

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Luciane Rogéria dos Santos

Expressão Gênica de Receptor de Melatonina
(*Mel_{1C}*) e Melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) em
Melanóforos de *Xenopus laevis*

Gene Expression of Melatonin Receptor (*Mel_{1C}*)
and Melanopsins (*Opn4x* and *Opn4m*) in
Xenopus laevis Melanophores

São Paulo

2010

Luciane Rogéria dos Santos

Expressão Gênica de Receptor de Melatonina
(*Mel_{1C}*) e Melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) em
Melanóforos de *Xenopus laevis*

Gene Expression of Melatonin Receptor (*Mel_{1C}*)
and Melanopsins (*Opn4x* and *Opn4m*) in
Xenopus laevis Melanophores

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Fisiologia, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa Dra Ana Maria de Lauro Castrucci

São Paulo

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS/USP

S237e Santos, Luciane Rogéria dos
Expressão Gênica de Receptor de Melatonina (*Mel_{1c}*) e
Melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) em Melanóforos de *Xenopus*
laevis / Luciane Rogéria dos Santos. -- São Paulo: L. R. dos
Santos, 2010.
77p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto
de Biociências, Departamento de Fisiologia, 2010.

1. Melatonina 2. Melanopsina 3. Célula Pigmentar 4.
Fotoperíodo I. Universidade de São Paulo, Instituto de
Biociências, Departamento de Fisiologia . II. Título.

LC: QP 572.M44

Nome: Santos, Luciane Rogéria dos

TÍTULO: Expressão Gênica de Receptor de Melatonina (*Mel_{1C}*) e
Melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) em Melanóforos de *Xenopus laevis*

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título
de Mestre em Fisiologia, na Área de
Fisiologia Geral.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr (a)._____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Prof.Dr (a)._____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Prof.a. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci

Orientadora

Julgamento:_____ **Assinatura:**_____

*"Estamos todos na sarjeta, mas alguns de nós estão
olhando para as estrelas."*

(Oscar Wilde)

*À minha família, base de tudo que sou
e minha fortaleza.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por tudo que sou e tudo que tenho.

À Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci, por ser um exemplo de dedicação e seriedade na prática de Ciência. Agradeço imensamente pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório sob sua orientação, pelo seu jeito de ser, pelo apoio, pelo carinho, pela companhia, pela amizade e por tornar possível a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Lourdes e Dantas, que me ensinaram o que é a vida com seu amor incondicional, sempre me ajudando a realizar meus sonhos.

Aos meus irmãos, Rogério e Ricardo que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso. Obrigada por emprestar o carro mesmo tendo que sair na chuva, pelo computador que você tanto gosta, por tudo. Sem vocês eu não conseguiria realizar esse trabalho.

Aos meus sobrinhos Angela e Henrick que iluminam minha vida.

Aos meus primos e tios que sempre torcem e rezam por mim. Vocês são muito importantes na minha vida, são minha fortaleza.

Aos meus amigos que sempre me deram força e, pacientemente, entenderam minha ausência em muitos momentos importantes, mas permaneceram sempre ao meu lado. A minha irmã do coração Laura, que mesmo distante torce por mim e me apóia. Sinto muito sua falta!

Ao Felipe, meu amor e melhor amigo, obrigada pelo carinho, paciência, companheirismo e por fazer parte da minha vida. Sou uma pessoa melhor desde que te conheci.

Aos meus amigos de laboratório Thiago e Jennifer (que sempre me alegravam o dia e se tornaram grandes amigos), Maria Nathália (grande companhia em todas longas madrugadas com experimentos, pelas muitas risadas dentro e fora do laboratório), Gláucia, Leonardo, Maristela, Bruno (pela orientação intelectual e experimental) e ao técnico Márcio (por toda ajuda na manutenção do laboratório e por se tornar um grande amigo).

Ao Prof. José Cipolla-Neto do Instituto de Ciências Biomédicas/USP pela colaboração prática e teórica neste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Aparecia Visconti pelo auxílio durante minha iniciação científica.

*Aos melanóforos de *Xenopus laevis*.*

Aos estudantes de pós-graduação do Instituto de Biociências/USP pela amizade.

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

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

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências/USP pela dedicação, pelo café, pelo “bom dia!”.

À Universidade de São Paulo pelo espaço e continuação de minha formação.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

" Escolho meus amigos não pela pele ou outro arquétipo qualquer, mas pela pupila. Tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante. A mim não interessam os bons de espírito nem os maus de hábitos. Fico com aqueles que fazem de mim louco e santo. Deles não quero resposta, quero meu avesso. Que me tragam dúvidas e angústias e agüentem o que há de pior em mim. Para isso, só sendo louco. Quero-os santos, para que não duvidem das diferenças e peçam perdão pelas injustiças. Escolho meus amigos pela cara lavada e pela alma exposta. Não quero só o ombro ou o colo, quero também sua maior alegria. Amigo que não ri junto não sabe sofrer junto. Meus amigos são todos assim: metade bobeira, metade seriedade. Não quero risos previsíveis nem choros piedosos. Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça. Não quero amigos adultos nem chatos. Quero-os metade infância e outra metade velhice. Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto e velhos, para que nunca tenham pressa. Quero amigos para saber quem eu sou... Pois os vendo loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esquecerei de que "normalidade" é uma ilusão imbecil e estéril..."

(Loucos e Santos - Oscar Wilde)

RESUMO

Muitos vertebrados ectotérmicos ajustam suas cores corporais para serem confundidos com o ambiente, através da migração de pigmentos no interior de cromatóforos, regulada por sistemas neurais e/ou hormonais. Essas mudanças de coloração auxiliam no mimetismo, termorregulação, comunicação social e expressão de comportamentos como excitação sexual, agressividade e medo. Entretanto, cromatóforos de inúmeras espécies respondem diretamente à luz. Estudos sobre a resposta à luz nos melanóforos de *Xenopus laevis* levaram à descoberta do fotopigmento melanopsina, uma opsina que está presente na retina de todos os grupos de vertebrados, inclusive no homem.

Vários hormônios podem regular o processo de mudança de cor nos vertebrados, dentre eles a melatonina, hormônio secretado pela glândula pineal. Este é o principal órgão responsável pela integração do sistema neuroendócrino dos vertebrados ao meio ambiente, traduzindo direta ou indiretamente a informação do fotoperíodo em sinal hormonal, coordenando assim os ritmos fisiológicos circadianos com o meio ambiente.

Os objetivos deste trabalho foram: investigar se a expressão gênica das melanopsinas e do receptor de melatonina em melanóforos de *Xenopus laevis* apresenta variação temporal sob diferentes condições luminosas; verificar se a expressão gênica das melanopsinas e do receptor de melatonina em melanóforos de *Xenopus laevis* pode ser modulada por melatonina.

Dados do trabalho demonstram que as melanopsinas em melanóforos de *Xenopus laevis* são sincronizadas aos ciclos de claro-escuro, expressando um robusto ritmo ultradiano com período de 16h para *Opn4m* e um ritmo circadiano

com período de 25h para *Opn4x*. Curiosamente, essa ritmicidade só foi observada quando os melanóforos foram mantidos em ciclos 12C:12E e foram submetidos à troca de meio durante a fase clara do fotoperíodo. A constância na expressão gênica do receptor de melatonina *Mel_{1c}*, quer sob diferentes regimes de luz, quer sob tratamento por melatonina, sugere que esse gene é extremamente estável, não sofrendo alterações ao ser submetido a estímulos exógenos, podendo ser considerado um gene constitutivo. O tratamento com melatonina por 6h na fase clara do fotoperíodo, além de inibir drasticamente a expressão de *Opn4x* e *Opn4m*, aboliu a ritmicidade de ambas as melanopsinas.

Nossos resultados indicam que os melanóforos de *Xenopus laevis* possuem um relógio funcional e podem ser caracterizados como relógios periféricos, porém necessitam do ciclo claro-escuro associado à troca de meio para exibirem sua sincronização.

ABSTRACT

Many ectothermic vertebrates adjust their body color to mimic the environment, through the pigment migration within chromatophores, regulated by neural and / or hormonal systems. These changes in color help in camouflage, thermoregulation, social communication and behaviors such as sexual arousal, aggressiveness and fear. However, chromatophores of several species respond directly to light. Studies about light response in melanophores of *Xenopus laevis* have led to the discovery of the photopigment melanopsin, an opsin that is present in the retina of all vertebrate groups, including man.

Various hormones may regulate the process of color change in vertebrates, among them melatonin, hormone secreted by the pineal gland. This is the main organ responsible for the integration of the neuroendocrine system of vertebrates to the environment, translating directly or indirectly the photoperiod information into hormonal signal, thus coordinating physiological circadian rhythms with the environment.

The objectives of this work were: to investigate whether the gene expression of melanopsins and melatonin receptor in melanophores of *Xenopus laevis* exhibited temporal variation under different light conditions; to verify whether gene expression of melanopsins and melatonin receptor in melanophores of *Xenopus laevis* could be modulated by melatonin.

Our data show that melanopsins in melanophores of *Xenopus laevis* are synchronized to light-dark cycles, expressing a robust ultradian rhythm with a period of 16h for *Opn4m* and circadian rhythm with a period of 25h for *Opn4x*. Interestingly, the rhythm was only observed when the melanophores were

maintained in 12L: 12D regime and medium change was performed during the fotophase of photoperiod. The constancy in the expression of melatonin receptor *Mel_{1c}*, either under different light regimes, or under treatment by melatonin, suggesting that this gene is extremely stable, not being altered by exogenous stimulus, and may be considered a constitutive gene. Treatment with melatonin for 6h during the fotophase of the photoperiod, drastically inhibit the expression of *Opn4x* and *Opn4m*, and abolished the rhythm of both melanopsins.

Our results indicate that melanophores of *Xenopus laevis* possess a functional clock and can be characterized as peripheral clocks, but they need the light-dark cycle associated with change of medium to exhibit their synchronization.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
A célula pigmentar	1
As opsinas e a resposta à luz	2
Melanóforos dérmicos de <i>Xenopus laevis</i> e melanopsina	4
Sistema Circadiano	7
Regulação das células pigmentares por hormônios. A melatonina	9
OBJETIVOS.....	18
Geral	18
Específico.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
Linhagem celular e condições de cultura	19
Verificação do padrão temporal de expressão de melanopsinas (<i>Opn4x</i> e <i>Opn4m</i>) e receptor de melatonina <i>Mel_{1C}</i> na ausência e na presença de melatonina	19
Extração de RNA, RT-PCR e PCR quantitativo	21
A) PCR quantitativo multiplex	22
B) PCR quantitativo simplex	23
Análise dos resultados	25
RESULTADOS	27
Quantificação dos níveis de RNAm para receptor de melatonina <i>Mel_{1C}</i>	27
12C:12E sem troca de meio	27
Escuro constante com troca de meio, na ausência e na presença de melatonina	28

12C:12E com troca de meio durante a fase clara, na ausência e na presença de melatonina.....	31
12C:12E com troca de meio durante a fase escura, na ausência e na presença de melatonina.....	34
Quantificação dos níveis de RNAm de melanopsina homóloga à de mamífero <i>Opn4m</i>	37
12C:12E sem troca de meio	37
Escuro constante com troca de meio, na ausência e na presença de melatonina	38
12C:12E com troca de meio durante a fase clara, na ausência e na presença de melatonina.....	41
12C:12E com troca de meio durante a fase escura, na ausência e na presença de melatonina.....	45
Quantificação dos níveis de RNAm de melanopsina de <i>X. laevis Opn4x</i>	48
12C:12E sem troca de meio	48
Escuro constante com troca de meio, na ausência e na presença de melatonina	49
12C:12E com troca de meio durante a fase clara, na ausência e na presença de melatonina.....	52
12C:12E com troca de meio durante a fase escura, na ausência e na presença de melatonina.....	56
Resumo dos resultados.....	59
DISCUSSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

INTRODUÇÃO

A célula pigmentar

Os vertebrados possuem células pigmentares derivadas da crista neural embrionária, denominadas cromatóforos (BAGNARA & HADLEY, 1973), que são classificadas de acordo com seu conteúdo pigmentar e cor. Existem cinco tipos de cromatóforos: melanóforos (pretos ou pardos e apresentam grânulos de melanina chamados melanossomos); eritróforos (vermelhos e apresentam pigmentos carotenóides e pteridínicos em eritrossomos); xantóforos (amarelos e contêm carotenóides e pteridinas em xantossomos); leucofóros (brancos e contêm grânulos de purinas denominados leucossomos) e iridóforos (contêm purinas em placas achatadas chamadas iridossomos) (FUJII & OSHIMA, 1986; FUJII, 1993; FUJII, 2000).

