuem um sistema de detecção de luz (melanopsina), genes de relógio (Bluhm et al., 2012; Moraes et al., 2014b) e genes controlados pela maquinaria dos genes de relógio, conhecidos como *clock-controlled genes* (Murre et al., 1989; Bentley et al., 1994; Camp et al., 2003; Murisier e Beermann, 2006).

Foi demonstrado que culturas de células podem ser sincronizadas independentemente de um oscilador central. Fibroblastos de camundongo foram sincronizados por choque de soro (Balsalobre et al., 1998) e células de *Danio rerio* foram sincronizadas por luz (Whitmore et al., 2000). Dois trabalhos mostraram que células em cultura agem como populações, onde cada célula individual tem seu ritmo próprio na ausência de um estímulo. Porém quando estimuladas, todas as células assumem a mesma fase de oscilação, sincronizando toda a população e dando origem aos ritmos observados. Na ausência de estímulo, o ritmo populacional é perdido gradualmente, o que explica a perda de ritmo nos relógios periféricos quando colocados em condições constantes (Welsh et al., 2004; Carr e Whitmore, 2005). Esses trabalhos evidenciam a precisa comunicação que deve existir entre osciladores centrais e periféricos na manutenção da homeostase do organismo. Em

organismos e/ou células que são diretamente fotossensíveis e dessa forma os relógios periféricos podem ser sincronizados por luz, o impacto dessa comunicação pode ser ainda maior, o que torna o estudo sobre o mecanismo de funcionamento dos relógios periféricos uma questão de grande importância.

O sistema circadiano que controla a geração do ritmo nos vertebrados é composto por três diferentes estruturas as quais possuem conexões umas com as outras, e dessa maneira formam o eixo circadiano central que parece ser comum a todos os vertebrados. Essas três estruturas são a retina, o complexo pineal (pineal e olho/órgão parietal) e o núcleo supraquiasmático do hipotálamo ou regiões homólogas. Cada uma delas aparentemente estaria envolvida no controle da ritmicidade circadiana e/ou conteriam um oscilador próprio que é capaz de sustentar essa ritmicidade *in vitro* (Menaker et al., 1997). Inicialmente pensava-se que apenas as retinas de *Xenopus laevis* (Besharse e Iuvone, 1983) e de *Gallus gallus* (Pierce et al., 1993) em cultura apresentavam oscilação circadiana; entretanto hoje se sabe que a retina de outros animais incluindo mamíferos possuem essa característica (Menaker e Tosini, 1996; Tosini e Menaker, 1996).

Alguns estudos anteriores revelaram que muitos aspectos da fisiologia visual são controlados por um relógio circadiano (Besharse e Iuvone, 1983; Cahill e Besharse, 1993, Green et al., 1995). A partir de então este sistema tem sido extensivamente analisado no que diz respeito a ritmicidade *in vitro* e se sabe que os fotorreceptores (cones e bastonetes) de *X. laevis* contêm um relógio circadiano que controla a síntese e liberação de melatonina (Cassone, 1998).

Zhuang e colaboradores (2000) demonstraram, pela primeira vez, que *Per1* e *Per2* são ritmicamente expressos na retina de *X. laevis in vivo* sob estímulo de ciclos claro-escuro. Análise de *Per2* em 12:12 CE mostrou uma expressão 8 vezes maior durante a fase de claro quando comparada à do escuro. Animais submetidos a luz constante apresentaram

valores elevados de transcrição (valores similares ao observado no pico de expressão de animais mantidos em CE), os quais se mantinham altos durante a noite subjetiva. Em contraste, em escuro constante nenhuma variação foi observada para *Per2*. Para descartar que a ausência de um ritmo em escuro constante fosse devida a uma arritmicidade do tecido, foi analisada a expressão de outros genes e demonstrado que TPH (triptofano hidroxilase), um gene controlado pelo relógio apresentava um ritmo de transcrição. Por outro lado, *Per1* apresentava um ritmo de expressão tanto em escuro constante quanto em ciclo claro-escuro, sendo considerado um gene circadiano enquanto *Per2* exibia um ritmo diurno disparado pela luz (Zhuang et al., 2000). Uma análise similar na retina de *X. laevis* mostrou que, dentre todos os genes da família dos Criptocromos, somente *Cry1* exibia um robusto ritmo em ciclo CE e que todos os *Crys* (*Cry1*, *Cry2a* and *Cry2b*) apresentavam oscilação da transcrição entretanto com baixa amplitude quando submetidos a escuro constante (Zhu e Green, 2001).

Neste trabalho demonstramos que variações na transcrição dos genes do relógio em melanóforos de *X. laevis* em cultura requererem exposição a ciclos claro-escuro. *Per1*, *Per2* e *Bmal1* apresentam variação temporal exclusivamente em CE, entretanto um robusto ritmo circadiano é observado somente para *Per1*, o qual apresenta forte ativação da transcrição durante a fase de claro, com um aumento de aproximadamente 80x em relação a células mantidas em EC. Similar ao que foi visto na retina de *X. laevis* (Zhuang et al., 2000), *Per2* apresenta um pico de expressão durante a fase de claro, sendo neste modelo também considerado um gene induzido por luz. Nossos resultados provenientes de estimulação por luz azul corroboram essa hipótese, uma vez que somente os genes *Per1* e *Per2* foram ativados nesta condição. Experimentos *in vitro* com retina sincronizada de *Xenopus* demonstraram que 3 horas de luz ou tratamento com dopamina nos ZTs 0, 2, 10

ou 18 induzem a expressão de *Per2*, dobrando os níveis do transcrito, enquanto que *Per1* é também induzido, entretanto fracamente, no ZT2 (Steenhard e Besharse, 2000).

A retina de *Xenopus laevis* contém um relógio independente e que pode ser diretamente ajustado pela luz. Neste tecido, os genes *Cry* são expressos predominantemente nas células fotorreceptoras, diferente do que é observado para mamíferos, onde os genes *Cry* são expressos exclusivamente nas camadas de células ganglionares e camada nuclear interna (Miyamoto e Sancar, 1998). Similarmente outros genes de relógio são expressos também nas células fotorreceptoras como *Clock* (Zhu et al., 2000) e *Bmal1* (Anderson et al., 2001). Em adição, outros tecidos de *Xenopus* também expressam os genes de relógio (Zhuang et al., 2000; Zhu e Green, 2001), dentre eles a pele. Esses resultados somados aos achados deste trabalho suportam a ideia da presença de uma completa e funcional maquinaria molecular de genes de relógio não somente em osciladores centrais, mas também em tecidos periféricos de *Xenopus*.

Nossos resultados mostram que o gene *Clock* é constitutivamente expresso nos melanóforos de *Xenopus*, sendo este gene inalterado pelo ciclo claro-escuro, escuro constante ou pulso de luz. Similarmente, estudos *in vitro* usando olhos em cultura também demonstraram que a expressão do RNAm de *Clock* é constante em CE ou EC (Zhu et al., 2000). Embora *Clock* seja constitutivamente expresso, sua ausência leva a perda da ritmicidade da produção de melatonina na retina (Hayasaka et al., 2002), portanto sua expressão é essencial para sustentar a ritmicidade na retina de *Xenopus laevis*.

No peixe *Danio rerio*, a luz possui um papel de acoplador dos relógios presentes nos tecidos periféricos e também em células em cultura (Whitmore et al., 2000). É importante mencionar que este animal possui quatro genes *Per* (*per1a*, *per1b*, *per2* e *per3*), e seis genes *Cry* (*cry1a*, *cry1b*, *cry2a*, *cry2b*, *cry3* e *cry4*), sendo todos arrastados por luz. Análises de arrastamento fótico utilizando células Z3 e PAC2 de *Danio* sugerem um papel

predominante de *per2* como um gene induzível por luz responsável pelo *reset* do relógio (Cermakian et al., 2002; Hirayama et al., 2003). Por outro lado, utilizando as mesmas células PAC2, foi demonstrado que *per1* é reprimido por luz trabalhando como um dos principais parceiros do gene *cry* na alça negativa da maquinaria do relógio que inibe o heterodímero CLOCK:BMAL1 (Vallone et al., 2004). Farhat e colaboradores (2009) demonstraram que em células ZEM-2S de *Danio*, a expressão de *per1* e *cry1b* é sincronizada pelo ciclo claro-escuro, contrário ao que foi proposto em células PAC2 onde *per1* é reprimido por luz e *per2* responsável pelo *reset* do relógio (Vallone et al., 2004). Em adição, em células ZEM-2S, *per2* é diretamente induzível por luz (Vatine et al., 2011; Ramos et al., 2014), enquanto que *per1b* e *cry1b* foram levemente modulados por este estímulo (Ramos et al., 2014). Esses dados podem ser interpretados com base nos experimentos realizados por Gavriouchkina e colaboradores (2010) que demonstraram que uma subfamília PAR (*proline- and acidic amino acid-rich*) composta por fatores de transcrição incluindo TEF (*thyrotroph embryonic factor*) e DBP (*D-site binding protein*) atuam como fatores de transcrição que regulam a expressão de genes que são diretamente induzidos por luz em células embrionárias de *Danio rerio*. Assim, a estimulação de uma molécula fotorreceptora por luz leva a ativação de TEF, o qual promove a transcrição de *per2* e *cry1a* através de sua ligação ao elemento D-box e assim promovendo o *reset* do relógio (Vattine et al., 2011).

Em *Xenopus*, o ciclo claro-escuro sincroniza a expressão de *Per1*, mas não de *Per2*, e o pulso de luz azul promove um aumento na transcrição de *Per1* e *Per2*. O papel fisiológico do rápido aumento desses genes em resposta a luz azul permanece em aberto, todavia alguns trabalhos mostraram que o gene *Per2* possui um papel fundamental na sincronização do relógio em resposta a luz em *Xenopus* e *Danio*. O gene *Per2* parece estar

envolvido com o início da sincronização por luz da glândula pineal (Ziv e Gothilf, 2006) em *Danio* e da retina (Zhu e Green, 2001) em *Xenopus*.

É importante destacar que todos os estudos acima mencionados com células Z3 e PAC2 de *Danio* (Cermakian et al., 2002; Hirayama et al., 2003, Vallone et al., 2004) foram conduzidos com 15% de soro fetal bovino, enquanto que em células ZEM-2S o soro foi reduzido para 2% em todos os protocolos experimentais (Farhat et al., 2009; Ramos et al., 2014). Deste modo, uma possibilidade que poderia explicar as diferenças de respostas na indução dos genes *Per* por luz em nossos experimentos com melanóforos de *Xenopus* em relação às células Z3 e PAC2 de *Danio rerio* que são também responsivas a luz, pode ser devido ao fato de que em nossos experimentos o soro foi reduzido para 2%, e isso poderia de alguma forma levar a uma regulação diferente do gene *Per2*, uma vez que foi demonstrado que soro em altas concentrações pode atuar como sincronizador da expressão de genes de relógio (Balsalobre et al., 1998).