A mudança de cor nos animais pode ser lenta, chamada de mudança de cor morfológica, sendo determinada pela variação na quantidade de pigmentos e/ou de células pigmentares. Quando a mudança de cor é promovida pela translocação rápida de grânulos de pigmentos ao longo dos processos dendríticos das células pigmentares, fazendo com que a mudança de cor ocorra em minutos, é denominada de mudança de cor fisiológica, sendo uma característica de crustáceos e vertebrados ectotérmicos (FUJII, 2000).

O melanócito é a única célula pigmentar remanescente em aves e mamíferos, sendo que a capacidade de rápida migração pigmentar foi perdida (SHERBROOKE *et al.*, 1988). Os grânulos são lentamente deslocados ao longo das projeções dendríticas para os queratinócitos vizinhos, penas ou pêlos (BOISSY, 1988).

As opsinas e a resposta à luz

A fotorrecepção visual se dá, nos mamíferos, através da retina onde são encontrados os fotorreceptores cones e bastonetes que transformam sinais luminosos em sinais elétricos. O pigmento visual encontrado nos bastonetes, a rodopsina, é constituído pelo aldeído da vitamina A, retinal, ligado a uma proteína, opsina, que pode assumir diferentes conformações isoméricas. Os cones possuem pigmentos visuais formados por 11- cis- retinal e uma opsina que varia, e assim, confere ao cone a capacidade de absorver diferentes comprimentos de onda de luz (BALDO, 2007). Os genes para rodopsina em vertebrados apresentam uma organização de exons e introns altamente conservada, contendo cinco exons e quatro introns (YOKOYAMA, 2000). Porém, em todos os teleósteos já estudados, os genes que codificam para rodopsina não possuem introns (FITZGIBBON *et al.*, 1995).

Nos anfíbios, répteis e aves, a pineal juntamente com os olhos laterais, constitui um eficiente fotorreceptor, sendo os pinealócitos estruturas semelhantes aos fotorreceptores da retina (GOLOMBEK & ROBLERO, 2003). O órgão parietal de peixes e lagartos é importante para a percepção de amanhecer e entardecer e possui pigmentos não retinianos (TERAKITA *et al.*, 2004; SU *et al.*, 2006). Outras células de vertebrados que também apresentam uma resposta funcional quando expostas à luz e podem servir como fotorreceptoras extra-retinais são os melanóforos (ZATZ *et al.*, 1988), neurônios (OLIVER & BAYLE, 1982) e miócitos iridiais (BARR, 1989). É mais comum a expressão funcional de fotorreceptores extra-retinais em ectotermos e aves do que em mamíferos, e são mais freqüentes em animais mais jovens, sendo assim idade-dependentes (ROLLAG, 1996a).

Muitos vertebrados ectotérmicos ajustam suas cores corporais para serem confundidos com o ambiente, através da migração de pigmentos no interior de cromatóforos, regulada por sistemas neurais e/ou hormonais (BAGNARA & HADLEY, 1973). Essas mudanças de coloração auxiliam no mimetismo, termorregulação, comunicação social e expressão de comportamentos como excitação sexual, agressividade e medo. Entretanto, cromatóforos de inúmeras espécies respondem diretamente à luz (BAGNARA, 1957; BAGNARA & HADLEY, 1973; FUJII, 2000).

Quando os cromatóforos apresentam independência do sistema nervoso e/ ou endócrino, como por exemplo, em estágios embrionários e larvais de teleósteos e anfíbios, pode ocorrer resposta direta à luz visível incidente (WAKAMATSU, 1978; OHTA, 1983; OHTA & MURAMATSU, 1988). Com o desenvolvimento, essa resposta fica submissa ao controle neuroendócrino e só reaparece, na maioria dos casos, se os cromatóforos forem desnervados ou colocados em cultura primária (FUJII, 2000). Porém, em alguns teleósteos, respostas fóticas foram observadas mesmo em cromatóforos inervados de adultos. Em *Oryzias latipes*, por exemplo, os xantóforos (OSHIMA *et al.*, 1998) e leucóforos (OHTA & SUGIMOTO, 1980) respondem à luz com agregação de seus pigmentos, resposta esta que não é afetada por bloqueadores de adrenoceptores, demonstrando assim que não é evocada via neurotransmissores catecolaminérgicos. A luz pode agregar ou dispersar os grânulos de pigmento nos eritróforos de *Oreochromis niloticus* (BAN *et al.*, 2005), fotossensibilidade que não depende da idade do animal (OSHIMA & YOKOZEKI, 1999). Nos comprimentos de onda de 365, 400 ou 600nm, ocorre agregação, enquanto em 500nm a resposta é de dispersão (SATO *et al.*, 2004).

Melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis* e melanopsina

Nos mamíferos, os núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos (NSQs), que são os relógios biológicos centrais, recebem informações de iluminação ambiental através de uma projeção da via retino-hipotalâmica (MOORE & KLEIN, 1974). Fotorreceptores clássicos, cones e bastonetes, não são essenciais para o ajuste dos NSQs aos ciclos claro-escuro. Porém, a enucleação bilateral em camundongos leva o relógio a correr em livre-curso, com um período menor que 24h. Esse fato levou à descoberta de fotorreceptores retiniais outros que não cones e bastonetes, portadores do fotopigmento melanopsina (PROVENCIO *et al.*, 2002), capaz de capturar a irradiação luminosa e enviar essa informação aos NSQs (BERSON *et al.*, 2002).

Estudos sobre a resposta à luz nos melanóforos de *Xenopus laevis* levaram à descoberta do fotopigmento melanopsina (PROVENCIO *et al.*, 1998). A melanopsina é uma opsina que foi inicialmente clonada de melanóforos de *Xenopus laevis* (PROVENCIO *et al.*, 1998) e está presente na retina de todos os grupos de vertebrados, inclusive no homem (PROVENCIO *et al.*, 2000). Está presente em uma subpopulação de células ganglionares da retina dos mamíferos (PROVENCIO *et al.*, 2002), o que as torna sensíveis à luz, e que envia a informação luminosa para os NSQs (BERSON *et al.*, 2002; HATTAR *et al.*, 2002). Essas células medeiam respostas fóticas não visuais, como constrição pupilar e supressão de melatonina, além de serem responsáveis pelo ajuste do relógio biológico ao ciclo de claro-escuro (PANDA *et al.*, 2002; 2003). Seu padrão de expressão difere entre várias classes, mas sua presença é constante em células ganglionares da retina (PROVENCIO *et al.*, 2000; 2002; ROLLAG *et al.*, 2003).

Em 2006, Bellingham e colaboradores demonstraram a existência de dois genes *Opn4* codificando melanopsinas em vertebrados não-mamíferos. Essa segunda melanopsina, *Opn4m*, apresenta muito maior homologia com a de mamíferos, do que com a de *Xenopus laevis*.

Foi demonstrada em nosso laboratório a expressão funcional das duas melanopsinas em células embrionárias do teleósteo *Danio rerio* e de retina de *Gallus gallus*, de rodopsina na linhagem de eritroforoma GEM-81 do teleósteo *Carassius auratus* (IM *et al.*, 2006) e de melanoma S-91 e B-16 do camundongo *Mus musculus* (CASTRUCCI *et al.*, dados ainda não publicados). Confirmamos ainda a expressão das duas melanopsinas, a de *Xenopus*, *Opn4x*, e a homóloga à de mamíferos, *Opn4m*, nos melanóforos embrionários de *Xenopus laevis*.

Em um animal ancestral, a expressão de uma opsina em uma célula pigmentar poderia ter sido o começo para que um complexo sistema molecular se desenvolvesse, resultando no que hoje chamamos de visão (ARNHEITER, 1998).

A foto-resposta e o espectro de ação da luz nos melanóforos de *Xenopus* demonstraram inicialmente o envolvimento de uma opsina (DANIOLOS *et al.*, 1990) e a dependência do aldeído retinal (ROLLAG & LYNCH, 1993), essencial para resposta de fotodispersão (ROLLAG, 1996b). De fato, após clonagem pelo grupo de Rollag (PROVENCIO *et al.*, 1998), foi demonstrado que a melanopsina, assim como as demais opsinas, possui um resíduo lisina no sétimo domínio transmembrânico, que é necessário para a formação de uma base *shiff* com 11-cis-retinaldeído (EBREY & KOUTALOS, 2001). Sua estrutura protéica deduzida suporta a hipótese de que seja um membro da família das opsinas que, por sua vez, fazem parte da superfamília de receptores acoplados à proteína G (PROVENCIO *et al.*, 1998; ISOLDI *et al.*, 2009).

Duas respostas cromáticas primárias são observadas em melanóforos de *Xenopus laevis*, sendo a mais comum a dispersão dos grânulos de pigmentos pelo citoplasma quando os melanóforos de anfíbios são expostos à luz (Fig. 1; DANIOLOS *et al.*, 1990; ROLLAG, 1993). A fotodispersão ocorre em melanóforos derivados de embriões de 2 dias (estágio 34) e permanece em explantes da crista neural e em cultura de melanóforos isolados. Fotoagregação ocorre em melanóforos da cauda de girinos de 12 a 32 dias (estágios 49-55) (MORIYA *et al.*, 1996).

A agregação de grânulos para a região perinuclear após exposição à luz é menos comum (SELDENRIJK *et al.*, 1979). Essa resposta ocorre na região espectral compreendida entre 400-600 nm, sendo a resposta máxima obtida em 500nm (MORIYA *et al.*, 1996). Este espectro de ação é similar ao espectro de absorção do pigmento visual, rodopsina (DANIOLOS *et al.*, 1990). Já a resposta de dispersão ocorre em 460nm através do fotopigmento melanopsina (ISOLDI *et al.*, 2005; 2009).

A fotossensibilidade – dispersão dos melanossomos em resposta à luz - dos melanóforos embrionários, modelo que temos no laboratório, faz deles um modelo ideal para investigar o sinal de transdução das melanopsinas (ROLLAG *et al.*, 2000).

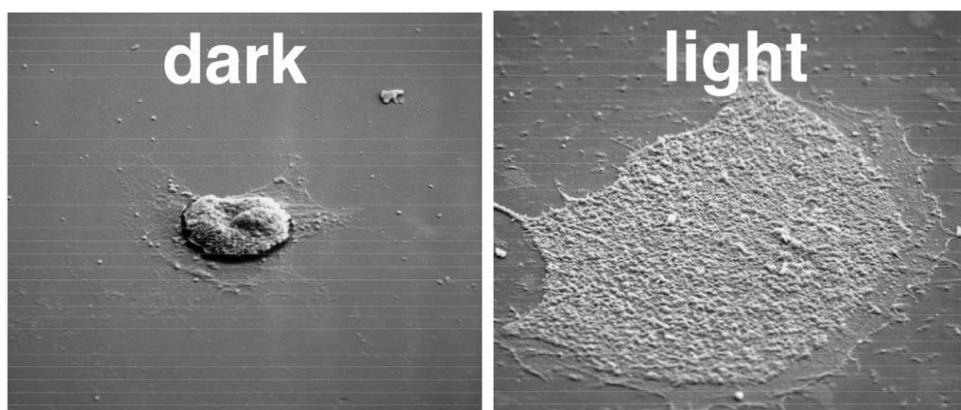


Figura 1. – Dispersão dos melanossomos em resposta à luz em melanóforos embrionários de *Xenopus laevis*. Extraído de ROLLAG *et al.*, 2003.

De fato demonstramos em nosso laboratório que a luz em comprimento de onda de 460nm maximamente estimula as melanopsinas (ou uma delas), desencadeando uma cascata de ativação da via dos fosfoinosítídeos. Em última instância, leva ao aumento de Ca^{2+} citossólico e aumento de GMPc (ISOLDI *et al.*, 2005). No entanto, bloqueio do aumento de GMPc não impede a dispersão pigmentar, deixando ainda em questão o papel desse nucleotídeo cíclico na foto-resposta. A fonte de cálcio também é controversa. Alguns autores relatam que cálcio se origina de compartimentos intracelulares (KUMBALASIRI *et al.*, 2007), outros do meio externo através de canais TRP6 ou TRP7 (WARREN *et al.*, 2006; SEKARAN *et al.*, 2007). Em cultura de células ganglionares expressando melanopsina de rato, 90% da resposta à luz pode ser bloqueada por tetrodotoxina, demonstrando que a maior parte de Ca^{2+} entra na célula através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (HARTWICK *et al.*, 2007).

Melanóforo de *Xenopus laevis* mostrou-se também ideal para o estudo da sinalização de hormônios como o α -MSH e sua interação com a via de transdução da luz, através de proteínas ancoradoras, como a AKAP, recentemente publicado por nosso laboratório (ISOLDI *et al.*, 2009).

Sistema circadiano

Desde os organismos unicelulares até os vertebrados, os seres vivos estão estruturados no tempo e no espaço. Muitos parâmetros bioquímicos, fisiológicos e comportamentais exibidos pelos organismos apresentam flutuações diárias, sendo que a maioria destes ritmos persiste em condições constantes, demonstrando que eles são controlados por osciladores endógenos. Os ritmos que persistem em condições constantes, e apresentam um período de aproximadamente 24 horas, são

chamados de ritmos circadianos (MENAKER *et al.*, 1997), sendo que muitas, se não praticamente todas, as variáveis fisiológicas e comportamentais de um mamífero apresentam ritmicidade circadiana. Ritmos que apresentam mais de um ciclo completo a cada 24h (período menor do que 20h, como por exemplo, secreções hormonais) são denominados ultradianos. Já as variáveis, cujo período de repetição é maior do que 28h, apresentam ritmos infradianos, como o ciclo menstrual feminino e outros processos reprodutivos que, na maioria da espécie, apresenta uma flutuação anual ou sazonal (AFECHE & CIPOLLA-NETO, 2008).

A organização circadiana estende-se tanto amplamente quanto profundamente dentro da fisiologia e do comportamento dos organismos multicelulares. No núcleo do sistema que regula e controla os diversos ritmos que podem ser medidos em vertebrados, são encontradas três estruturas que unidas por suas interconexões formam um “eixo circadiano” central comum a todos os vertebrados. Essas estruturas são as retinas, o complexo pineal (pineal e o órgão/olho parietal) e o núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo (MENAKER *et al.*, 1997).

O sistema circadiano é organizado hierarquicamente por osciladores localizados fora do oscilador principal (NSQs), denominados *osciladores periféricos* (DAVIDSON *et al.*, 2005). Estes podem ser arrastados por um ciclo ambiental diferente do *Zeitgeber* (doador do tempo em alemão) que arrasta o ritmo de atividade ou repouso de uma espécie. Os osciladores periféricos podem ou não estar acoplados uns aos outros, porém, estão ligados aos núcleos supraquiasmáticos. Desta forma, sua expressão está conectada e depende da estrutura temporal do organismo, ainda que eles sejam auto-sustentados e,

portanto, suficientes para a geração da oscilação da célula ou tecido em que estão localizados (MOORE-EDE *et al.*, 1982; DAVIDSON *et al.*, 2005).

Diferentemente dos NSQs, os relógios periféricos foram menos estudados, mas já se sabe que ocorrem de peixes a mamíferos. Está bem estabelecido hoje que há diversos osciladores em tecidos periféricos (ABE *et al.*, 2002; DAVIDSON *et al.*, 2005).

Como o marca-passo central isolado expressa ritmo sustentado, persistente por trinta ciclos ou mais, enquanto ritmos periféricos se atenuam em poucos dias (YAMAZAKI *et al.*, 2000), era aceito que havia uma hierarquia do marca-passo central sobre o periférico. Porém, vários laboratórios demonstraram a independência do oscilador em muitos tecidos (ABE *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2005; DAVIDSON *et al.*, 2005), que provavelmente contêm elementos sincronizadores próprios (YOO *et al.*, 2004). A expressão circadiana, observada em tecidos periféricos, pode ser ativada diretamente por exposição à luz tanto em organismos íntegros como em alguns tipos celulares em cultura (WHITMORE *et al.*, 2000), ou por outros sincronizadores como alimento (COSTA *et al.*, 2005; DAVIDSON *et al.*, 2005).

Regulação das células pigmentares por hormônios. A melatonina.

Vários hormônios podem regular o processo de mudança de cor nos vertebrados, dentre eles hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH); hormônio concentrador de melanina (MCH); prolactina; somatolactina; melatonina; catecolaminas (norepinefrina e epinefrina). Além desses hormônios mencionados, vários fatores de ação parácrina atuam para regular as respostas fisiológicas dessas células efectoras, como peptídeos opióides; eicosanóides, em especial as prostaglandinas; óxido nítrico; endotelinas (FUJII, 2000).

A distribuição de α -MSH, MCH, catecolaminas e melatonina, além de seus receptores, é heterogênea em todos os vertebrados, demonstrando a diversidade de mecanismos regulatórios das células pigmentares (SHERBROOKE *et al.*, 1988).

A melatonina é secretada pela glândula pineal, órgão responsável pela integração do sistema endócrino dos vertebrados ao meio ambiente, traduzindo direta ou indiretamente a informação do fotoperíodo em sinal hormonal, coordenando assim os ritmos circadianos com o meio ambiente (EDWARDS & PIVORUN, 1991). A pineal exibe funções sensoriais e/ou neuroendócrinas de acordo com a classe de animais considerada, estando presente, ao longo da escala evolutiva, desde os ancestrais dos vertebrados dos períodos Devoniano e Siluriano (FILADELFI & CASTRUCCI, 1996a).

A melatonina exibe um ritmo diário de secreção, mandando mensagens ao animal para que ele consiga perceber diversas variações ambientais, como o fotoperíodo. É também conhecido como mensageiro do escuro, já que seu pico de secreção ocorre durante a noite. É liberada pela pineal e transportada pelas proteínas do plasma, ficando apenas uma pequena quantidade na própria pineal (FILADELFI & CASTRUCCI, 1996a). Nos anfíbios, seu ritmo de secreção é modulado pelo fotoperíodo e pela temperatura (RAWDING & HUTCHISON, 1992).

Em vertebrados inferiores existe um órgão parapineal que em ciclóstomos, elasmobrânquios e teleósteos é intracraniano, ficando à esquerda do pendúnculo pineal e conecta-se ao gânglio habenular esquerdo. Em anfíbios (órgão frontal) e répteis (olho parietal ou terceiro olho) é extracraniano, embora se conecte ao mesmo gânglio via nervo parietal. O conjunto formado pela pineal e por esses órgãos acessórios é denominado complexo pineal (KORF & OKSCHE, 1986).

Em anfíbios, o desenvolvimento ontogenético da pineal é caracterizado por migração celular a partir de uma zona de proliferação diencefálica, começando na parte posterior e depois para a parte anterior da glândula. Essas células dão origem aos fotorreceptores e as células de suporte. Esse processo forma um gradiente na glândula, com grau de diferenciação aumentando do centro para a periferia (HENDRICKSON & KELLY, 1969). O surgimento da pineal em *Xenopus laevis* inicia-se nos estágios 29 e 30 e o do órgão frontal apenas no estágio 42 de seu desenvolvimento. Os mecanismos moleculares de fotorrecepção desenvolvem-se simultaneamente na retina e na pineal (KORF *et al.*, 1989).

A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano que é captado da circulação e transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através da ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1), cuja atividade está aumentada em duas vezes no período de escuro. O 5-HTP é descarboxilado pela enzima 5-HTP descarboxilase, formando a serotonina. A serotonina, por sua vez é metabolizada a N-acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT), e posteriormente a NAS é utilizada como substrato para a enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) dando como produto final a melatonina (Fig. 2; SIMONNEAUX & RIBELAYGA, 2003).

O passo limitante na síntese de melatonina é a conversão de serotonina à N-acetilserotonina. Esta conversão ocorre apenas no período de escuro e é interrompida no final da noite, ou quando existe um pulso de luz durante o período de escuro. Durante o período de escuro a atividade da enzima N-acetiltransferase está aumentada em até 100 vezes. Este aumento pode ser devido ao aumento da transcrição gênica, como ocorre em roedores (ROSEBOOM *et al.*, 1996), ou à diminuição da degradação da proteína, que é sintetizada continuamente, como

ocorre nos ungulados (SCHOMEURS *et al.*, 2000). Independente do tipo de mecanismo intrínseco que controla o aumento noturno da atividade da N-acetilserotonina, o sinal que ativa este mecanismo é o aumento da liberação de noradrenalina a partir de uma via simpática controlada pelos núcleos supraquiasmáticos (SIMONNEAUX & RIBELAYGA, 2003).

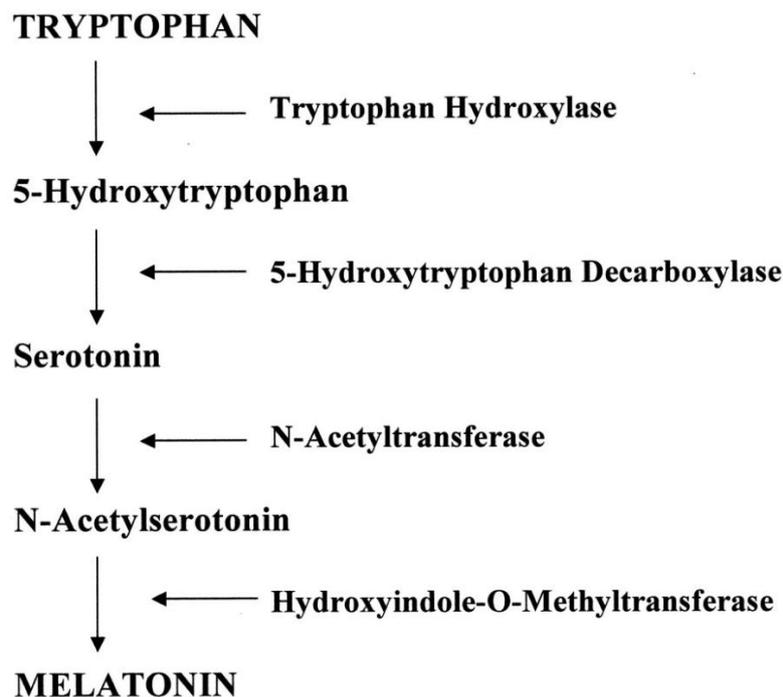


Figura 2. Representação da biosíntese de melatonina pela qual o aminoácido triptofano é convertido em melatonina. As enzimas que convertem o triptofano em serotonina, a THP1 e a 5-HTD, possuem uma ampla distribuição no organismo, sendo a produção de serotonina muito maior nos tecidos neurais. As duas enzimas que, respectivamente, convertem serotonina em N-acetilserotonina e esta em melatonina, possuem uma distribuição mais limitada. Extraído de VIJAYALAXMI *et al.*, 2002

Em alguns animais melatonina inibe a secreção de hormônios gonadotrópicos, promovendo a inibição das gônadas que podem chegar até a involuir durante alguns meses do inverno, voltando a ficarem ativas na primavera e verão, época na qual o

nascimento e sobrevivência de filhotes são mais prováveis (GUYTON & HALL, 1997). Melatonina afeta ainda a metamorfose em anfíbios: a exposição de larvas de *Rana esculenta* e *Rana temporaria* ao escuro constante inibe o crescimento e desenvolvimento. Em *Xenopus laevis*, fotoperíodos curtos estimulam a metamorfose e aumento do peso corpóreo. Esses efeitos sobre a metamorfose de anfíbios parecem ocorrer via modulação da produção de prolactina e/ou hormônios da tireóide, principais reguladores desse processo, pela pineal (EDWARDS & PIVORUM, 1991).

Alguns animais ectotérmicos podem exibir um ritmo circadiano de mudança de cor, com clareamento noturno relacionado à secreção de melatonina (BINKLEY, 1988, FILADELFI & CASTRUCCI, 1996, FUJII, 2000). Entre os teleósteos, vários estudos têm demonstrado a efetividade desse hormônio como agente de agregação de grânulos em células pigmentares, com diferenças entre as espécies em termos de potência (FUJII & OSHIMA, 1986, FUJII, 1993, FILADELFI & CASTRUCCI, 1996a, b). A melatonina induz em mamíferos o clareamento da pelagem em algumas espécies de roedores do hemisfério norte (BINKLEY, 1988). Pode regular o crescimento de pêlos, inibir a melanogênese folicular e afetar a proliferação celular em queratinócitos epidérmicos e melanócitos (SLOMINSKI *et al.*, 1996).