*Per1* parece ser o responsável pelo arrastamento da maquinaria molecular do relógio nos melanóforos de *Xenopus*, uma vez que a expressão desse gene é fortemente afetada pelo pulso de luz azul (RNAm de *Per* aumentou cerca de 15 vezes depois do pulso de luz azul). Reforçando essa possibilidade, nosso laboratório demonstrou previamente que em *X. laevis*, independente da duração da fase clara (14:10 CE), altos níveis de *Per1* são sustentados durante o período de luz (Bluhm et al., 2012). Um paralelo entre os resultados apresentados aqui e os dados de Bluhm e colaboradores mostram diferenças na transcrição dos genes *Per2* e *Bmal1*, provavelmente devido a diferenças nos protocolos experimentais: trocas de meio e 14:10 CE, Bluhm et al., 2012, ausência de troca de meio e 12:12 CE, este trabalho. Como os melanóforos utilizados neste trabalho foram mantidos sem nenhum tipo de manipulação, o único agente sincronizador desta cultura poderia ser a luz proveniente do ciclo claro-escuro ou do pulso de luz azul. Dessa forma, nós acreditamos que o aumento

da transcrição do gene *Per1* ocorre em resposta à luz, independente se a fonte é o ciclo claro-escuro ou o pulso de luz, e predominante sobre outras pistas ambientais. Já para a expressão de *Per2* e *Bmal1*, a luz parece não ser suficiente (resultados apresentados aqui) e existe a necessidade de outro *zeitgeber*, como por exemplo a troca de meio (Blumh et al., 2012, este trabalho).

Nossos resultados mostram que a expressão de *Per1* aumenta mais cedo que *Per2* após estimulação por luz azul. Em adição, o aumento do RNAm dos genes *Per* em CE é observado somente durante a fase de luz. Estes dados sugerem que o efeito da luz no fotoarrastamento poderia ser mediado por uma opsina que é ativada no comprimento de onda do azul (estimulação com 450-475 nm induziu aumento de *Per1* e *Per2*), afetando a expressão de *Per1*. Todos os outros componentes do relógio seriam então alterados em resposta a ativação primária de *Per1*.

Estudo dos genes de relógio em cultura de Rat-1 (Welsh et al., 2004) e PAC2 de *Danio* (Carr e Whitmore, 2005) através da análise de células individuais mostrou que o amortecimento do ritmo em células em cultura ocorre após alguns ciclos devido a perda de acoplamento entre as células, levantando a questão “quanto tempo é necessário para a perda de oscilação na cultura?”. Dados da literatura mostram que o tempo parece ser dependente da espécie, do tecido e do gene analisado (Carr e Whitmore, 2005; Welsh et al., 2004; 2005). Neste estudo, os melanóforos foram mantidos em EC por 5 dias. O fato de que não observamos nenhuma variação nesta condição, mas que CE dispara um padrão oscilatório indica que a luz é um poderoso agente acoplador, trazendo a população celular para a mesma fase.

A luz no comprimento de onda de 460 nm estimula um fotopigmento, possivelmente melanopsinas (ou uma delas) em melanóforos de *Xenopus*, levando à dispersão de grânulos de melanina no citoplasma (Isoldi et al., 2005). Nós demonstramos aqui que um pulso de

luz azul de 450-475 nm, o comprimento de onda que estimula melanopsinas, criptocromos e/ ou *teleost multiple tissue opsin (TMT)*, aumenta a expressão de *Per1* e *Per2*; sendo assim, é muito provável que um destes fotopigmentos seja responsável pela transdução de luz para o relógio biológico nos melanóforos.

O envolvimento de um fotorreceptor de luz azul na indução de *per2* também foi demonstrado nas células Z3 (Cermakian et al., 2002) e ZEM-2S (Ramos et al., 2014) de *Danio*, sugerindo a participação das melanopsinas, criptocromos ou TMTs nesta resposta. A participação dos criptocromos como molécula fotorreceptora foi descartada após a constatação de que esta proteína age diretamente sobre a maquinaria dos genes de relógio em *Drosophila* (Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998; Ceriani et al., 1999) e em mamíferos sem a necessidade de ativar uma via de sinalização diferente do que é observado para as opsinas melanopsina e TMT. A via de sinalização disparada pelos TMTs no teleósteo *Takifugu rubripes* (Koyanagi et al., 2013) envolve uma proteína  $G_i/G_0$  e como consequência hidrólise de nucleotídeos cíclicos, diferente do que foi proposto para *Danio rerio*, no qual a via que leva a estimulação dos genes de relógio envolve uma proteína Gq, participação de cálcio e ativação da via NO/MAPK (Ramos et al., 2014), descartando a participação dos TMTs na regulação da maquinaria do relógio em *Danio*.

Recentemente, foi mostrado que em *Danio* a ativação de genes de relógio é induzida tanto por luz azul quanto por luz vermelha através de elementos de D-box em seus promotores, por diferentes vias de sinalização (Mracek et al., 2013). Portanto, a falta de resposta nos espectros de luz vermelha em melanóforos de *Xenopus* aqui apresentada pode ser devida à perda de um dos mecanismos descritos em *Danio*. Os resultados aqui apresentados adicionam uma importante contribuição para o entendimento da evolução de arrastamento em células de vertebrados colocando um ponto interessante entre o foto-

arrastamento em células de peixes e anfíbios (sensíveis a luz) e células de mamíferos (insensíveis a luz).

Além da resposta de aumento da expressão de genes do relógio por luz, os melanóforos de *X. laevis* respondem também a luz com dispersão de grânulos de melanina, com máxima dispersão entre 450 e 470 nm (Isoldi et al., 2005), faixa na qual as melanopsinas são maximamente excitadas (Berson et al., 2002). De fato, nós mostramos que a dispersão de grânulos de melanina foi induzida pela luz azul. Somado a esses dados, o pulso de luz azul mostrou uma modulação diferencial para as duas melanopsinas expressas neste modelo. O pulso de luz azul diminuiu a transcrição de *Opn4x* em todos os horários analisados após o estímulo, enquanto a expressão de *Opn4m* não foi alterada. Se compararmos esses dados com outras opsinas conhecidas por serem inibidas por luz (Hannibal et al., 2005), *Opn4x* poderia ser provavelmente o fotopigmento funcional nesta célula. Estes autores mostraram que o RNAm da melanopsina apresenta variações temporais com níveis mais elevados durante o início da noite subjetiva, entretanto, quando ratos foram expostos a luz constante apresentaram uma diminuição drástica da expressão da melanopsina, chegando a níveis não detectáveis após 5 dias nesta condição. Análise evolutiva de opsinas parálogas mostra divergência espectral em locais que possam estar envolvidos na absorção de luz pela melanopsina (Borges et al., 2012), o que favorece papéis diferenciais para resposta de opsinas à luz. Além disso, estes resultados podem ser interpretados como uma diminuição fisiológica de fotopigmentos em resposta a um aumento da exposição à luz (Organisciak e Vaughan, 2010). Outro dado que fortalece a hipótese de diferentes funções para as duas melanopsinas nos melanóforos de *Xenopus* é a localização proteica dessas opsinas. A proteína OPN4x se apresenta distribuída ao longo da membrana celular e regiões próximas ao núcleo, o que é típico e esperado de um fotopigmento, o qual, na membrana, exerce sua função de captação do fóton de luz e,

próximo ao núcleo, encontra-se, provavelmente, dentro de cisternas do aparelho de Golgi. Entretanto, um resultado inesperado foi observado para a proteína OPN4m, a qual se encontra claramente concentrada na região do núcleo. A presença de uma opsina no núcleo ou na membrana nuclear é algo que até o momento não foi descrito na literatura, e constitui-se como um achado extremamente interessante sendo o estudo de sua função alvo de novos experimentos. É possível que, semelhantemente aos criptocromos de mamíferos, essa melanopsina seja um fator de transcrição. Resultados similares foram observados na cultura ZEM-2S de *Danio rerio* (Ramos, 2014), onde OPN4m1 tem localização similar a OPN4x de *Xenopus*, e OPN4m2 similar a OPN4m. Hoje se sabe que o peixe *Danio rerio* possui cinco genes que codificam a melanopsina (Davies et al., 2011) e que estes 5 genes também são expressos na cultura de ZEM-2S, embora *Opn4m-3*, *Opn4x-1* e *Opn4x-2* apresentem baixos níveis de expressão (Ramos et al., 2014).

Como *Opn4x* é sincronizada pelo ciclo claro-escuro (Moraes et al., 2014b), é sensível ao pulso de luz azul, e possui localização na membrana o que permite o desempenho de sua função como fotorreceptor, acreditamos que esta opsina seja o candidato mais forte a fotopigmento funcional responsável por traduzir o estímulo luminoso nos melanóforos. Estudos que comprovem a funcionalidade desta opsina através de RNAi estão sendo realizados a fim de solucionar essa questão.

Não podemos descartar a presença e a possibilidade de outros fotopigmentos não conhecidos participarem neste processo. Mas o fato de a exposição a comprimentos de onda longos (615-635 nm) não ter alterado a expressão desses genes sugere fortemente a participação de um pigmento sensível ao comprimento de onda curto (450-475 nm, azul), como por exemplo, a melanopsina, que estaria atuando na sincronização do relógio endógeno mediada pelo ciclo claro-escuro.

## 2. Via de sinalização da melanopsina

A partir dos resultados obtidos com células submetidas a fotoperíodo e estimulação com luz azul, o passo seguinte deste trabalho tinha como objetivo investigar a via de sinalização que resulta na ativação dos genes *Per1* e *Per2*. A melanopsina possui maior homologia com as opsinas de invertebrados do que com opsinas de vertebrados, e dessa forma envolve a ativação de uma proteína Gq e a consequente ativação da via dos fosfoinosítídeos em mamíferos (Graham et al., 2008; Hankins et al., 2008), aves (Contin et al., 2006) e em melanóforo de *Xenopus laevis* (Isoldi et al., 2005). Após a foto-estimulação da melanopsina, e ativação da proteína Gq, ocorre ativação de uma PLC. Nossos resultados demonstram que a presença de inibidor de PLC, U-73122, bloqueia a resposta evocada pela luz azul nos genes *Per1* e *Per2*, indicando a participação da via da PLC na ativação dos genes do relógio em melanóforos de *X. laevis*. O inibidor utilizado neste experimento tem um amplo espectro de ação, inibindo inespecificamente todas as isoformas da PLC. Atualmente, a isoforma proposta para participar da via de sinalização da melanopsina é a PLC $\beta_4$ , devido a sua alta expressão na retina de mamíferos quando comparada a outras isoformas. Essa isoforma possui forte semelhança com a enzima PLC $\beta$  norpA em *Drosophila* e a deleção dessa enzima aboliu a foto-resposta em um subtipo de células ganglionares positivas para melanopsina na retina de camundongos (Hughes et al., 2012).

O próximo passo desta via é a clivagem de fosfolipídeos de membrana, fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), pela PLC, originando como subprodutos inositol 1,4,5 trisfosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG) e consequente aumento de cálcio intracelular. Vários estudos têm demonstrado que a ativação da melanopsina por luz promove um aumento de cálcio (Sekaran et al., 2003; Isoldi et al., 2005; Panda et al., 2005; Melyan et al., 2005; Qiu et al., 2005; Kumbalasisiri et al., 2007). Dois tipos de receptores promovem aumento de cálcio intracelular: (1) os canais IP<sub>3</sub> e receptores rianodina, que liberam cálcio

dos compartimentos internos (Berridge et al., 2002) e (2) canais TRP, os quais promovem entrada de cálcio extracelular (Hughes et al., 2012). A abertura dessas canais ocorre através da ligação de  $IP_3$ , pela diminuição de  $PIP_2$  na membrana ou pela liberação de ácidos graxos provenientes da clivagem de DAG (Hughes et al., 2012). O papel do cálcio nos melanóforos de *Xenopus laevis* não foi ainda elucidado devido a dificuldades experimentais no uso da microscopia confocal. Experimentos prévios de nosso laboratório demonstraram que estímulo de luz prolongado (maior que 10 minutos, laser 488nm) não mobilizou cálcio nos melanóforos de *X. laevis*. Este resultado deve ser interpretado com cautela e considerado o efeito foto-tóxico causado por exposição de células a estímulos luminosos de longa duração. Novos experimentos serão realizados a fim de esclarecer o papel do cálcio. Dados de nosso laboratório demonstraram a participação do cálcio na resposta dos genes de relógio à luz em células ZEM-2S (Ramos et al., 2014), entretanto não está claro de onde provém o cálcio, de estoques intracelulares ou do espaço extracelular.