A ação anti-proliferativa de melatonina tem sido descrita em células tumorais diversas, como melanoma de camundongo (SLOMINSKI & PRUSKI, 1993, KADEKARO *et al.*, 2004), feocromocitoma (ROTH *et al.*, 1997), hepatoma (BLASK *et al.*, 1999), carcinoma de rato (SHIU *et al.*, 2000) e melanoma humano (YING *et al.*, 1993, SOUZA *et al.*, 2003), além de alguns estudos *in vivo*. No entanto, ao menos em melanoma humano, alguns trabalhos mostram que esse efeito pode ser controverso, não havendo resposta a melatonina em algumas linhagens (GARCÍA-

PATTERSON *et al.*, 1996, SOUZA *et al.*, 2003), ou mesmo podendo estimular a proliferação em outras (MEYSKENS & SALMON, 1981, HELTON *et al.*, 1993, ROTH *et al.*, 1997).

A melatonina é uma molécula lipossolúvel, entrando facilmente em qualquer célula, podendo atravessar a barreira hemato-encefálica. Sua ação pode ser mediada por receptores de membrana acoplados a proteína G ou pode diretamente modular reações intracelulares (REITER, 1991; POON *et al.*, 1994; GILAD *et al.*, 1998; WRIGHT *et al.*, 2000). Os receptores de membrana de melatonina estão acoplados à proteína G_i, portanto, quando estimulados levam à inibição da adenilil ciclase.

A clonagem do primeiro gene de receptor de melatonina (subtipo Mel_{1c}), a partir de uma linhagem imortalizada de melanóforos de *Xenopus laevis*, foi um grande avanço no estudo dos receptores (EBISAWA *et al.*, 1994). Porém, há relatos anteriores a este que demonstravam a existência de sítios de ligação para melatonina em células pigmentares (HELTON *et al.*, 1993).

Em 1988, Dubocovich classificou os sítios de ligação para melatonina, de acordo com as diferenças no perfil farmacológico, em ML-1 (receptor de alta afinidade – picomolar) e ML-2 (receptor de baixa afinidade - nanomolar). Por clonagem e seqüenciamento, três tipos de receptores de alta afinidade foram identificados em vertebrados (EBISAWA *et al.*, 1994, REPERT *et al.*, 1994, REPERT *et al.*, 1995a, b): Mel_{1a}, Mel_{1b} (ambos encontrados em mamíferos) e Mel_{1c} (*Xenopus laevis*). Com a clonagem dos subtipos fez-se necessária a unificação do sistema de nomenclatura desses receptores: os de alta afinidade Mel_{1a} e Mel_{1b} foram renomeados como MT₁ e MT₂, respectivamente; o sítio de baixa afinidade

ML-2 foi renomeado como MT₃; o receptor Mel_{1c} não foi considerado nessa nomenclatura (SHIU & PANG, 1998).

O receptor MT₁ já foi identificado em espécies de mamíferos e em galinha, na *pars tuberalis* e núcleo supraquiasmático, cérebro e retina (REPPERT *et al.*, 1995a); MT₂ é expresso especialmente na retina de mamíferos (DUBOCOVICH & TAKAHASHI, 1987, REPPERT *et al.*, 1995a, b). Nosjean e colaboradores (2000) purificaram o receptor de melatonina MT₃ a partir do rim de hamster da Síria e apresentaram sua posterior identificação como sendo a quinona redutase 2 (QR2) o homólogo no homem. A enzima quinona redutase 2 foi identificada com 95% de homologia com base em seqüência humana, com 57 dos 71 aminoácidos idênticos. O análogo da molécula de melatonina, 5-metoxicarbonilamino- N-acetil-triptamina (5-MCA-NAT), liga-se seletivamente a sítios MT₃ em rins, testículos e cérebro de hamster mas não é capaz de ligar a sítios MT₁ em retina de aves (LOTUFO *et al.*, 2001).

A ação inibitória da melatonina sobre o NSQ dá-se *via* receptor MT₁ promovendo um aumento do RNAm de *Per* (POIREL *et al.*, 2002; 2003). Também na *pars tuberalis*, *Per1*, *Per2* e *Rev-erb-α* só são rítmicos na ausência de melatonina. Melatonina aumenta a expressão de *Cry* e deprime a expressão máxima dos outros genes do relógio (JOHNSTON *et al.*, 2006). No córtex adrenal, *Per1* e *Cry2* apresentam pico de expressão na metade da fase de luz em camundongos CH3 (que produzem melatonina) e C57 black (incapazes de sintetizar o hormônio). Curiosamente, em CH3, *Bmal1* tem pico de expressão na fase escura, enquanto em C57 black esse aumento de expressão não ocorre (TORRES-FARFAN *et al.*, 2006). Esses resultados sugerem que melatonina regula diferencialmente os vários genes de relógio de forma tecido-dependente.

Em miotubos de rato, foi demonstrado que melatonina reduz o número de receptores de acetilcolina através da ativação de receptores MT1. E, curiosamente, essa resposta, embora evocada por diminuição de AMPc, é insensível a toxina de pertussis. Os autores demonstraram que melatonina se liga à calmodulina, inibindo-a, e reduzindo a atividade de ciclasas sensíveis a calmodulina e decrescendo os níveis de AMPc e GMPc (ALMEIDA-PAULA *et al.*, 2005).

Em melanóforo de *Xenopus laevis*, melatonina agrega os melanossomos através de uma proteína Gi, levando ao decréscimo de AMP cíclico (Fig. 3; ABE *et al.*, 1969; WHITE *et al.* 1987), mecanismo similar àquele descrito para *pars tuberalis* da hipófise de mamíferos (CARLSON *et al.*, 1989; MORGAN *et al.*, 1989; VANECEK & VOLLRATH, 1989). Entretanto, um componente sensível à toxina de cólera também participa dessa resposta, o que implica em acoplamento através de uma proteína Go (MORGAN *et al.*, 1995). Sugeriu-se que melatonina atuaria antagonicamente a um ativador da via do AMPc. E de fato, melatonina inibe a fosforilação de CREB, elemento responsivo a AMPc, fator de transcrição de genes sensíveis a AMPc (McNULTY *et al.*, 1994; KOPP *et al.*, 1997; VONGALL *et al.*, 1998; 2000).

Há relatos de que melatonina também ativaria a fosfolipase C (Fig. 3; McARTHUR *et al.*, 1997; HUNT *et al.*, 2001). Em células transfectadas estavelmente com receptor MT1, foi demonstrado o acoplamento a proteínas Gi2 e Gi3, sensíveis à toxina de pertussis, mediando a inibição de adenilil ciclase, e o acoplamento a Gq/11, insensível a toxina, estimulando uma fosfolipase C (BRYDON *et al.*, 1999; ROKA *et al.*, 1999).

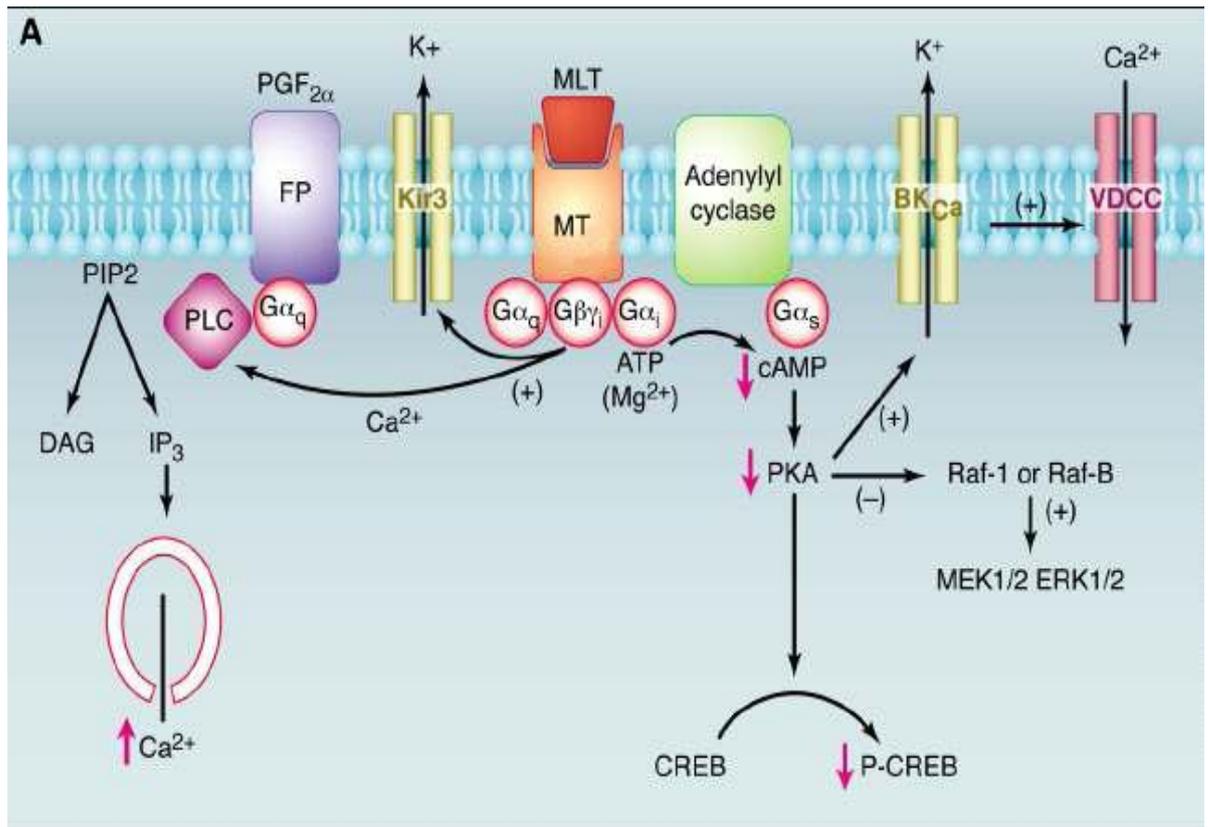


Figura 3. Cascatas de sinalização que podem ser promovidas pela ativação de receptores de melatonina. Extraído de MASANA & DUBOCOVICH, 2001.

A ativação do subtipo MT2, além de acarretar a inibição de adenilil ciclase, via proteína G sensível à toxina de pertussis (REPPERT *et al.*, 1995b), pode também diminuir os níveis de GMPc via uma guanilil ciclase solúvel (PETIT *et al.*, 1999). Mais recentemente, em um trabalho onde MT1 e MT2 foram expressos em células 22Rv1, descobriu-se que o efeito anti-proliferativo da melatonina via MT1 era mediado por um novo mecanismo de sinalização envolvendo ativação de PKA e PKC (TAM *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

Geral

Vários hormônios podem regular o processo de mudança de cor nos vertebrados, dentre eles a melatonina, hormônio secretado pela glândula pineal, o principal órgão responsável pela integração do sistema neuroendócrino dos vertebrados ao meio ambiente, traduzindo direta ou indiretamente a informação do fotoperíodo em sinal hormonal, coordenando assim os ritmos circadianos com o meio ambiente.

Evidências de que as células pigmentares em cultura apresentam respostas biológicas evidentes à luz visível levou à realização de estudos comparativos para verificar os mecanismos de controle da melanopsina de *Xenopus laevis* (*Opn4x*), melanopsina homóloga de mamífero (*Opn4m*) e do receptor de melatonina (*Mel_{1c}*) em melanóforos de *Xenopus laevis*, pelo hormônio melatonina.

Específicos

Verificar se a expressão gênica das melanopsinas e do receptor de melatonina em melanóforos de *Xenopus laevis* apresenta variação temporal sob diferentes condições luminosas;

Investigar se a expressão gênica das melanopsinas e do receptor de melatonina em melanóforos de *Xenopus laevis* pode ser modulada pelo hormônio melatonina.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem celular e condições de cultura

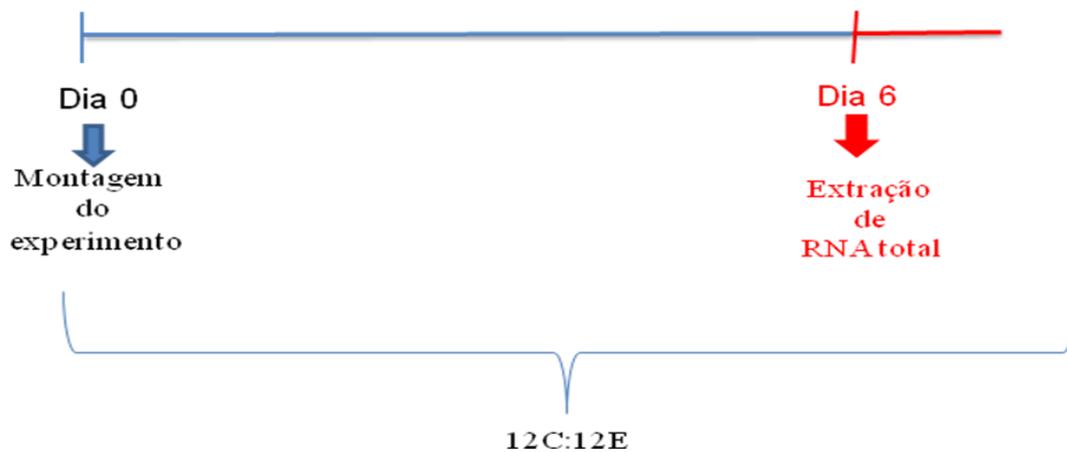
Melanóforos de *Xenopus laevis* (cedidos pelo Dr. Mark Rollag, *Uniformed Services University of Health Sciences*, USA) foram mantidos em meio L-15 60%, galactose 480mg/L, insulina/transferrina/selênio 5mg/L, uridina 4mg/L, L-glutamina 87,6mg/L, L-asparagina 25mg/L, CaCl₂ 152mg/L, MgCl₂ 49,6mg/L, MgSO₄ 51,7mg/L, solução de aminoácidos não essenciais de MEM 0,4X, solução de aminoácidos de MEM 0,2X, solução de vitaminas de MEM 0,3X, suplemento de hipoxantina/timidina 2X, 10% de soro fetal bovino não-inativado, penicilina/estreptomicina/anfotericina B 1% (todos da Gibco, 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 de tripsina/EDTA (ácido etileno diamino tetraacético) e transferidas para novos frascos. Para a realização do experimento, a concentração de soro fetal bovino foi reduzida para 2% e foi adicionado retinaldeído 5X10⁻⁸M. Quando as células eram mantidas sob fotoperíodo, a luminosidade dentro das estufas na fotofase era de ~ 650 lux.

Verificação do padrão temporal de expressão de melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) e do receptor *Mel_{1c}*, na presença e na ausência de melatonina

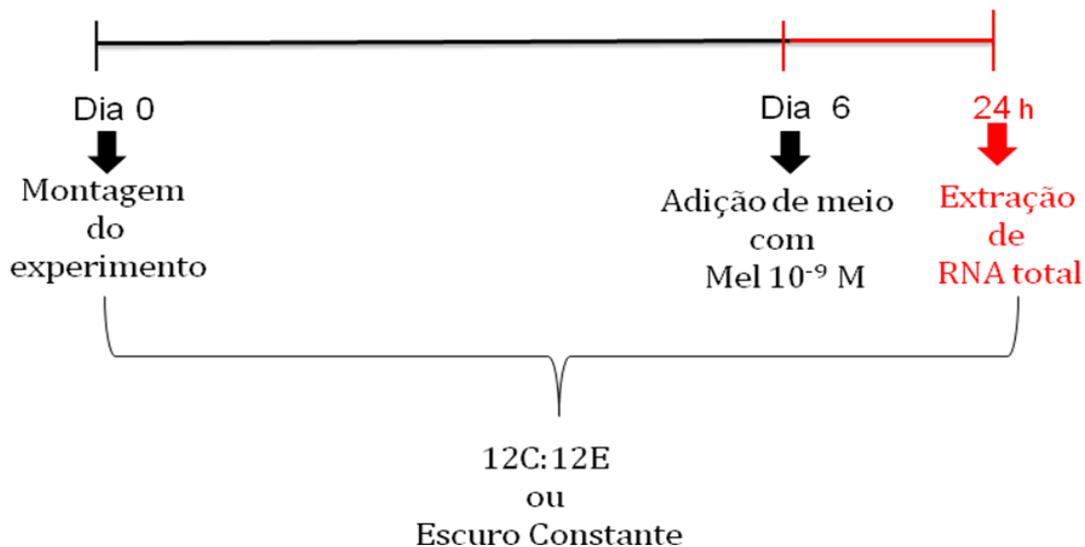
Para a realização dos experimentos, foram utilizados dois protocolos experimentais:

1º Protocolo: As células foram semeadas (2X10⁶ células por frasco de 25cm²), em meio contendo 2% soro, retinaldeído 5X10⁻⁸M e mantidas em 12C:12E por 5 dias.

No início da fase clara do 6º dia o RNA total foi extraído a cada 4 horas (0, 4, 8, 12, 16, 20 ZT).



2º Protocolo: As células foram semeadas (2×10^6 células por frasco de 25cm^2), em meio contendo 2% soro, retinaldeído $5 \times 10^{-8} \text{M}$ e mantidas em 12C:12E, ou em escuro constante por 5 dias. A seguir, foram tratadas por 6h com melatonina 10^{-9}M em uma das seguintes condições: a) início da fase clara do 6º dia; b) início da fase escura do 6º dia; c) início da “fase clara subjetiva” em escuro constante, mantendo-se em paralelo células controle na ausência do hormônio submetidas a duas trocas de meio no mesmo horário em que era realizado o tratamento hormonal. No dia seguinte ao final do tratamento, o RNA total foi extraído a cada 4 horas (0, 4, 8, 12, 16 e 20 ZT quando mantidas em 12C:12E, 6h, 10h, 14h, 18h, 22h e 2h quando mantidas em escuro constante). Para as células que foram tratadas com melatonina ou tiveram o meio trocado durante a fase escura ou em escuro constante, a extração foi realizada no escuro com o auxílio de uma luz vermelha de baixa intensidade luminosa ($\sim 5 \text{ lux}$), proveniente de um iluminador Konex com lâmpada vermelha de 7 W e com filtro Safe-Light GBX-2 (Kodak, Brasil).



Extração de RNA, RT-PCR e PCR quantitativo

O RNA total de células em cultura foi obtido com a utilização do Tri-Reagent-LS (Sigma, EUA) ou Trizol (Gibco, EUA). Após o descarte do meio foi adicionado 1ml do Tri-Reagent-LS 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. Adicionou-se 200 μ L de 1-bromo-3-cloropropano (Sigma, EUA), e em seguida, as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 seg. As amostras foram incubadas por 15 min à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 xg por 15 min a 4°C, após o que, separou-se a fase superior que contém o RNA. O RNA foi precipitado com a adição de 650 μ L de isopropanol (Sigma, EUA), por 10 min à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 xg por 35 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA lavado com 1,3 mL de etanol 75%. O RNA foi recuperado por centrifugação a 12.000 xg por 15 min a 4°C, e a lavagem com etanol repetida, sendo as amostras colocadas a -80°C por no mínimo 1 h. Após nova centrifugação, o etanol foi descartado e o precipitado de RNA deixado por 10 min à temperatura ambiente para

evaporação do excesso de etanol. O RNA foi ressuspenso em 10-50µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (H₂O DEPC, Ambion, EUA), e tratado com DNase conforme instruções do fabricante (*turbo-DNA-free*TM, Ambion, EUA). Resumidamente, a cada amostra foi adicionado 10% de volume do tampão para DNase I e 1 µL de DNase I. A seguir, as amostras foram incubadas por 30 min a 37°C. Foram acrescentados 10% do volume de reagente de inativação, seguido por incubação por 2 min à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 xg por 2 min para precipitar o reagente de inativação com a DNase, transferindo-se o sobrenadante contendo o RNA para novo *ependorf*.

A concentração de RNA foi determinada por leitura da absorbância em 260 nm em espectrofotômetro (Nanodrop). A reação de transcriptase reversa (RT-PCR) foi realizada com 2 µg de RNA total, utilizando 2 µL de oligonucleotídeos randômicos (50ng/µl, Invitrogen, EUA) e 2 uL de dNTPs (10mM, Invitrogen, EUA), em reação com volume final de 26 uL corrigido com H₂O DEPC. O tubo contendo essa mistura de reação foi aquecido por 5 min a 65°C. Imediatamente após a incubação, foi transferido para cuba com gelo, adicionando-se 8 µl de tampão de PCR 5X, 2 uL de DTT 10mM, 2 uL do inibidor de ribonuclease 40U/uL, e 2 uL de Superscript III 200U/uL (todos da Invitrogen, EUA), finalizando um volume de 40 µL por reação. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada por 5 min a 25°C, e 50 min a 50°C, sendo a reação inativada a 70°C por 15 min, e o cDNA mantido a 4°C. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subsequentes de PCR quantitativo (em tempo real).

A. PCR quantitativo multiplex. Para esses ensaios, foram preparadas soluções contendo os oligonucleotídeos (300nM para *Opn4x*, 50nM para RNA 18S, IDT, EUA), sondas (200nM para *Opn4x*, 50nM para 18S, IDT, EUA), Platinum

Supermix qPCR 2x (Invitrogen, 100mM de KCl, 40mM de Tris-HCl, 400uM de dNTPS, PlatinumTaq DNA polimerase 0,1 U/uL e 6mM de MgCl₂) complementado com 1,8 uL/tubo de MgCl₂ 50mM, 1 uL/tubo de dNTPs 10mM e 0,45 uL/tubo de Platinum Taq polimerase 200 U/mL e H₂O DNaseRNase-free (Ambion Inc.), para volume final de 30 µL/poço, para obtenção de concentrações finais de 6mM de MgCl₂, 0,4mM de dNTPS, 0,1U/mL de Platinum Taq DNA polimerase. Essa solução foi aliquotada (cada alíquota suficiente para 3,5 poços) em tubos *ependorf* e o cDNA de cada amostra dos diferentes tratamentos descritos acima adicionado (3,5 µL/alíquota) a um tubo. As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa de experimento (28 µL/poço). Controles negativos foram incluídos rotineiramente, feitos sem cDNA. Todos os ensaios foram realizados em um termociclador iCycler (BioRad Laboratories), nas seguintes condições: 7 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 10 seg a 95°C e 1 min a 60°C.

B. PCR quantitativo simplex. Para o receptor de melatonina (*Mel_{1C}*) e melanopsina homóloga à de mamífero (*Opn4m*), as reações de PCR em tempo real foram feitas com um par de *primers* específicos (IDT, EUA) para o receptor de melatonina e para melanopsina (desenhados pelo programa Primer Express, Applied Biosystems, EUA), com a utilização do fluoróforo *SYBR Green*, em soluções independentes.

Para os ensaios, foram preparadas soluções contendo os *primers*, *SYBR*[®] *GreenER*[™] *qPCR SuperMix for iCycler*[®] 2x (Invitrogen, EUA) e H₂O DNaseRNase-free (Ambion, EUA), obtendo-se uma concentração final de 300nM para os *primers* de melanopsina e receptor de melatonina e 50nM para os *primers* do RNA 18S. Cada uma dessas soluções foi aliquotada (48 µL, sendo cada alíquota suficiente para 2 poços) em tubos *ependorf* e o cDNA de cada amostra foi adicionado

(2 μ L/alíquota). As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa de experimento (23 μ L/poço). Controles negativos foram incluídos rotineiramente, feitos sem cDNA. Todos os ensaios foram realizados em um termociclador iCycler[®] (Bio-Rad Laboratories, E.U.A.), nas seguintes condições: ciclo 1: 1x 50°C por 2 min, ciclo 2: 1x 95° por 8 min e 30 seg; ciclo 3: 40x 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min; ciclo 4: 1x 95°C por 1 min, 1x 55°C por 1 min; ciclo 5: 80x 55°C por 10 seg, com aumento gradativo de 0,5° C. O fluoróforo *SYBR Green* intercala-se a qualquer fita dupla de DNA que está sendo amplificada, não sendo específico, promovendo um aumento da fluorescência (NATH *et al.*, 2000). Para determinar se houve a 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.

Tabela 1. Primers e probes específicos para cDNA de *X. laevis*

Primer	Seqüência	Seletividade
Forward	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	18S
Backward	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	
Probe	5'-TexRd-TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC-BHQ_2-3'	
Forward	5'-TCAAACTTCCGCAAGGAGT-3'	Mel _{1c}
Backward	5'-ATCACCATTTTCGCACCATT-3'	
Forward	5'-AGGGCAGTGCTAATCCTTTCAGGT-3	Opn4m
Backward	5'-AATCCCAGGTGCAGGATGTCAGAA-3'	
Forward	5'-ATTATTGTCCTTGTCTGGATGTATTCA-3'	Opn4x
Backward	5'-AAGCCCTCTGGCACATAGGAA-3'	
Probe	5'-6-FAM/AATGTGGAGCTTGGCACCATTACTTGGC/BHQ_1/-3'	

Análise dos resultados

Para evitar possíveis erros intra-ensaio (HEID *et al.*, 1996, BUSTIN, 2002), utilizou-se como normalizador o RNA ribossômico 18S, com *primers* desenhados em região altamente conservada .