A próxima questão a ser respondida seria qual a participação da proteína quinase C (PKC), a qual pertence a uma grande família de proteínas, na sinalização em melanóforos de *Xenopus*. O bloqueio de PKC pelo inibidor não específico Ro 31-8220 aboliu o aumento da expressão de *Per1* e *Per2* em resposta ao pulso de luz azul, semelhantemente ao relatado em *Danio rerio* para *per2* (Ramos et al., 2014). Entre todas as isoformas de PKC, a mais provável de participar da ativação dos genes de relógio é PKCzeta, pois o silenciamento de seu gene em camundongos gerou um comportamento semelhante ao fenótipo de animais nocautes para melanopsina (Peirson et al., 2007). Em adição, nos melanóforos de *Xenopus* foi demonstrada a presença de PKCzeta, além de outras duas isoformas, PKC clássicas  $\beta 1$  e  $\beta 2$  (Isoldi et al., 2003). Vale ressaltar, no entanto, que PKCzeta é insensível aos níveis de  $Ca^{2+}$ , sendo portanto o papel deste cátion

provavelmente voltado para estimulação de calmodulina e ativação da via de MAP quinases, como apontado em *Danio* (Ramos et al., 2014). Neste caso a PKC em *Xenopus* também poderia ativar a via da MAPK envolvida com a regulação gênica. Ou ainda a PKC atuante no nosso modelo poderia ser uma das duas isoformas clássicas demonstradas por Isoldi e colaboradores (2003), que são sensíveis ao cálcio.

Em conjunto esses dados indicam que o aumento da expressão de *Per1* e *Per2* induzido por pulso de luz azul ativa a via dos fosfoinosítídeos nos melanóforos de *Xenopus laevis*, similar ao que é observado na retina de mamíferos (Hankins et al., 2008), fortalecendo a hipótese da participação da melanopsina nesta resposta.

Embora tenhamos apresentado os passos iniciais da via de sinalização que ativa os genes do relógio, quais os componentes que chegam ao núcleo e ativam essa transcrição ainda permanecem obscuros. Como a via dos fosfoinosítídeos seria capaz de modular fatores de transcrição para os genes de relógio? A resposta para essa pergunta poderia estar na interação dessa via de sinalização com outras vias, num processo conhecido como *crosstalk*. De fato nosso laboratório demonstrou em relógio periférico de *Danio rerio* que a via dos fosfoinosítídeos interage com a via de NO/MAPK (Ramos et al., 2014). Outra forte evidência que poderia fortalecer a possibilidade de um *crosstalk* vem dos achados de Isoldi e colaboradores (2005) através do estudo da via de sinalização da melanopsina ativada por luz que leva a dispersão de grânulos de melanina. Um aumento de GMPc em resposta a luz foi observado, porém, curiosamente o bloqueio da proteína quinase G (PKG) não abolia a resposta de dispersão, deixando em aberto o papel desse nucleotídeo cíclico na foto-resposta. Por esse motivo e pelo fato de AMPc e GMPc serem dois importantes componentes que atuam na geração dos ritmos nos NSQs de mamíferos, prosseguimos a investigação da via de sinalização nos melanóforos por meio do estudo desses dois nucleotídeos.

Um importante efetor da sinalização de AMPc é a PKA (proteína quinase A dependente de AMPc), a qual é capaz, entre outros efeitos, de catalizar a fosforilação de CREB (*cAMP response element binding protein*) em vários modelos (Golombeck e Rosenstein, 2010). Foi proposto que o AMPc parece ser não só um componente da sinalização que leva ao arrastamento, mas também parte do próprio mecanismo molecular do relógio circadiano (O'Neill et al., 2008). Uma evidência que fortalece essa questão é a variação temporal no conteúdo de AMPc e na atividade de PKA no NSQ mostrado em experimentos *in vitro* (Prosser e Gillette, 1991) e *ex vivo* (Ferreyra e Golombeck, 2000).

Em adição ao conhecimento sobre a sinalização no NSQ, alguns trabalhos investigaram estes mesmos componentes em células modelos de relógio periférico em cultura. Isoldi e colaboradores (2010) propuseram uma possível interação entre a via dos fosfoinosítídeos e a via de AMPc/PKA no modelo de melanóforo de *X. laevis*, onde a luz atuaria inibindo esta via, através do aumento dos níveis de cálcio intracelular, ativação de calcineurina (fosfatase PP2B) e uma consequente inibição de adenilil ciclase; ou ainda por meio da ativação de PKC, fosforilação de proteínas de ancoramento (AKAPs) associadas a PKA e desestabilização do seu ancoramento à membrana celular. Foi avaliado o papel do AMPc em dois diferentes modelos em cultura do peixe *Danio rerio*, células Z3 (Cermakian et al., 2003) e ZEM-2S (Ramos et al., 2014). Entretanto estes estudos não conseguiram elucidar completamente o papel do AMPc no ajuste do relógio em tecidos periféricos. Nas culturas destes dois tipos de células, a inibição de PKA reduz o aumento da expressão do gene *Per2* causado pelo estímulo luminoso, enquanto que a adição de forskolina, um ativador de adenilil ciclase, não teve efeito sobre sua expressão. Nos melanóforos de *Xenopus* não foi observada a ativação de AMPc por estímulo luminoso, corroborando o que foi mostrado em *Danio rerio*.

Outro candidato com o qual a via dos fosfoinosítídeos poderia fazer *crosstalk* e ativar os genes do relógio é a óxido nítrico sintase (NOS) através de sua fosforilação pela CAMK II (Golombek e Rosenstein, 2010). A participação do NO no arrastamento fótico foi demonstrada por diversos grupos (Ding et al., 1994; Watanabe et al., 1995; Melo et al., 1997), e hoje se sabe que esta via é ativada em resposta a pulso de luz no NSQ. Um pulso de luz dado no início da noite abre canais RyR/IP<sub>3</sub> mobilizando cálcio dos estoques internos, enquanto que um pulso dado no final da noite promove aumento da síntese de GMPc através de NO levando a ativação de PKG. Manipulações farmacológicas dos níveis de GMPc (inibição de PDE, fosfodiesterase de GMPc, e aumento das concentrações de GMPc) promovem aumento do avanço de fase dos ritmos circadianos induzido por luz (Golombek e Rosenstein, 2010). Em consonância com esses achados, temos um aumento de 4 vezes na concentração de GMPc embora o bloqueio da PKG nos melanóforos de *X. laevis* não tenha afetado a resposta de dispersão de grânulos de melanosomos à luz (Isoldi et al., 2005). O fato deste nucleotídeo não estar envolvido com a dispersão de grânulos de melanina, foco principal do autor, abriu caminho para hipotetizarmos que este aumento de GMPc poderia estar relacionado ao ajuste dos genes de relógio por luz. De fato o tratamento dos melanóforos com YC-1, um ativador de guanilil ciclase, promoveu um aumento da expressão de *Per1* similar ao que foi visto após o pulso de luz azul. Por outro lado, a expressão de *Bmall* não foi alterada, mostrando que o efeito deste ativador é específico e assim colocando este nucleotídeo como um forte candidato na regulação da maquinaria molecular dos genes do relógio neste modelo. Um estudo semelhante feito por nosso grupo demonstrou que a ativação dos genes do relógio por luz em células ZEM-2S não é mediada por GMPc/PKG, entretanto os componentes que poderiam preceder esta via, como NOS e CAMK II estão envolvidos nesta resposta. Assim a produção de NO ativa a

via da MAPK em *Danio rerio* (Ramos et al., 2014), de forma similar ao que é visto no NSQ de mamíferos (Obrietan et al., 1999).

Todos esses dados tomados em conjunto apontam para a participação da via dos fosfoinositídeos, a qual realiza um *crosstalk* com a via do GMPc, o que leva ao controle da maquinaria molecular dos genes do relógio nos melanóforos de *Xenopus laevis*. Os mecanismos posteriores à ativação da PKG que levam a ativação dos genes do relógio ainda permanecem em aberto neste estudo e também no NSQ de mamíferos (Golombek e Rosenstein, 2010).

Se compararmos a via de sinalização no relógio central de mamíferos (Golombek e Rosenstein, 2010) com as vias de sinalização encontradas em células em cultura, consideradas relógios periféricos (Ramos et al., 2014 e dados desta tese), podemos encontrar similaridades. Nota-se que parte deste mecanismo parece ter sido preservada ao longo da evolução no que diz respeito ao sistema de percepção de luz e condução desta informação. No entanto, a modulação dos genes de relógio em relógios periféricos de diferentes espécies parece envolver diferentes componentes intracelulares. Em melanóforos de *Xenopus*, o aumento de GMPc em resposta à luz visto por Isoldi e colaboradores (2005), mas sem participação na dispersão dos grânulos de melanina, é de fato componente essencial na foto-estimulação de *Per1* (este trabalho). Na Figura 36 é apresentado um modelo hipotético da via de sinalização em resposta a luz azul para ativação dos genes do relógio em melanóforos de *X. laevis*.

### Modelo hipotético da via de sinalização da luz azul

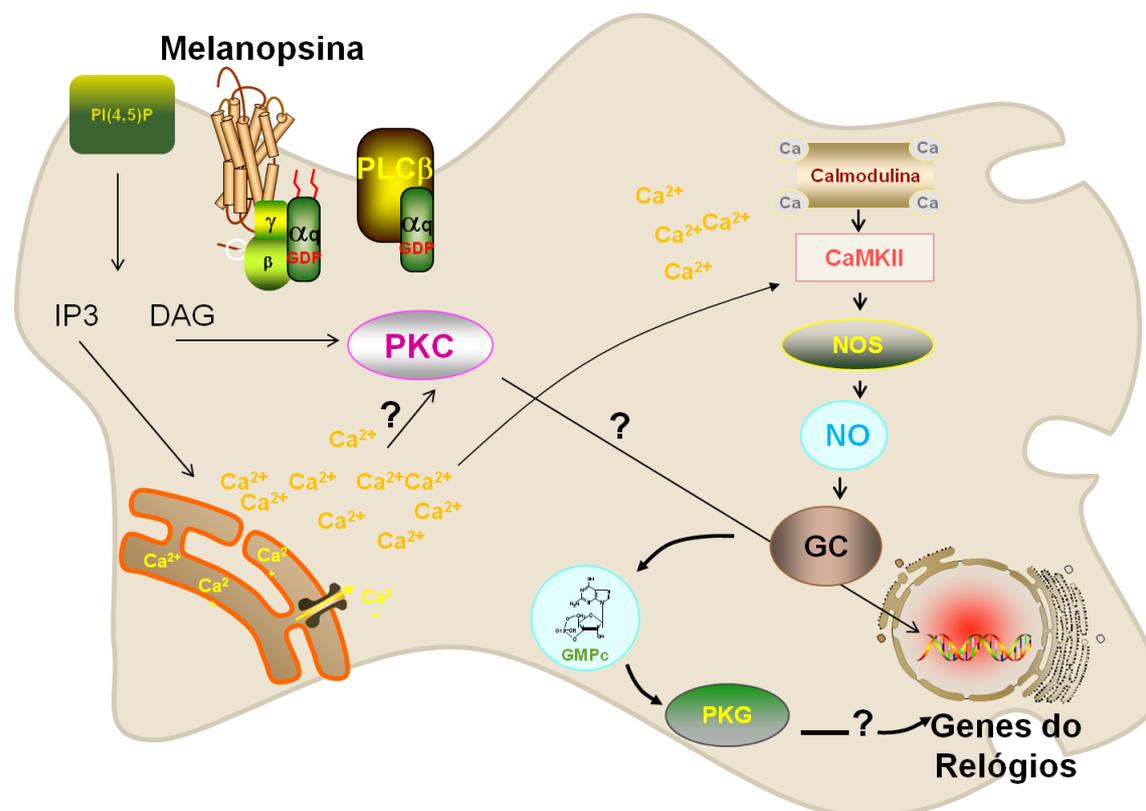


Figura 36. Modelo Hipotético da Via de Sinalização da Luz Azul em Melanóforos de *Xenopus laevis*.