A análise dos dados foi feita pela comparação entre número de cópias dos poços controle e experimentais (tratados com hormônios), ou entre diferentes tempos, obtida entre as porções de crescimento geométrico das curvas, passando-se uma reta denominada limiar que cruza essas porções. Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (C_T), foi encontrado o ΔC_T que é a diferença entre os valores médios do gene de interesse e do RNA 18S. A seguir, foram subtraídos

os valores médios encontrados para os poços tratados da média dos poços controle, obtendo-se o $\Delta\Delta C_T$. Esse valor foi colocado como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), obtendo-se assim o número de vezes que o gene estava expresso após o tratamento em questão em relação ao controle. Os resultados foram transformados, estabelecendo-se como 100% a menor expressão do gene no grupo não tratado mantido em 12C:12E sem troca de meio (1º protocolo experimental) ou a menor expressão do gene no grupo não tratado mantido em escuro constante (2º protocolo experimental).

Os valores temporais foram analisados por ANOVA one-way, seguida de Tukey e a comparação entre valores temporais de células tratadas e não tratadas foi feita por teste *t* de Student.

Nos protocolos experimentais onde foi constatada variação na produção do RNAm entre os horários analisados por ANOVA ONE WAY, a análise rítmica também foi aplicada. Para determinar a probabilidade de a variação temporal ser o resultado de um componente circadiano, os dados foram analisados pelo *software* COSANA (BENEDITO-SILVA, 2003), modificação do método COSINOR, que utiliza uma estimativa não linear dos mínimos quadrados (NELSON *et al.*, 1979). Antes do ajuste, todos os dados foram normalizados. Para determinar a significância de cada curva ajustada para cada gene em cada experimento, um teste de razão de proximidade foi utilizado como comparação para uma hipótese de amplitude 0 (uma reta). O ajuste periódico foi considerado significativo quando o teste de proximidade *p* foi menor que 0,05.

RESULTADOS

Quantificação dos níveis de RNAm para receptor de melatonina *Mel_{1c}*

12C:12E sem troca de meio

Nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) sem troca de meio, observou-se uma tendência em aumentar os níveis de RNAm para o receptor de melatonina (*Mel_{1c}*) durante o período de escuro, com uma maior expressão no ZT20.

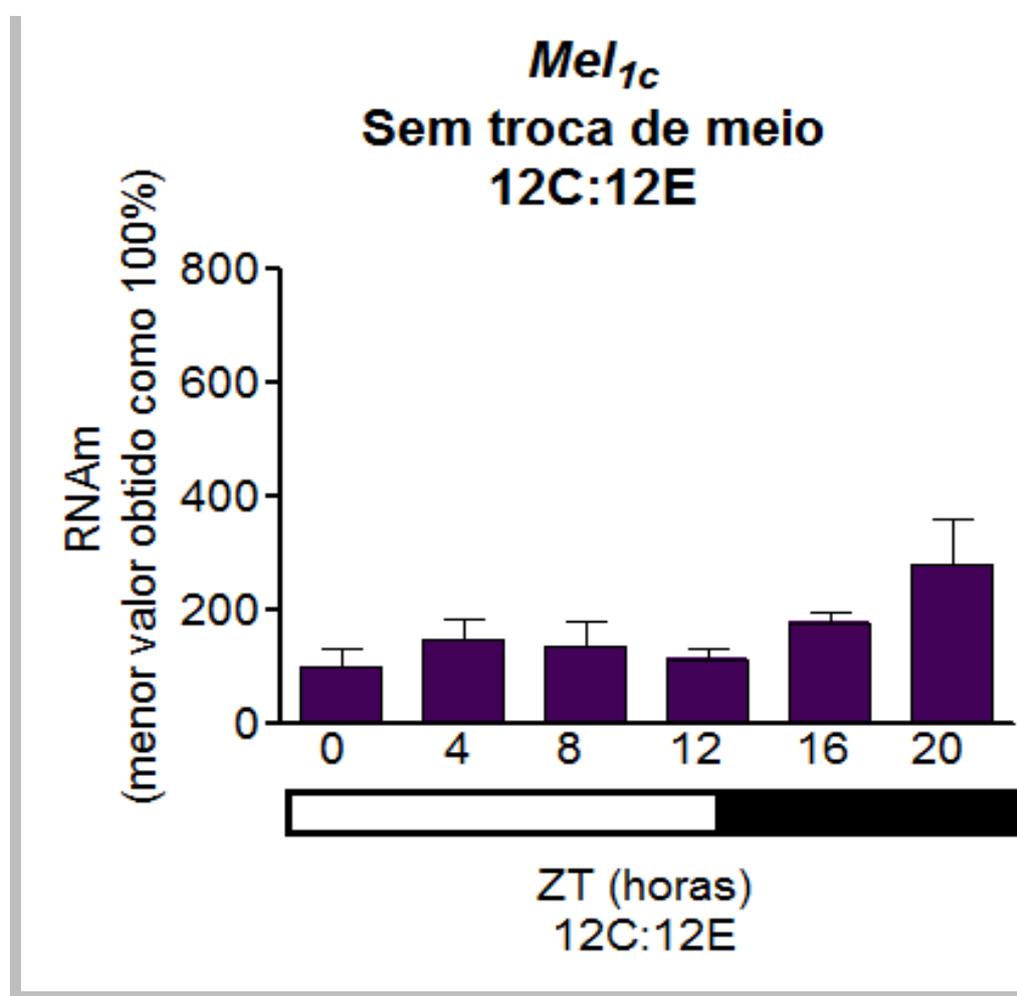


Fig. 4. PCR quantitativo para receptor de melatonina. As células permaneceram em regime de 12C:12E por 5 dias antes do início da extração do RNA total, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média \pm SEM (n=3-4).

Escuro constante com troca de meio, na ausência e na presença de melatonina

Quando as células foram mantidas em escuro constante com troca de meio às 6h e às 12h, observou-se uma tendência em aumentar os níveis de RNAm para o receptor de melatonina (*Mel_{1c}*) às 14h e às 2h, mas essas respostas não foram estatisticamente significantes.

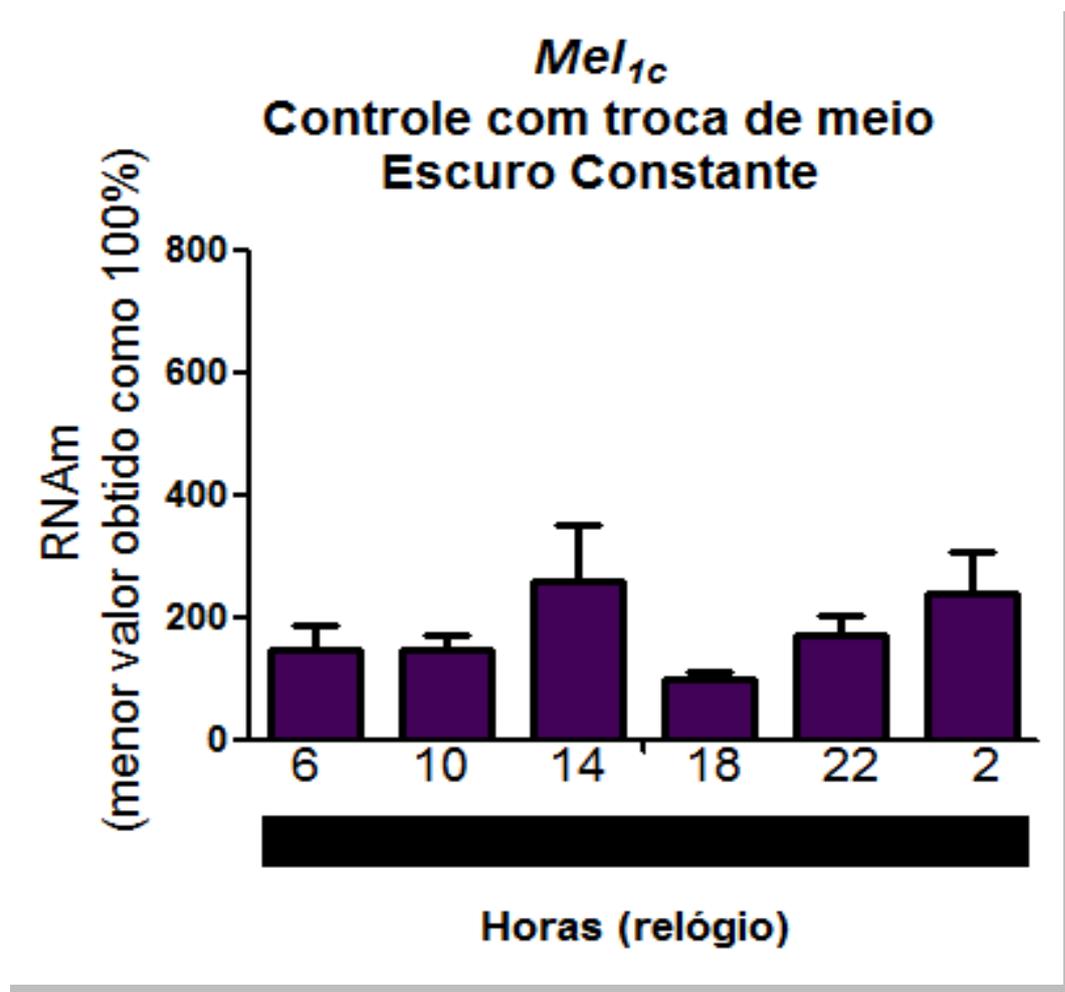


Fig. 5. PCR quantitativo para receptor de melatonina. As células foram submetidas a duas trocas de meio e permaneceram em escuro constante por 6 dias antes da extração do RNA total. Valores são a média \pm SEM (n=3-4).

Nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao escuro constante e tratados com melatonina 10^{-9} M por 6h entre 6 horas da manhã e 12 horas, observou-se um aumento significativo dos níveis de RNAm para o receptor de melatonina (Mel_{1C}) às 14h em relação às 6h. É possível notar um aumento de expressão às 2h, mas essa resposta não foi estatisticamente significativa. Apesar dessas diferenças, a análise por COSANA não indicou ritmicidade.

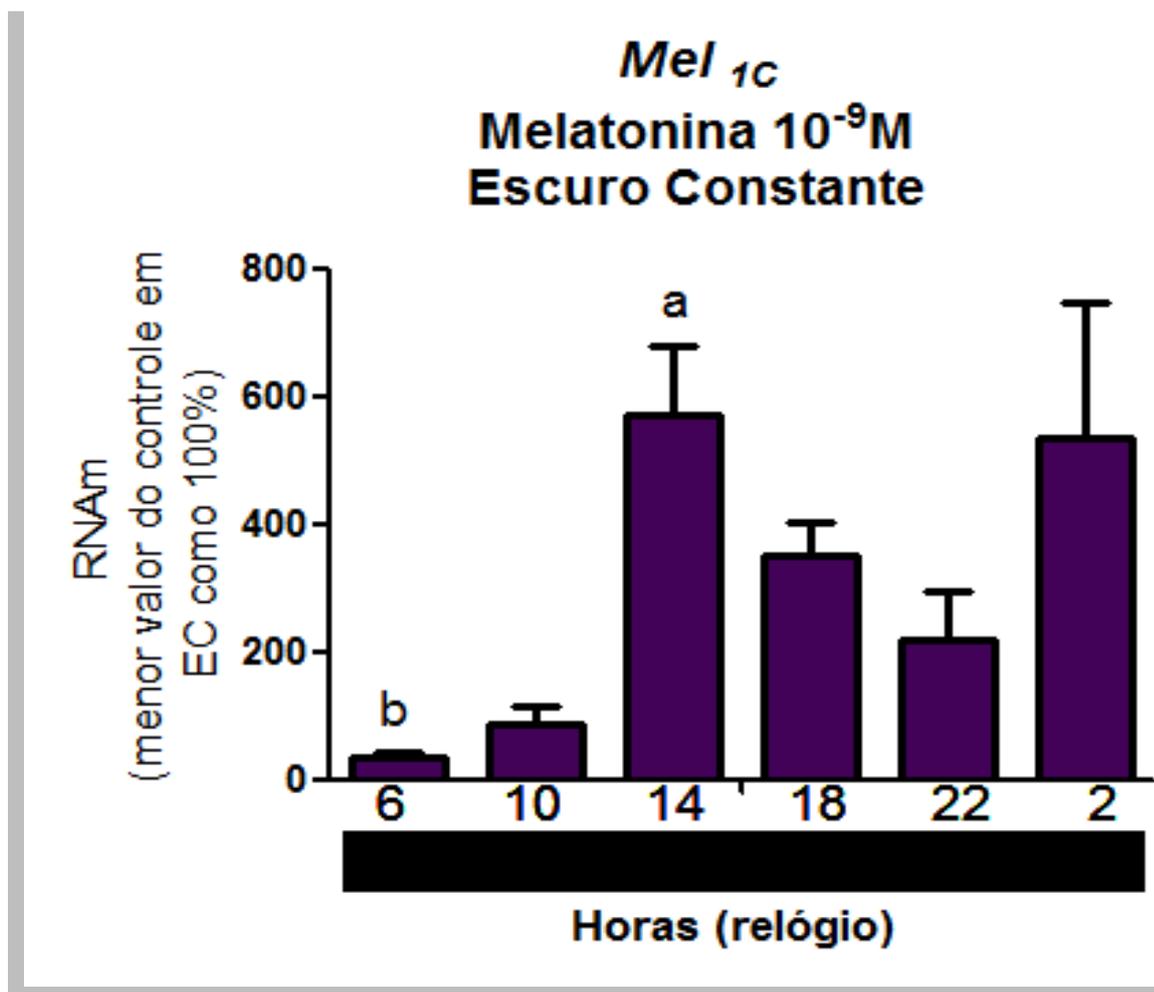


Fig. 6. PCR quantitativo para receptor de melatonina em melanóforos tratados com melatonina (10^{-9} M) por 6h. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-4). (a) e (b) significativamente diferentes $p < 0,05$.