### 3. Efeito da endotelina sobre os melanóforos

Nos melanóforos embrionários de *X. laevis*, cultura na qual a melanopsina foi descoberta, é conhecido que a luz branca (Isoldi et al., 2005) e o hormônio  $\alpha$ -MSH (Cozzi e Rollag, 1992) causam dispersão de grânulos de melanina, enquanto que outro hormônio, a melatonina (Binkley et al., 1988; Rollag e Lynch, 1993; Sugden et al., 2004), causa agregação dos melanossomos. Como mencionado anteriormente, o pulso de luz azul promoveu dispersão de grânulos de melanina da mesma forma que a luz branca. O tratamento com endotelina-3 atuou da mesma maneira que a luz e, interessante, quando estes dois estímulos foram aplicados juntos, a resposta de dispersão foi maior, mas não a soma das duas respostas. Em melanóforos de *Brachydanio rerio* (agora *Danio rerio*,

Fujii et al., 1993) e *Synbranchus marmoratus* (Ramanzini et al., 2006), endotelina-1 promove agregação pigmentar de maneira dose-dependente, através da ativação da via de PKC/Ca<sup>2+</sup>. A mesma via é ativada por ETs em anfíbios, entretanto a resposta evocada é de dispersão dos grânulos de melanina (Karne et al., 1993). Como as melanopsinas são conhecidas por mediar respostas a luz em melanóforos de *Xenopus* via PKC/Ca<sup>2+</sup> (Isoldi et al., 2005), ET-3 poderia atuar ativando a mesma cascata intracelular que a luz para modular seu próprio receptor e a expressão das melanopsinas.

É importante mencionar que a concentração de RNAm dos genes de relógio apresentados aqui foi mensurada 24 horas após o início do tratamento (6 horas de ET-3); dessa forma os resultados podem ser interpretados como um efeito tardio da endotelina-3 no mecanismo circadiano. Destaco também que o perfil de expressão do receptor de endotelina nos melanóforos foi recentemente descrito, e nenhuma variação importante foi observada em células mantidas em EC ou CE, com ou sem manipulação (Moraes et al., 2014a).

Estudos sobre a dinâmica de transcrição de genes de relógio em resposta a endotelina foram anteriormente realizados em nosso laboratório em células embrionárias ZEM-2S do peixe *Danio rerio*, demonstrando que este hormônio atua de forma dose-dependente, e seu efeito varia de acordo com o gene analisado (Farhat et al., 2009). Estas células mantidas em EC ou CE não apresentaram variação na transcrição de *Opn4x* (hoje renomeada para *Opn4m2*), enquanto que o tratamento com endotelina promoveu um efeito bifásico nessa transcrição: em doses baixas (10<sup>-10</sup> e 10<sup>-11</sup> M) o hormônio promoveu uma forte ativação de *Opn4m2*, enquanto que em altas concentrações (10<sup>-8</sup> and 10<sup>-9</sup> M) inibiu a expressão de *Opn4m2* na maioria dos ZTs analisados. Em adição, endotelina 10<sup>-11</sup> M induziu um perfil circadiano de expressão para *Opn4m2* com altos níveis de RNAm durante a fase clara. Em *Xenopus laevis*, entretanto, o ciclo claro-escuro atua como um

potente sincronizador da expressão de *Opn4x* e *Opn4m*. Um robusto ritmo circadiano foi observado para *Opn4x* em células não manipuladas mantidas em CE, enquanto um perfil circadiano foi observado para *Opn4m* em células mantidas em CE somente quando associado a troca de meio (Moraes et al., 2014a). Desse modo, se compararmos a expressão de melanopsinas em *Danio* e *Xenopus*, temos que a exposição ao ciclo claro-escuro parece ser crucial para induzir oscilações temporais em *Xenopus* e não em *Danio*. Ainda dentro desta perspectiva comparada, o tratamento com endotelina em *Xenopus* mostrou efeitos opostos aos observados em *Danio*, pouca ou nenhuma variação foi observada para as duas opsinas em EC ou CE, exceto na dose  $10^{-8}$  M em CE para *Opn4x*, onde dois picos de expressão foram detectados, alterando o perfil de circadiano para ultradiano (Moraes et al., 2014a). Perfis similares são observados em outros modelos que respondem diretamente a luz. Na retina de *Gallus*, *Opn4m* e *Clock* exibem um ritmo circadiano (Lima et al., 2011); na retina de ratos pigmentados, RNAm de *Opn4m* e os níveis de proteína oscilam (Hannibal et al., 2013). Em adição, em roedores, foi mostrado que os níveis de RNAm de *Opn4m* exibem alterações diurnas que são mais altas durante a transição do dia para a noite (Sakamoto et al., 2004; Hannibal et al., 2005; Hannibal et al., 2013). Baseado nestes estudos, nós hipotetizamos que as oscilações temporais vistas nas opsinas poderiam ser uma consequência da maquinaria molecular do relógio biológico, como um gene controlado pelo relógio, e não uma resposta direta à luz ou ao hormônio.

De fato, como já mencionado, o ciclo claro-escuro sincroniza a expressão de *Per1*. Como os efeitos da endotelina sobre as melanopsinas em *Xenopus* foram observados somente em CE e nos ensaios de dispersão ET-3 e luz foram mais eficientes quando combinados em dispersar grânulos de melanina, o tratamento com este hormônio para avaliação dos genes de relógio foi feito somente na condição de ciclo claro-escuro. Quando os melanóforos foram tratados com endotelina-3, o perfil de *Per1* se manteve similar ao

controle em CE, enquanto os genes que não foram diretamente afetados por luz como, por exemplo, o gene *Clock*, mostraram-se altamente responsivos ao tratamento. Um estudo similar foi realizado por Farhat e colaboradores (2009) onde células embrionárias ZEM-2S do peixe *Danio rerio* mantidas em 12:12 CE apresentaram um robusto ritmo circadiano para os genes *Per1* e *Cry1b*. E o tratamento com endotelina nesta condição não alterou o perfil de expressão, exceto por uma redução de amplitude, exatamente como o observado neste estudo.

Interessantemente, o tratamento com endotelina  $10^{-9}$  M em *Danio* (Farhat et al., 2009) e *Xenopus* (dados deste trabalho) promoveram a mesma resposta no gene *Clock*. A luz não altera a expressão de *Clock* em ambos os modelos, mostrando níveis basais de transcrição, enquanto que após o tratamento com endotelina a expressão foi fortemente aumentada e dois picos de expressão foram observados, um na fase clara e outro na fase escura. Notavelmente a expressão do receptor de endotelina não é alterada pelo ciclo claro-escuro ou troca de meio, mas o tratamento com ET-3  $10^{-9}$  M aumentou sua expressão em EC e CE (Moraes et al., 2014a) o que permitiu que as células estivessem sensíveis para responder ao hormônio. Portanto, enquanto o efeito de ET-3 sobre a expressão de *Per1* (diminuição da amplitude) requer o melanóforo sincronizado pelo ciclo claro-escuro, para o efeito na expressão de *Clock* isto parece não ser necessário.

Da retina de mamíferos, a informação de luz é transmitida ao relógio central, para daí então partirem mensagens para o foto-arrastamento dos relógios periféricos. *In vivo*, uma grande variedade de fatores neuro-humorais tem sido proposta como sincronizadores de relógios periféricos (Balsalobre et al., 1998; 2000; Akashi e Nishida, 2000; Yagita e Okamura, 2000; Yagita et al., 2001). Quando as células são colocadas em cultura podem se tornar dessincronizadas, e a expressão de alguns genes em células individuais passarem a exibir diferentes fases e amplitudes, implicando em uma resultante nula de oscilação da

população (Welsh et al., 1995; 2004). *In vitro*, vários estímulos têm sido descritos como sincronizadores da população celular, tais como choque de soro (Balsalobre et al., 1998), trocas de meio (Yamazaki et al., 2000), éster de forbol (TPA) (Akashi e Nishida, 2000), glicocorticóides (Balsalobre et al., 2000) e endotelina (Nakahata et al., 2006). Em nosso modelo, a troca de meio promoveu variações temporais em todos os genes analisados. *Per1* não teve o perfil alterado, porém uma redução de amplitude foi detectada; a expressão de *Per2* foi aumentada em quase todos os pontos analisados e um atraso no pico de expressão foi observado; *Bmal1* e *Clock* tiveram um aumento da transcrição com variação do transcrito entre as fases de claro e de escuro. Esses resultados indicam que estas células requerem um estímulo humoral para promover a sincronização daqueles genes que não são diretamente sensíveis à luz.

Fibroblastos de rato estimulados por soro fetal bovino ou expostos a diferentes compostos químicos apresentam indução da transcrição de *Per1* e/ou *Per2* (Balsalobre et al., 1998, 2000; Akashi e Nishida 2000; Yagita e Okamura 2000; Yagita et al. 2001) mimetizando o efeito que a luz exerce sobre esses genes no NSQ. Nessas mesmas células, endotelina induz a transcrição de *Per2* (Yagita e Okamura 2000).

O fato de endotelina não ter afetado a expressão de *Per1* neste modelo e da literatura apontar este hormônio como um agente sincronizador (Nakahata et al., 2006; Takashima et al., 2006) fez com que levantássemos a hipótese de que tecidos que são diretamente estimulados por luz apresentam uma menor responsividade a hormônios, os quais poderiam atuar de maneira pontual modulando a expressão gênica, mas não como sincronizadores. Em modelos animais onde esteja presente alguma opsina, a informação de luz exerce um papel mais pronunciado sobre a expressão de *Per1* do que o tratamento com endotelina. Por outro lado em tecidos periféricos que não são capazes de perceber luz, ou o gene em questão não é diretamente responsivo a luz, endotelina atua como um agente

ativador/sincronizador, por exemplo atuando sobre *Per2* através da mobilização de cálcio intracelular (Takashima et al., 2006).

Outros hormônios foram usados como potenciais sincronizadores em *Xenopus*, e discutidos aqui para melhor embasar nossa hipótese no que se refere a modulação dos genes do relógio por hormônios. Melatonina e  $\alpha$ -MSH, os quais possuem efeitos antagônicos com relação à fisiologia da pigmentação, promovendo agregação (clareamento da pele) e dispersão (escurecimento da pele) respectivamente, foram utilizados em melanóforos de *Xenopus* e avaliado seu efeito sobre *Per1*. Similar ao que foi visto após o tratamento com endotelina, melatonina diminuiu a amplitude de *Per1*, mas não alterou o perfil circadiano disparado pelo CE.  $\alpha$ -MSH, aplicado em escuro constante durante a fase de claro subjetivo, desenho experimental que mimetizaria a presença de luz pela presença hormonal, não sincronizou a expressão de *Per1* (Moraes et al., 2014b). Esses resultados em conjunto corroboram a nossa hipótese de que hormônios apresentam apenas uma função moduladora da expressão de genes de relógio, sendo a luz a importante pista sincronizadora neste modelo.

Outros trabalhos que reforçam o papel fundamental da luz para a ação da endotelina são baseados em estudos de dessensibilização. É bem conhecido que ETs promovem uma dessensibilização dose-dependente em células pigmentares de vertebrados não mamíferos tais como *Zacco temmincki* (Hayashi et al., 1996) e *S. marmoratus* (Ramanzini et al., 2006). O tratamento de melanóforos de *Xenopus* com altas concentrações de ET-3 também dessensibiliza essas células de forma dependente do tempo e da concentração (Karne et al., 1993). Entretanto esse fenômeno só é visto nos melanóforos de *Xenopus* mantidos em EC (Moraes et al., 2014a), o que traz à tona a noção de que a dessensibilização por dose também pode estar relacionada com a condição de luz.

Na pele de mamíferos, ETs são produzidas nos queratinócitos, exercendo seus efeitos nos melanócitos vizinhos (Imokawa et al., 1986), e a produção destes hormônios é aumentada em resposta a exposição a radiação UVB (Imokawa et al., 1992). ET-1 estimula a transcrição do receptor de  $\alpha$ -MSH (MC1R) em queratinócitos humanos, de forma dose-dependente (Scott et al., 2002), assim como atividade e transcrição da enzima tirosinase (Imokawa et al., 1995). Em melanóforos de *X. laevis*, ET-3 aumenta a expressão de *Opn4x*, *ETc* (Moraes et al., 2014a), *Per2* e *Clock* desde que em CE, mais uma vez fortalecendo a ideia de que o efeito da endotelina é apenas modulador e dependente da luz.

Em melanóforos de *Xenopus*, além de promover a dispersão de grânulos de pigmento, a luz é um importante fator regulador da expressão gênica por si só ou em adição aos efeitos de ET. Este papel de luz em comparação com os efeitos hormonais pode ser explicado pela independência do sistema endócrino e / ou sistema nervoso durante o desenvolvimento. Por exemplo, em estágios larvais de peixes teleósteos e anfíbios, a resposta de mudança de cor primária é diretamente dependente da luz (Ohta, 1983; Binkley et al., 1988; Ohta e Muramatsu, 1988; Daniolos et al., 1990; Miyashita et al., 1996; Moriya et al., 1996), e ainda a direção da translocação de pigmento varia em função do estágio ontogenético: em melanóforos embrionários de *Xenopus* a luz induz dispersão pigmentar (Danilos et al., 1990, este trabalho), enquanto que em melanóforos larvais a resposta é de agregação (Miyashita et al., 1996; Moriya et al., 1996). Curiosamente, a mudança de cor se torna gradualmente mais dependente do controle neural / endócrino, mas pode retornar ao seu comportamento larval se as células são desnervadas ou colocadas em cultura (Fujii, 2000), condições em que a dominância da luz é restaurada.

#### 4. Transfecção de RNAi em melanóforos de *Xenopus*

Melanóforos de *Xenopus laevis* em cultura apresentam uma taxa de proliferação celular muito baixa e não atingem fase exponencial de crescimento, o que dificulta a inserção estável de vetores ou oligonucleotídeos nestas células. Por essa razão e por serem essas células de difícil transfecção, uma grande dificuldade foi encontrada durante os processos de transfecção dos melanóforos *Xenopus laevis*. No entanto, encontramos na literatura um trabalho em que os autores obtiveram sucesso, mas sempre por infecção viral (McClintock e Lerner, 1997; Gatlin et al., 2001). Diversas abordagens foram testadas nos melanóforos, como eletroporação, nanotubos de carbono e transfecção química, sendo que em nenhuma dessas obtivemos resultados relevantes.

Gatlin e colaboradores (2001) propõem que, embora o método de transfecção baseado na eletroporação seja o predominantemente utilizado em estudos de expressão gênica, uma série de fatores deve ser considerada como altas taxas de mortalidade e alta variabilidade de eficiência dependente do tipo celular utilizado. De fato, nossos resultados comprovam esta afirmação, pois mostraram uma eficiência muito baixa por esse método. Esses autores propuseram um método de transfecção viral, no qual obtiveram mais de 80% de eficiência e linhagens muito estáveis por períodos prolongados em tipos celulares de difícil transfecção.

A partir de então decidimos tentar uma nova abordagem utilizando dois diferentes nanotubos de carbono (NTC), *single wall* e *multi wall*. As partículas *single-wall* foram demonstradas como potente estratégia experimental para células de mamíferos de difícil transfecção como neurônios e cardiomiócitos (Ladeira et al., 2010), e também em células de *Danio rerio* (Ramos, 2014). Embora NTCs *single-wall* sejam mais eficientes que a transfecção por *multi-wall*, para a linhagem ZEM-2S de *Danio rerio* ambas foram

eficientes para a transfecção de siRNA (Ramos, 2014). Para os melanóforos de *Xenopus* nenhum resultado positivo foi encontrado utilizando esta metodologia.

Outro fator limitante desta técnica para células proveniente de vertebrados não mamíferos é que grande parte dos *kits* comercializados são desenvolvidos e testados em células de mamíferos, dificultando o processo de validação em células de outras classes de vertebrados. Testamos o *kit GenMute* da empresa SignaGen e surpreendentemente a eficiência de transfecção foi muito boa para os melanóforos e também em células ZEM-2S do peixe *Danio rerio* (Ramos, 2014). Após a validação do método, avaliamos o silenciamento da melanopsina *Opn4x*.

Para o silenciamento de *Opn4x* adquirimos quatro oligonucleotídeos (siRNA), os quais foram utilizados em conjunto para garantir uma maior eficiência do silenciamento e o RNAm monitorado 3, 6 e 12 horas após. De fato a utilização desta solução combinada de siRNA promoveu um silenciamento de *Opn4x* 12 horas após a transfecção.

O próximo passo na busca do esclarecimento do papel das melanopsinas nos melanóforos de *Xenopus* seriam os experimentos de estimulação por luz azul em células silenciadas por siRNA. Com o silenciamento dos genes da melanopsina poderíamos comprovar sua participação no ajuste do relógio por luz. Embora estes experimentos não tenham sido ainda realizados, um acontecimento surpreendente fez com que nossa hipótese da participação da melanopsina (uma ou ambas) nesta resposta fosse fortalecida.

Desde o início deste ano, diversos experimentos com pulso de luz azul foram conduzidos como controle positivo do estudo da via de sinalização do cálcio em *Xenopus* (dados não mostrados), porém em nenhum desses experimentos a luz azul promoveu aumento da expressão dos genes *Per1* e *Per2* como demonstrado nesta tese em experimentos anteriores. Esta aparente falta de resposta à luz nos deixou intrigados, então partimos para avaliação de uma função fisiológica já demonstrada previamente neste

modelo, a dispersão de grânulos de melanina por luz azul e branca. Após estes novos ensaios de dispersão, nenhuma resposta a luz foi observada. O passo seguinte foi a realização de um PCR para identificar a presença tanto das opsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) quanto dos genes do relógio (*Per1* e *Per2*). Curiosamente constatamos que os melanóforos não expressavam mais os genes das melanopsinas, mas que os genes do relógio estavam preservados. Análise quantitativa do RNAm utilizando cDNA proveniente de experimentos realizados anteriormente com cDNA processado a partir dessas células insensíveis a luz mostraram uma redução da expressão das melanopsinas e nenhuma alteração dos níveis de transcrito para os genes do relógio.

Esses resultados devem ser analisados com cautela, pois se sabe que células em cultura podem deixar de expressar determinados genes à medida que atingem passagens muito elevadas. Os melanóforos de *Xenopus* são células que não se mantêm viáveis após o processo de congelamento, o que inviabiliza esta estratégia e implica em uma manutenção permanente destas células. Dessa forma, com o passar dos anos, a cultura pode ter iniciado um processo de envelhecimento e deixado de expressar alguns genes, ou processos de diferenciação ou desdiferenciação celular. O fato inquestionável aqui é que, independente do mecanismo pelo qual a célula deixou de expressar os genes da melanopsina, a resposta à luz foi abolida nos melanóforos, fortalecendo nossa hipótese da participação desta opsina na regulação dos genes do relógio por luz.

# CONCLUSÃO

*“Há um sabor doce na ponta espinhosa da sobrevivência. O doce empenho, a doce esperança, a doce e única orquídea num rochoso horizonte ... Apenas um perfume igual ao das flores: o dos sonhos”*

João Carlos Pecci

Os dados apresentados nesta tese apontam os melanóforos de *X. laevis* como um modelo para estudo de relógios periféricos, uma vez que possuem a completa estrutura que forma o eixo circadiano: (1) expressam duas melanopsinas, *Opn4x* e *Opn4m*, as quais apresentam diferenças de resposta quando submetidas a ciclos CE e pulso de luz azul e também diferentes localizações das proteínas, abrindo caminho para o estudo da funcionalidade destas opsinas. Embora ainda em aberta esta questão, esses dados apontam fortemente para a *Opn4x* como o possível fotopigmento nesta linhagem; (2) expressam a completa maquinaria molecular dos genes do relógio, sendo estes alterados pelo ciclo CE e pelo pulso de luz azul.

O ciclo claro-escuro notavelmente promove um padrão rítmico de expressão do gene *Perl*, e a luz azul, o comprimento de onda específico para ativação da melanopsina, fortemente estimula a expressão deste gene. Desse modo, neste modelo, o ciclo claro-escuro é crucial para sincronizar a população celular, ou seja, colocar todas as células da cultura em fase. Essa sincronização é refletida não somente para os genes de relógio, mas também para a expressão das melanopsinas, sugerindo uma regulação da maquinaria molecular do relógio pelo ciclo 12:12 CE. Somado a isso, demonstramos também que essa ativação dos genes de relógio por luz é dependente do comprimento de onda, pois estimulação por luz vermelha não altera a transcrição dos genes analisados aqui, indicando mais uma vez a participação da melanopsina nesta resposta.

Outra importante contribuição deste trabalho foi a demonstração de que a via dos fosfoinosítídeos é ativada em resposta a luz azul, e que esta se comunica com a via da PKG através de um *crosstalk*, culminando em última instância na ativação do gene *Perl*.

Endotelina modula os níveis de RNAm dos genes de relógio nos melanóforos de *Xenopus laevis* de uma maneira dependente da dose e do regime de luz. Dependendo da

concentração e da fase - luz ou escuro - ET-3 exerce efeitos estimulatórios ou inibitórios na transcrição dos genes, sendo os efeitos estimulatórios mais evidentes.