Os dados demonstram que, nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao escuro constante e tratados com melatonina 10^{-9} M por 6h, houve uma diminuição dos níveis de RNAm para o receptor de melatonina (Mel_{1C}) às 6h e um aumento às 18h, em relação aos respectivos controles. É possível notar um aumento de expressão às 14h, 22h e 2h em relação aos seus controles, mas essas respostas não foram estatisticamente significantes.

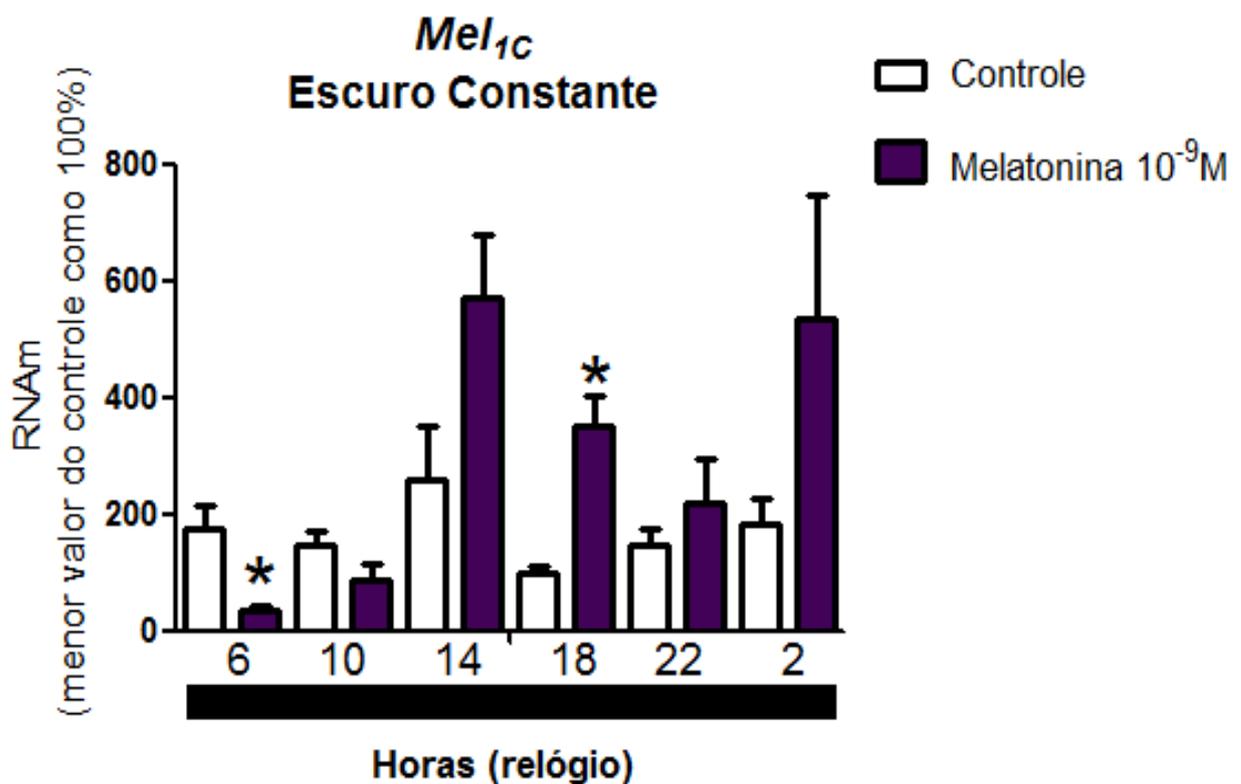


Fig. 7. PCR quantitativo para receptor de melatonina em melanóforos tratados ou não com melatonina. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-4). (*) significativamente diferente do controle $p < 0,05$.

12C:12E com troca de meio durante a fase clara, na ausência e na presença de melatonina

Nas células submetidas ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) com troca de meio durante a fase clara, observou-se uma tendência em aumentar os níveis de RNAm para o receptor de melatonina (Mel_{1c}) no ZT4, porém, esse aumento não foi estatisticamente significativo.

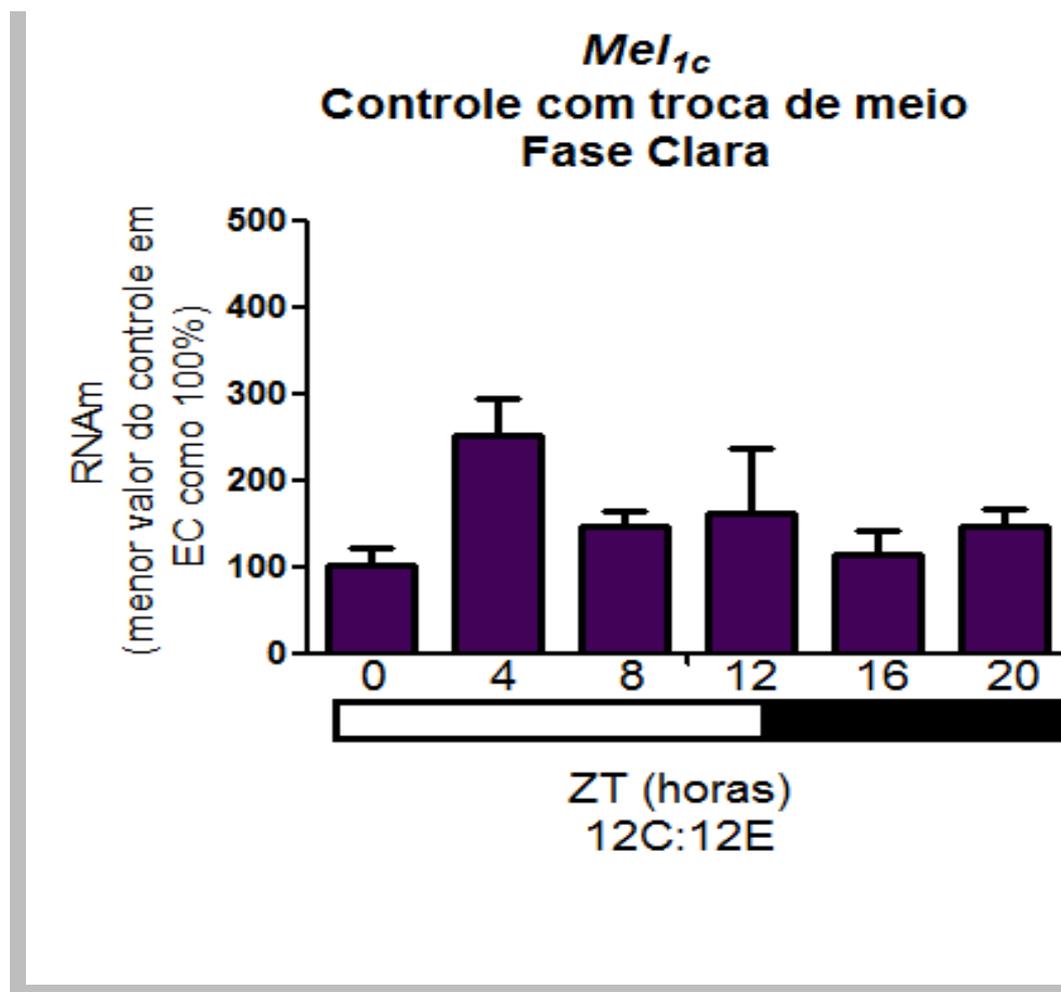


Fig. 8. PCR quantitativo para receptor de melatonina. As células foram submetidas a duas trocas de meio e permaneceram em regime de 12C:12E por 6 dias antes da extração do RNA total. Valores são a média \pm SEM (n=3-4).

Quando os melanóforos de *Xenopus laevis* foram submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) e tratados com melatonina durante a fase clara, observou-se um aumento dos níveis de RNAm para o receptor de melatonina (*Mel_{1C}*) no ZT16 em relação a ZT0, ZT4, ZT8 e ZT20. Apesar dessas diferenças, a análise por COSANA não indicou ritmicidade.

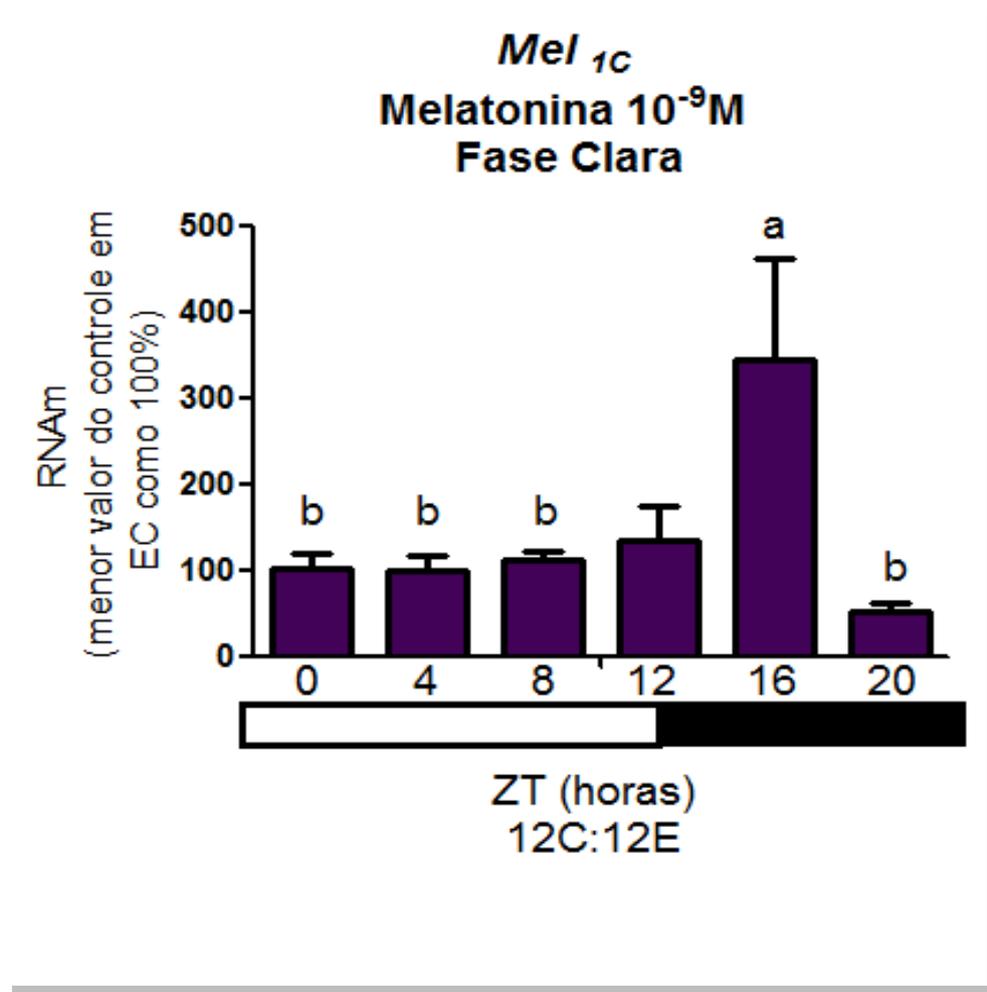


Fig. 9. PCR quantitativo para receptor de melatonina em melanóforos tratados com melatonina (10⁻⁹M) por 6h. As células permaneceram em regime de 12C:12E por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média ± SEM (n=3-4). (a) e (b) significativamente diferentes p<0,05.