Os efeitos da endotelina na expressão dos genes do relógio parecem estar relacionados com uma prévia sincronização de fase da população celular, uma vez que seu efeito sobre as melanopsinas só foi observado em ciclo CE, e que em células sincronizadas ET-3 promove forte aumento da expressão do gene *Clock*. Em adição, o efeito de ET-3 na translocação pigmentar é maior na presença de luz azul. Estes dados trazem a importância do acoplamento entre as células da cultura refletindo o mecanismo molecular do relógio funcional, o que parece ser essencial para a ação do hormônio.

De modo geral, os dados obtidos com este projeto constituem uma contribuição pioneira no entendimento dos mecanismos de controle do relógio periférico de vertebrados não mamíferos.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, Block GD. (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci*, 22(1): 350-356.
- Aerts JL, Gonzales MI, Topalian SL. (2004) Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 36(1): 84-86, 88, 90-91.
- Akashi M, Nishida E. (2000) Involvement of the MAP kinase cascade in resetting the mammalian circadian clock. *Genes Dev*, 14(6): 645-649.
- Albrecht U, Eichele G. (2003) The mammalian circadian clock. *Curr Opin Genet Dev*, 13(3): 271-277.
- Anderson FE, Hayasaka N, Green CB. (2001) Rhythmic Expression of *bmal* in the Retina of *Xenopus laevis*. *Invest Ophthalmol*, 42: S776.
- Andrews RV, Folk GE Jr. (1964) Circadian metabolic patterns in cultured hamster adrenal glands. *Comp Biochem Physiol*, 11: 393-409.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, 348(6303): 730-732.
- Aramori I, Nakanishi S. (1992) Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, 267(18): 12468-12474.
- Arendt D. (2003) Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol*, 47(7-8): 563-571.
- Aschoff J. (1965) Circadian rhythms in man. *Science*, 148(3676): 1427-1432.
- Bagnara JT, Hadley ME. (1973) *Chromatophores and Color Change*. Prentice Hall. Englewood Cliffs, pp. 304.
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93(6): 929-937.
- Balsalobre A, Marcacci L, Schibler U. (2000) Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured rat-1 fibroblasts. *Curr Biol* 10(20): 1291-1294.
- Bartell PA, Miranda-Anaya M, Menaker M. (2004) Period and phase control in a multioscillatory circadian system (*Iguana iguana*). *J Biol Rhythms*, 19(1): 47-57.
- Bellingham J, Chaurasia SS, Melyan Z, Liu C, Cameron MA, Tarttelin EE, Iuvone PM, Hankins MW, Tosini G, Lucas RJ. (2006) Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *PLoS Biol*, 4(8): e254.

- Bellingham J, Foster RG. (2002) Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell Tissue Res*, 309(1): 57-71.
- Bentley NJ, Eisen T, Goding CR. (1994) Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol Cell Biol*, 14(12): 7996-8006.
- Berridge G, Cramer R, Galione A, Patel S. (2002) Metabolism of the novel  $\text{Ca}^{2+}$  - mobilizing messenger nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate via a 2'-specific  $\text{Ca}^{2+}$  - dependent phosphatase. *Biochem J*, 365(Pt 1): 295-301.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295(5557): 1070-1073.
- Besharse JC, Iuvone PM. (1983) Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature*, 305(5930): 133-135.
- Binkley S, Mosher K, Rubin F, White B. (1988) *Xenopus* tadpole melanophores are controlled by dark and light and melatonin without influence of time of day. *J Pineal Res*, 5(1): 87-97.
- Bloch KD, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T. (1989) cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin 3. *J Biol Chem*, 264(30): 18156-18161.
- Bluhm AP, Obeid NN, Castrucci AM, Visconti MA. (2012) The expression of melanopsin and clock genes in *Xenopus laevis* melanophores and their modulation by melatonin. *Braz J Med Biol Res*, 45(8): 730-736.
- Borges R, Johnson WE, O'Brien SJ, Vasconcelos V, Antunes A. (2012) The role of gene duplication and unconstrained selective pressures in the melanopsin gene family evolution and vertebrate circadian rhythm regulation. *PLoS One*, 7(12): e52413.
- Bozek K, Relógio A, Kielbasa SM, Heine M, Dame C, Kramer A, Herzog H. (2009) Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLoS One*, 4(3): e4882.
- Bruno TJ, Svoronos PDN. (2005) *CRC Handbook of Fundamental Spectroscopic Correlation Charts*. CRC Press, USA.
- Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS. (2010) Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330(6002): 379-385.
- Buhr ED, Takahashi JS. (2013) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*, 217: 3-27.
- Cahill GM, Besharse JC. (1993) Circadian clock functions localized in *Xenopus* retinal photoreceptors. *Neuron*, 10(4): 573-577.

- Cahill GM. (2002) Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res*, 309(1): 27-34.
- Camargo CR, Visconti MA, Castrucci AM. (1999) Physiological color change in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Exp Zool*, 283(2): 160-169.
- Camp E, Badhwar P, Mann GJ, Lardelli M. (2003) Expression analysis of a tyrosinase promoter sequence in zebrafish. *Pigment Cell Res*, 16(2): 117-126.
- Carr AJ, Whitmore D. (2005) Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. *Nature Cell Biol*, 7(3): 319-321.
- Cassone VM. (1998) Melatonin's role in vertebrate circadian rhythms. *Chronobiol Int* 15(5): 457-473.
- Cavallari N, Frigato E, Vallone D, Fröhlich N, Lopez-Olmeda JF, Foà A, Berti R, Sánchez-Vázquez FJ, Bertolucci C, Foulkes NS. (2011) A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biol*, 9(9): e1001142.
- Cerejido M. (1988) La vida y el tiempo. In: Cerejido, F. B. *Del tiempo, cronos, Freud, Einstein y los genes*. Mexico, Folios Ediciones.
- Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Mas P, Petti AA, Weitz CJ, Kay SA. (1999) Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science*, 285(5427): 553-556.
- Cermakian N, Pando MP, Doi M, Cardone L, Yujnovsky I, Morse D, Sassone-Corsi P. (2003) On the communication pathways between the central pacemaker and peripheral oscillators. *Novartis Found Symp*, 253: 126-136.
- Cermakian N, Pando MP, Thompson CL, Pinchak AB, Selby CP, et al. (2002) Light induction of a vertebrate clock gene involves signaling through blue-light receptors and MAP kinases. *Curr Biol*, 12(10): 844-848.
- Chen D, Buchanan GF, Ding JM, Hannibal J, Gillette MU. (1999) Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proc Natl Acad Sci*, 96(23): 13468–13473.
- Contin MA, Verra DM, Guido ME. (2006) An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells. *FASEB J*, 20(14): 2648-2650.
- Costa A, Castanon-Cervantes O, Menaker M, Piccione G, Caola G. (2005) Daily rhythm of lactate dehydrogenase in the rat (*Rattus norvegicus*) carrying a Per1-luciferase transgene: assessment on serum and liver. *Vet Res Commun*, 29 suppl. 2: 183-186.

- Cozzi B, Rollag MD. (1992) The protein-phosphatase inhibitor okadaic acid mimics MSH-induced and melatonin-reversible melanosome dispersion in *Xenopus laevis* melanophores. *Pigment Cell Res*, 5(3): 148-154.
- Czeisler CA, Shanahan TL, Klerman EB, Martens H, Brotman DJ, Emens JS, Klein T, Rizzo JF. (1995) Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med*, 5(332): 6-11.
- Daan S. (2000) The Colin S. Pittendrigh Lecture. Colin Pittendrigh, Jurgen Aschoff, and the natural entrainment of circadian systems. *J Biol Rhythms*, 15(3): 195-207.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleuty-Olela F, Schibler U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissue from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*, 14(23): 2950-2961.
- Daniolos A, Lerner AB, Lerner MR. (1990) Action of light on frog pigment cells in culture. *Pigment Cell Res*, 3(1): 38-43.
- Davidson AJ, London B, Block GD, Menaker M. (2005) Cardiovascular tissues contain independent circadian clocks. *Clin Exp Hypertens*, 27(2-3): 307-311.
- Davies WI, Zheng L, Hughes S, Tamai TK, Turton M, Halford S, Foster RG, Whitmore D, Hankins MW. (2011) Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. *Cell Mol Life Sci*, 68(24): 4115-4132.
- Davies WL, Hankins MW, Foster RG. (2010) Vertebrate ancient opsin and melanopsin: divergent irradiance detectors. *Photochem Photobiol Sci*. 9(11): 1444-1457.
- Ding JM, Chen D, Weber ET, Faiman LE, Rea MA, Gillette MU. (1994) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science*, 266(5191): 1713-1717.
- Dunlap JC. (1999) Molecular bases for circadian clock. *Cell*, 96: 271-290.
- Ebling FJ. (1996) The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Neurobiol*, 50(2-3): 109-132.
- Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M. (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, 95(5): 669-679.
- Farhat FP, Martins CB, De Lima LH, Isoldi MC, Castrucci AM. (2009) Melanopsin and clock genes: regulation by light and endothelin in the zebrafish ZEM-2S cell line. *Chronobiol Int*, 26(6): 1090-1119.

- Ferreira GA, Golombek DA. (2000) Cyclic AMP and protein kinase A rhythmicity in the mammalian suprachiasmatic nuclei. *Brain Res*, 858(1): 33-39.
- Filadelfi AMC, Camargo CR, Castrucci AML. (1996). Phylogeny of purine and endothelin receptors in vertebrate integumentary melanocytes. *Pigment Cell Res*, 5 (Suppl.): 83.
- Filadelfi AMC, Ramazini GC, Visconti MA, Castrucci AM. (2004) The endothelin/sarafotoxin-induced increase of the proliferation of undifferentiated and DMSO-differentiated GEM-81 goldfish erythrophoroma cells is mediated by ETB receptors. *Pigment Cell Res*, 17(5): 480-487.
- Filadelfi AMC, Rodrigues P, Castrucci AML, Visconti MA. (2002) Adrenoceptors in avian and fish pigment cells. *J Comp Physiol*, 172: 599-602.
- Foster RG, Kreitzman L. (2004) *Rhythms of life: the biological clocks that control the daily lives of every living thing*. New Haven, Conn: Yale University Press. ISBN 0-300-10969-5, pp 60-81.
- Foster RG. (1998) Shedding light on the biological clock. *Neuron*, 20(5): 829-832.
- Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Muñoz M, David-Gray Z, Foster R. (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*, 284(5413): 502-504.
- Fujii R, Tanaka Y, Hayashi H. (1993) Endothelin-1 causes aggregation of pigment in teleostean melanophores. *Zool Sci*, 10: 763-772.
- Fujii, R. (2000) The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell Res*, 13(5): 300-319.
- Fujita T, Fujii R. (1997) Endothelins disperse light-scattering organelles in leucophores of the medaka, *Oryzias latipes*. *Zool Sci*, 14: 559-569.
- Gachon F, Nagoshi E, Brown AS, Ripperger J, Schibler U. (2004) The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma*, 113(3): 103-112.
- Gatlin J, Unnet DJ, Lerner MJ, Garcia JV. (2001) Efficient, long-term transgene expression in *Xenopus laevis* dermal melanophores. *Pigment Cell Res*, 14(4): 275-282.
- Gavriouchkina D, Fischer S, Ivacevic T, Stolte J, Benes V, Dekens MP. (2010) Tryptophan embryonic factor regulates light-induced transcription of repair genes in zebrafish embryonic cells. *PLoS One*, 5(9): e12542.

- Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. (2001) Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem*, 295(1): 17-21.
- Golombek DA, Rosenstein RE. (2010) Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev*, 90(3): 1063-1102.
- Golombek DA, Aguilar-Roblero R. (2003) Mecanismos de temporização nos vertebrados. In: Marques N, Menna-Barreto I. (orgs). *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*, 3 Ed, São Paulo: Edusp, 163-190.
- Graham DM, Wong KY, Shapiro P, Frederick C, Pattabiraman K, Berson DM. (2008) Melanopsin ganglion cells use a membrane-associated rhabdomic phototransduction cascade. *J Neurophysiol*, 99(5): 2522-2532.
- Green CB, Cahill GM, Besharse JC. (1995) Tryptophan hydroxylase is expressed by photoreceptors in *Xenopus laevis* retina. *Vis Neurosci*, 12(4): 663-670.
- Guo H, Brewer JM, Lehman MN, Bittman EL. (2006) Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *J Neurosci*, 26(24): 6406-6412.
- Hamada T, Antle MC, Silver R. (2004) Temporal and spatial expression patterns of canonical clock genes and clock-controlled genes in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 19(7): 1741-1748.
- Hankins MW, Peirson SN, Foster RG. (2008) Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci*, 31(1): 27-36.
- Hannibal J, Georg B, Fahrenkrug J. (2013) Differential expression of melanopsin mRNA and protein in brown Norwegian rats. *Exp Eye Res*, 106: 55-63.
- Hannibal J, George B, Hindersson P, Fahrenkrug J. (2005) Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J Mol Neurosci*, 27(2): 147-155.
- Hannibal J. (2002) Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res*, 309(1): 73-88.
- Hara R, Wan K, Wakamatsu H, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Schibata S. (2001) Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*, 6(3): 269-278.

- Hayasaka N, LaRue SI, Green CB. (2002) In vivo disruption of *Xenopus Clock* in the retinal photoreceptor cells abolishes circadian melatonin rhythmicity without affecting its production levels. *J Neurosci*, 22(5): 1600-1607.
- Hayashi H, Nakamura S, Fujii R. (1996) The endothelin receptors that mediate aggregation of pigment in fish melanophores. *Comp Biochem Physiol*, 115: 143-152.
- Hearing VJ. (2011) Determination of melanin synthetic pathways. *J Invest Dermatol*, 131(E1): E8-E11.
- Hirayama J, Fukuda I, Ishikawa T, Kobayashi Y, Todo T. (2003) New role of zCRY and zPER2 as regulators of sub-cellular distributions of zCLOCK and zBMAL proteins. *Nucleic Acids Res*, 31(3): 935-943.
- Hughes S, Hankins MW, Foster RG, Peirson SN. (2012) Melanopsin phototransduction: Slowly emerging from the dark. *Progr Brain Res*, 199: Chapter 2. ISSN: 0079-6123.
- Imokawa G, Kawai M, Mishima Y, Motegi I. (1986) Differential analysis of experimental hypermelanosis induced by UVA, PUVA, and allergic contact dermatitis using a brownish guinea pig model. *Arch Dermatol Res*, 278(5): 352-362.
- Imokawa G, Miyagishi M, Yada Y. (1995) Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. *J Invest Dermatol*, 105(1): 32-37.
- Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M. (1992) Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J Biol Chem*, 267(34): 24675-24680.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci, USA* 86(8): 2863-2867.
- Isoldi MC, Provencio I, Castrucci AM. (2010) Light modulates the melanophore response to alpha-MSH in *Xenopus laevis*: an analysis of the signal transduction crosstalk mechanisms involved. *Gen Comp Endocrinol*, 165(1): 104-110.
- Isoldi MC, Rollag MD, Castrucci AM, Provencio I. (2005) Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc Natl Acad Sci, USA* 102(4): 1217-1221.
- Isoldi MC, Matioli SR, Castrucci AM, Lima LH, Visconti MA, Rebouças NA. (2003) Identification of protein kinase c (PKC) isoforms in teleostean, amphibian and avian pigment cells. *Pigment Cell Res*, 16(6): 639-643.

- Johnson RF, Moore RY, Morin LP. (1988) Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res*, 460(2): 297-313.
- Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. (1993) Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETc receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem*, 268(25): 19126-19133.
- Kasuya Y, Abe Y, Hama H, Sakurai T, Asada S, Masaki T, Goto K. (1994) Endothelin-1 activates mitogen-activated protein kinases through two independent signalling pathways in rat astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 204(3): 1325-1333.
- Ko CH, Takahashi JS. (2006) Molecular components of mammalian circadian clock. *Human Mol Genet*, 15: R271-R277.
- Koizumi S, Kataoka Y, Niwa M, Yamashita K, Taniyama K, Kudo Y. (1994) Endothelin increased  $[Ca^{2+}]_i$  in cultured neurons and slices of rat hippocampus. *Neuroreport*, 5(9): 1077-1080.
- Koyanagi M, Takada E, Nagata T, Tsukamoto H, Terakita A. (2013) Homologs of vertebrate Opn3 potentially serve as a light sensor in nonphotoreceptive tissue. *Proc Natl Acad Sci, USA* 110(13): 4998-5003.
- Koyanagi M, Terakita A. (2014) Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential. *Biochim Biophys Acta*, 1837(5): 710-716.
- Kumbalasiri T, Rollag MD, Isoldi MC, Castrucci AM, Provencio I. (2007) Melanopsin triggers the release of internal calcium stores in response to light. *Photochem Photobiol*, 83(2): 273-279.
- Ladeira MS, Andrade VA, Gomes ERM, Aguiar CJ, Moraes ER, Soares JS, Silva EE, Lacerda RG, Ladeira LO, Jorio A, Lima P, Leite MF, Resende RP, Guatimosim S. (2010) Highly efficient siRNA delivery into human and murine cells using single-wall carbon nanotubes. *Nanotechnology*, 21(38): 385101.
- Lima HRG, Santos KP, Castrucci AM. (2011) Clock genes, melanopsins, melatonin and dopamine and their modulation by light and glutamate in chicken embryonic retinal cells. *Chronobiol Int*, 28(2): 89-100.
- Liu C, Reppert SM. (2000) GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 25(1): 123-128.
- Lopes GJ, Góis CC, Lima LH, Castrucci AM. (2010) Modulation of rhodopsin gene expression and signaling mechanisms evoked by endothelins in goldfish and murine pigment cell lines. *Braz J Med Biol Res*, 43(9): 828-836.

- McClintock TS, Lerner MJ. (1997) Functional analysis by imaging of melanophore pigment dispersion of chimeric receptors constructed by recombinant polymerase chain reaction. *Brain Res Protocols*, 2: 59-68.
- McCurley AT, Callard GV. (2008) Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Mol Biol*, 9: 102.
- McIntosh BE, Hogenesch JB, Bradfield CA. (2010) Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annu Rev Physiol*, 72: 625-645.
- Meijer JH, van der Zee EA, Dietz M. (1988) Glutamate phase shifts circadian activity rhythms in hamsters. *Neurosci Letters*, 86(2): 177-183.
- Melo L, Golombek DA, Ralph MR. (1997) Regulation of circadian photic responses by nitric oxide. *J Biol Rhythms*, 12(4): 319-326.
- Melyan Z, Tarttelin EE, Bellingham J, Lucas RJ, Hankins MW. (2005) Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature*, 433(7027): 741-745.
- Menaker M, Moreira LF, Tosini G. (1997) Evolution of circadian organization in vertebrates. *Braz J Med Biol Res*, 30(3): 305-313.
- Menaker M, Tosini G. (1996) Beyond *Xenopus*: Direct demonstration of retinal circadian oscillators in other vertebrates. *Inv Ophthalmol Vis Sci*, 37: 66.
- Menna-Barreto L. (2003) Tempo na Biologia. In: Marques N, Menna-Barreto L. (orgs) *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*, 3 Ed, São Paulo: Edusp, 25-29.
- Mikkelsen JD, Larsen PJ, Ebling FJ. (1993) Distribution of N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor mRNAs in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 632(1-2): 329-333.
- Miles LEM, Raynal DM, Wilson MA. (1977) Blind man living in normal society has circadian rhythms of 24.9 hours. *Science*, 198(4315): 421-423
- Miyamoto Y, Sancar A. (1998) Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci, USA* 95(11): 6097-6102.
- Miyashita Y, Moriya T, Yokosawa N, Hatta S, Arai J, Kusunoki S, Toratani S, Yokosawa H, Fujii N, Asami K. (1996) Light-sensitive response in melanophores of *Xenopus laevis*: II. Rho is involved in light-induced melanin aggregation. *J Exp Zool*, 276(2): 125-131.
- 351-366.

- Moraes MN, Lima LH, Ramos BC, Poletini MO, Castrucci AM. (2014a) Endothelin modulates the circadian expression of non-visual opsins. *Gen Comp Endocrinol*, 205: 279-286.
- Moraes MN, Santos LR, Mezzalira N, Poletini MO, Castrucci AM. (2014b) Regulation of melanopsins and *Per1* by  $\alpha$ -MSH and melatonin in photosensitive *Xenopus laevis* melanophores. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2014/654710.
- Moriya T, Miyashita Y, Arai J, Kusunoki S, Abe M, Asami K. (1996) Light-sensitive response in melanophores of *Xenopus laevis*: I. Spectral characteristics of melanophore response in isolated tail fin of *Xenopus* tadpole. *J Exp Zool*, 276(1): 11-18.
- Moutsaki P, Whitmore D, Bellingham J, Sakamoto K, David-Gray ZK, Foster RG. (2003) Teleost multiple tissue (tmt) opsin: a candidate photopigment regulating the peripheral clocks of zebrafish? *Brain Res Mol Brain Res*, 112(1-2): 135-145.
- Mracek P, Pagano C, Fröhlich N, Idda ML, Cuesta IH, Lopez-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ, Vallone D, Foulks NS. (2013) ERK signaling regulates light-induced gene expression via D-Box enhancers in a differential, wavelength-dependent manner. *PLoS One*, 8(6): e67858.
- Murata N, Fujii R. (2000) Pigment-aggregating action of endothelins on medaka xanthophores. *Zool Sci*, 17: 853-862.
- Murisier F, Beermann F. (2006) Genetics of pigment cells: lessons from the tyrosinase gene family. *Histol Histopathol*, 5: 567-578.
- Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB. (1989) Interaction between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 53(3): 537-544.
- Nakahata Y, Akashi M, Trcka D, Yasuda A, Takumi T. (2006) The in vitro real-time oscillation monitoring system identifies potential entrainment factors for circadian clocks. *BMC Mol Biol*, 7: 5-12.
- Nakanishi-Ueda T, Majima HJ, Watanabe K, Ueda T, Indo HP, Suenaga S, Hisamitsu T, Ozawa T, Yasuhara H, Koide R. (2013) Blue LED light exposure develops intracellular reactive oxygen species, lipid peroxidation, and subsequent cellular injuries in cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Res*, 47(10): 774-780.

- Nath K, Sarosy JW, Hahn J, Di Como CJ. (2000) Effects of ethidium bromide and SYBR Green I on different polymerase chain reaction systems. *J Biochem Biophys Methods*, 42(1-2): 15-29.
- Obrietan K, Impey S, Smith D, Athos J, Storm DR. (1999) Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Chem*, 274(25): 17748-17756.
- Ohta T, Muramatsu K. (1988) Spectral sensitivity of melanophores in the primary color response of the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus*. *Jpn J Ichthyol*, 34: 483-487.
- Ohta T. (1983) Melanosome dispersion in direct response to light in melanophores of *Rhodeus ocellatus* fry. *Annot Zool Jpn*, 56: 155-162.
- Okamura, H., Yamagushi, S., Yagita, K. (2002) Molecular machinery of the mammalian circadian clock. *Cell Tissue Res*, 309:47-56.
- O'Neill JS, Maywood ES, Chesham JE, Takahashi JS, Hastings MH. (2008) cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science*, 320(5878): 949-953.
- Organisciak DT, Vaughan DK. (2010) Retinal light damage: mechanisms and protection. *Prog Retin Eye Res*, 29(2): 113-134.
- Orth DN, Besser GM, King PH, Nicholson WE. (1979) Free-running circadian plasma cortisol rhythm in a blind human subject. *Clin Endocrinol*, 10(6): 603-617.
- Panda S, Nayak SK, Campo B, Walker JR, Hogenesch JB, et al. (2005) Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science*, 307(5709): 600-604.
- Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, Provencio I, Kay SA. (2002) Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science*, 298(5601): 2213-2216.
- Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AML, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Van Gelder RN, Hogenesch JB. (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, 301(5632): 525-527.
- Peirson SN, Oster H, Jones SL, Leitges M, Hankins MW, Foster RG. (2007) Microarray analysis and functional genomics identify novel components of melanopsin signaling. *Curr Biol*, 17(16): 1363-1372.
- Pittendrigh CS. (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol*, 55: 16-54.

- Plano SA, Agostino PV, Golombek DA. (2007) Extracellular nitric oxide signaling in the hamster biological clock. *FEBS Letter*, 581(28): 5500–5504.
- Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA. (1997) Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science*, 278(5343): 1632-1635.
- Prosser RA, Gillette MU. (1991) Cyclic changes in cAMP concentration and phosphodiesterase activity in a mammalian circadian clock studied in vitro. *Brain Res*, 568(1-2): 185-192.
- Provencio I, Jiang G, De Grip W, Hayes W, Rollag M. (1998) Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci, USA* 95(1): 340-345.
- Provencio I, Rodriguez I, Jiang G, Hayes W, Moreira E, Rollag M. (2000) A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*, 20(2): 600-605.
- Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. (2002) Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature*, 415(6871): 493.
- Qiu X, Kumbalasiri T, Carlson SM, Wong KY, Krishna V, Provencio I, Berson DM. (2005) Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature*, 433(7027): 745-749.
- Ralph MR, Foster RG, Davies FC, Menaker M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247(4945): 975-978.
- Ramanzini G, Filadelfi AM, Visconti MA. (2006) Chromatic effects of endothelin family peptides in non-innervated fish, *Synbranchus marmoratus*, melanophores. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*, 305(7): 551-558.
- Ramos BC, Moraes MN, Poletini MO, Lima LH, Castrucci AM. (2014) From blue light to clock genes in zebrafish ZEM-2S cells. *PLoS One*, 9(9): e106252.
- Ramos BC (2014) Fototransdução em células embrionárias ZEM-2S do peixe teleósteo *Danio rerio*. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Reppert S, Weaver D. (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*, 63: 647-676.
- Reppert SM, Weaver DR. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418(6901): 935-941.
- Ripperger JA, Schibler U. (2001) Circadian regulation of gene expression in animals. *Curr Opin Cell Biol*, 13(3): 357-362.

- Rollag MD, Lynch GR. (1993) Melatonin-induced desensitization in amphibian melanophores. *J Exp Zool*, 265(5): 488-495.
- Rubanyi GM, Polokoff MA. (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, 46(3): 325-415.
- Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Hellen HC, O'Hara BF. (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science*, 298(5601): 2211-2213.
- Sack RL, Brandes RW, Kendall AR, Lewy AJ. (2000) Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. *N Engl J Med*, 343(15): 1070-1077.
- Sakamoto K, Liu C, Tosini G. (2004). Classical photoreceptors regulate melanopsin mRNA levels in the rat retina. *J Neurosci*, 24(43): 9693-9697.
- Sakamoto K, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, Tanaka H, Sato K, Miyake Y, Ohara O, Kako K, Ishida N. (1998) Multitissue expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem*, 273(15): 27039-27042.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, 348(6303): 732-735.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. (1992) Molecular characterization of endothelin receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 13(3): 103-108.
- Salim S, Ali SA. (2011) Vertebrate melanophores as potential model for drug discovery and development: a review. *Cell Mol Biol Letter*, 16(1): 162-200.
- Schmid H, Cohen CD, Henger A, Irrgang S, Schlondorff D, Kretzler M. (2003) Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney Int*, 64(1): 356-360.
- Scott M; Suzuki I, Abdel-Malek Z. (2002) Regulation of the human melanortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res*, 5: 433-439.
- Sekaran S, Foster RG, Lucas RJ, Hankins MW. (2003) Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons. *Curr Biol*, 13(15): 1290-1298.
- Shen WL, Kwon Y, Adegbola AA, Luo J, Chess A, Montell C. (2011) Function of rhodopsin in temperature discrimination in *Drosophila*. *Science*, 331(6022): 1333-1336.

- Shraga-Levine Z, Sokolovsky M. (1996) cGMP formation in rat atrial slices is ligand and endothelin receptor subtype specific. *Circ Res*, 78(3): 424-430.
- Sokolovsky M, Shraga-Levine Z, Galron R. (1994) Ligand-specific stimulation/inhibition of cAMP formation by a novel endothelin receptor subtype. *Biochemistry*, 33(38): 11417-11419.
- Sokolovsky M. (1991) Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Trends Biochem Sci*, 16(7): 261-264.
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M, Hall JC. (1998) The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, 95(5): 681-692.
- Steenhard BM, Besharse JC. (2000) Phase shifting the retinal circadian clock: *xPer2* mRNA induction by light and dopamine. *J Neurosci*, 20(23): 8572-8577.
- Stephan F, Zucker I. (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Nat Acad Sci, USA* 69(6): 1583-1586.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*, 291(5503): 490-493.
- Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, Weitz CZ. (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, 417(6884): 78-83.
- Sugden D, Davidson K, Hough KA, Teh MT. (2004) Melatonin, melatonin receptors and melanophores: a moving story. *Pigment Cell Res*, 17(5): 454-460.
- Takashima N, Fujioka A, Hayasaka N, Matsuo A, Takasaki J, Shigeyoshi J. (2006) Gq/11-induced intracellular calcium mobilization mediates *Per2* acute induction in Rat-1 fibroblasts. *Genes Cells*, 11(9): 1039-1049.
- Tamai TK, Carr AJ, Whitmore D. (2005) Zebrafish circadian clocks: cells that see light. *Biochem Soc Trans*, 33(5): 962-966.
- Tamai TK, Young LC, Whitmore D. (2007) Light signaling to the zebrafish circadian clock by Cryptochrome 1a. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(37): 14712-14717.
- Terakita A. (2005) The opsins. *Genome Biol*, 6(3): 213.
- Tosini G, Menaker M. (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*, 272(5260): 419-421.

- Tsang AH, Barclay JL, Oster H. (2013) Interaction between endocrine and circadian systems. *J Mol Endocrinol*, 52(1): R1-16.
- Vallone D, Gondi SB, Whitmore D, Foulkes NS. (2004) E-box function in a period gene repressed by light. *Proc Natl Acad Sci, USA* 101(12): 4106-4111.
- Van der Horst MA, Hellingwerf KJ. (2004) Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc Chem Res*, 37(1): 13-20.
- Vatine G, Vallone D, Gothilf Y, Foulkes NF. (2011) It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS letter*, 585(10): 1485-1494.
- Watanabe A, Ono M, Shibata S, Watanabe S. (1995) Effect of a nitric oxide synthase inhibitor, N-nitro-L-arginine methylester, on light-induced phase delay of circadian rhythm of wheel-running activity in golden hamsters. *Neurosci Letter*, 192(1): 25-28.
- Welsh DK, Imaizumi T, Kay SA. (2005) Real-time reporting of circadian-regulated gene expression by luciferase imaging in plants and mammalian cells. *Methods Enzymol*, 393: 269-288.
- Welsh DK, Logothetis E, Meister M, Reppert SM. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14(4): 697-706.
- Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA. (2004) Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol*, 14(24): 2289-2295.
- Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. (2000) Light acts on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature*, 404(6773): 87-91.
- Whitmore D, Foulkes NS, Strahle U, Sassone-Corsi P. (1998) Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nature Neurosci*, 1(8): 701-707.
- Yada Y, Higuchi K, Imokawa G. (1991) Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J Biol Chem*, 266(27): 18352-18357.
- Yagita K, Okamura H. (2000) Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FASEB Letter*, 465(1): 79-82.
- Yagita K, Tamanini F, van Der Horst GT, Okamura H. (2001) Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*, 292(5515): 278-281.

- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288(5466): 682-685.
- Yan L, Takekida S, Shigeyoshi Y, Okamura H. (1999) *Per1* and *Per2* gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience*, 94(1): 141–150.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332(6163): 411-415.
- Yanagisawa M, Masaki T. (1989) Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. *Biochem Pharmacol*, 38(12): 1877-1883.
- Ye R, Selby CP, Chiou YY, Ozkan-Dagliyan I, Gaddameedhi S, Sancar A. (2014) Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian clock. *Genes Dev*, 28(18): 1989-1998.
- Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci, USA* 101(15): 5339-5346.
- Yoo SH, Ko CH, Lowrey PL, Buhr ED, Song EJ, Chang S, Yoo OJ, Yamazaki S, Lee C, Takahashi JS. (2005) A noncanonical E-box enhancer drives mouse period2 circadian oscillation in vivo. *Proc Natl Acad Sci, USA* 102(7): 2608-2613.
- Young MW, Kay SA. (2001) Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nature Rev Genet*, 2(9): 702-715.
- Zanquetta MM, Corrêa-Giannella ML, Monteiro MB, Villares SM. (2010) Body weight, metabolism and clock genes. *Diabetol Metab Syndr*, 2: 53.
- Zhang R, Lahens NF, Balance HI, Hugles ME, Hogenesch JB. (2014) A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci, USA* 45(162): 19-24.
- Zhu H, Green CB. (2001) Three cryptochromes are rhythmically expressed in *Xenopus laevis* retinal photoreceptors. *Mol Vis*, 7: 210-215.
- Zhu H., LaRue S, Whiteley A, Steeves TD, Takahashi JS, Green CB (2000) The *Xenopus* clock gene is constitutively expressed in retinal photoreceptors. *Brain Res Mol Brain Res* 75(2): 303-308.

- Zhu LJ, Altmann SW. (2005) mRNA and 18S-RNA coapplication-reverse transcription for quantitative gene expression analysis. *Anal Biochem*, 345(1): 102-109.
- Zhuang M, Wang Y, Steenhard BM, Besharse JC. (2000) Differential regulation of two period genes in the *Xenopus* eye. *Brain Res Mol Brain Res*, 82(1-2): 52-64.
- Ziv L, Gothilf Y. (2006) Period2 expression pattern and its role in the development of the pineal circadian clock in zebrafish. *Chronobiol Int*, 23(1-2): 101-112.
- Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*, 20(6): 1103-1110.