Os dados demonstram que nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) e tratados com melatonina, ocorreu uma queda dos níveis de RNAm em ZT4 e ZT20, em relação aos respectivos controles.

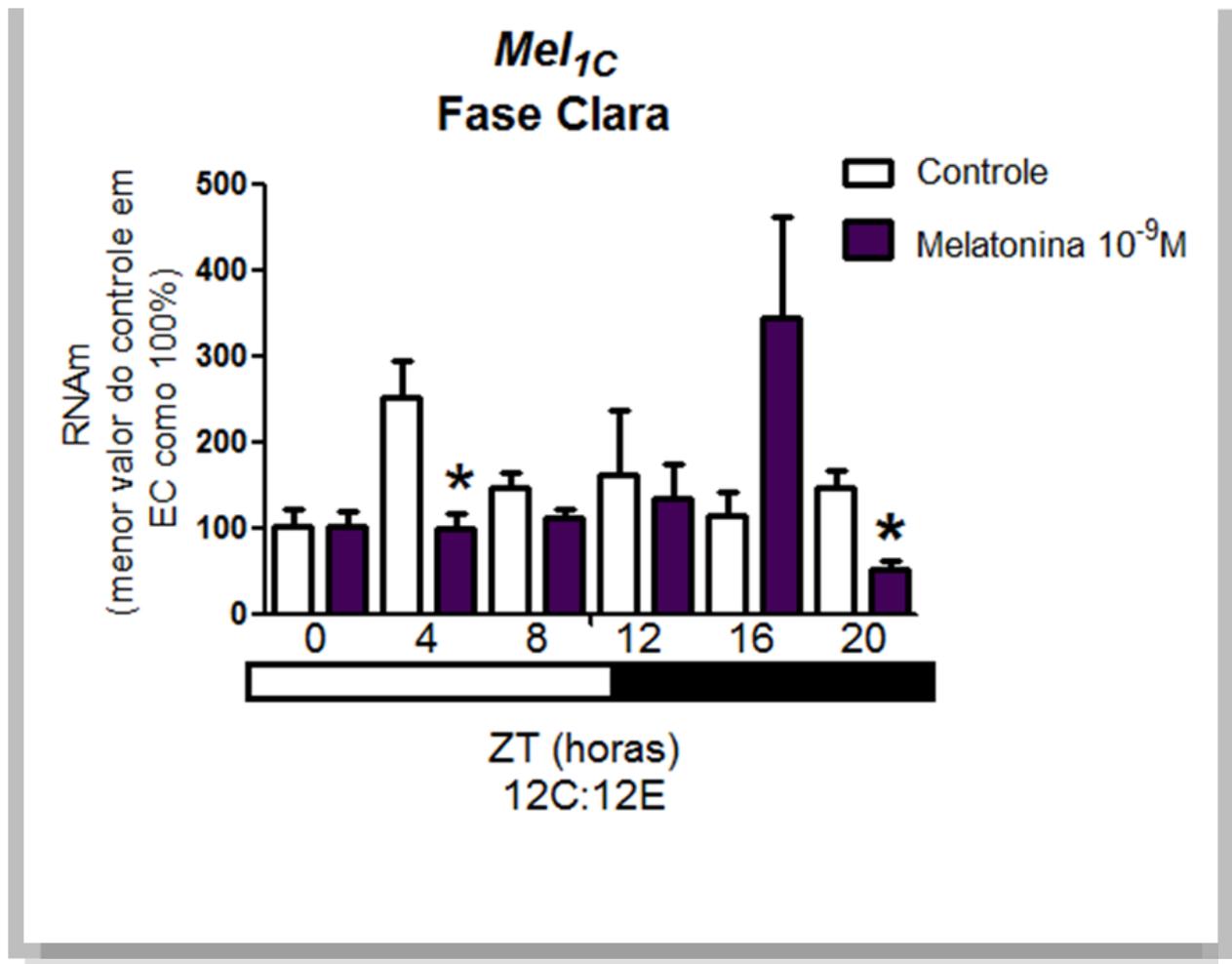


Fig. 10. PCR quantitativo para receptor de melatonina em melanóforos tratados ou não com melatonina. As células permaneceram em regime 12C:12E por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média ± SEM (n=3-4).

12C:12E com troca de meio durante a fase escura, na ausência e na presença de melatonina

Nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) com troca de meio durante a fase escura, observou-se um aumento nos níveis de RNAm para o receptor de melatonina (Mel_{1C}) no ZT8 em relação a ZT0, ZT4 e ZT16, e no ZT20 em relação a ZT4. Apesar dessas diferenças, a análise por COSANA não indicou ritmicidade.

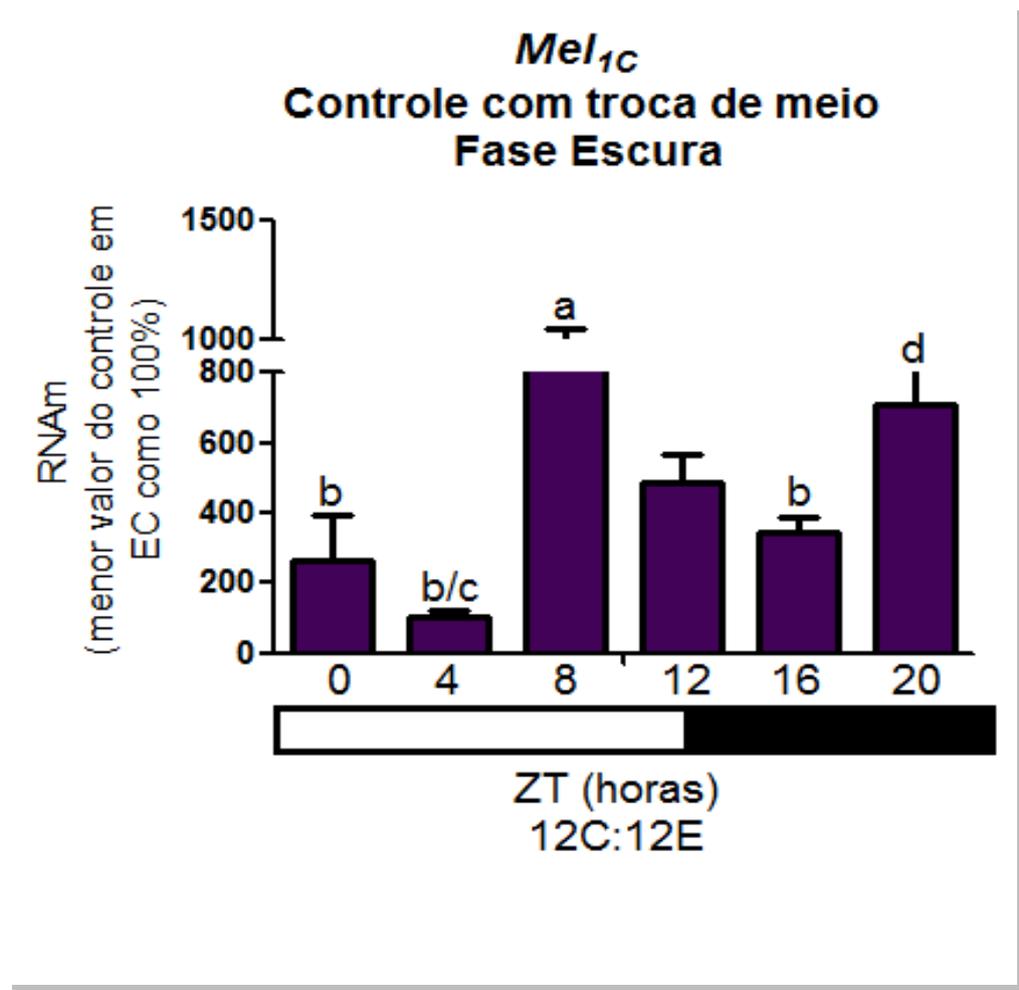


Fig. 11. PCR quantitativo para receptor de melatonina. As células foram submetidas a duas trocas de meio e permaneceram em regime de 12C:12E por 6 dias antes da extração do RNA total. Valores são a média \pm SEM (n=3-4). (a) e (b); (c) e (d) significativamente diferentes $p < 0,05$.

Nas células submetidas ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) tratadas com melatonina durante a fase escura, observou-se um aumento dos níveis de RNAm para o receptor de melatonina (Mel_{1C}) no ZT8 em relação a ZT0 e ZT20. Apesar dessas diferenças, a análise por COSANA não indicou ritmicidade.

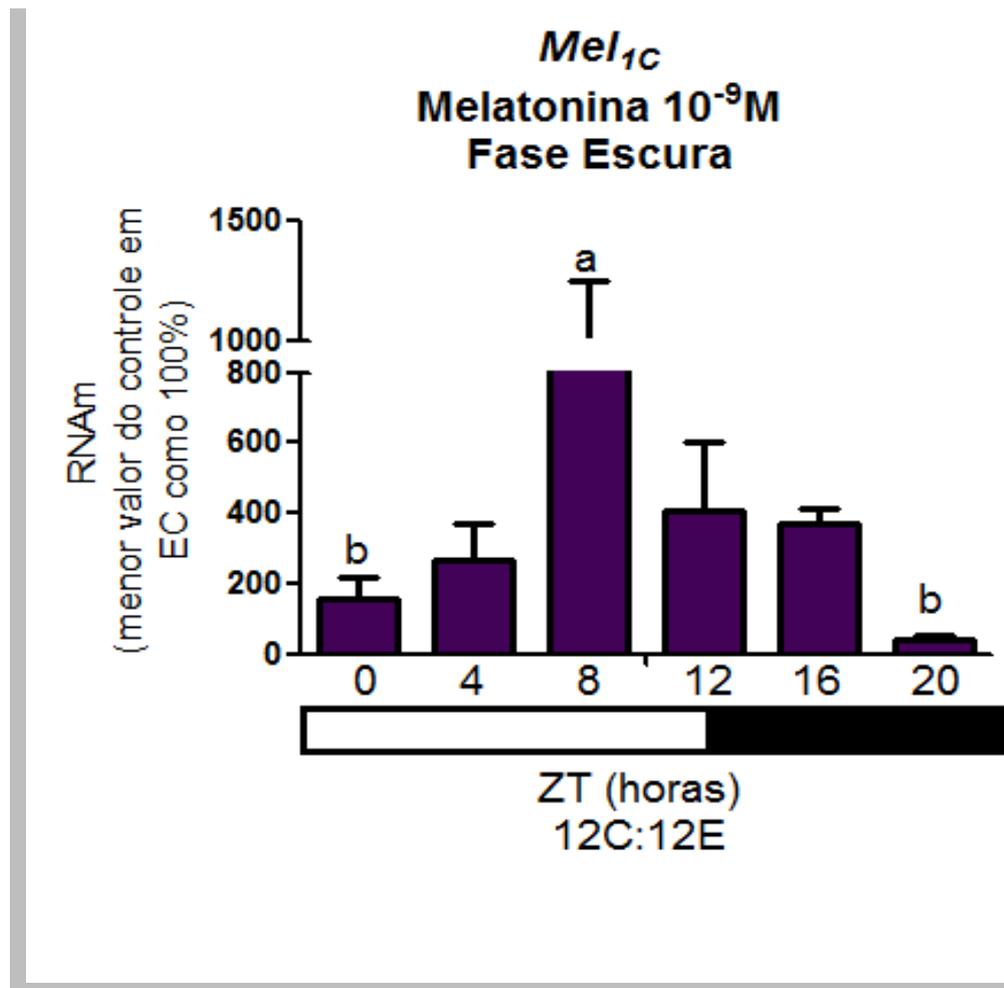


Fig. 12. PCR quantitativo para receptor de melatonina em melanóforos tratados com melatonina (10^{-9} M) por 6h. As células permaneceram em regime de 12C:12E por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-4). (a) e (b) significativamente diferentes $p < 0,05$.

Os dados demonstram que, nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) tratados com melatonina durante a fase escura, observou-se uma diminuição dos níveis de RNAm para o receptor de melatonina (Mel_{1C}) no ZT20 em relação ao seu controle.

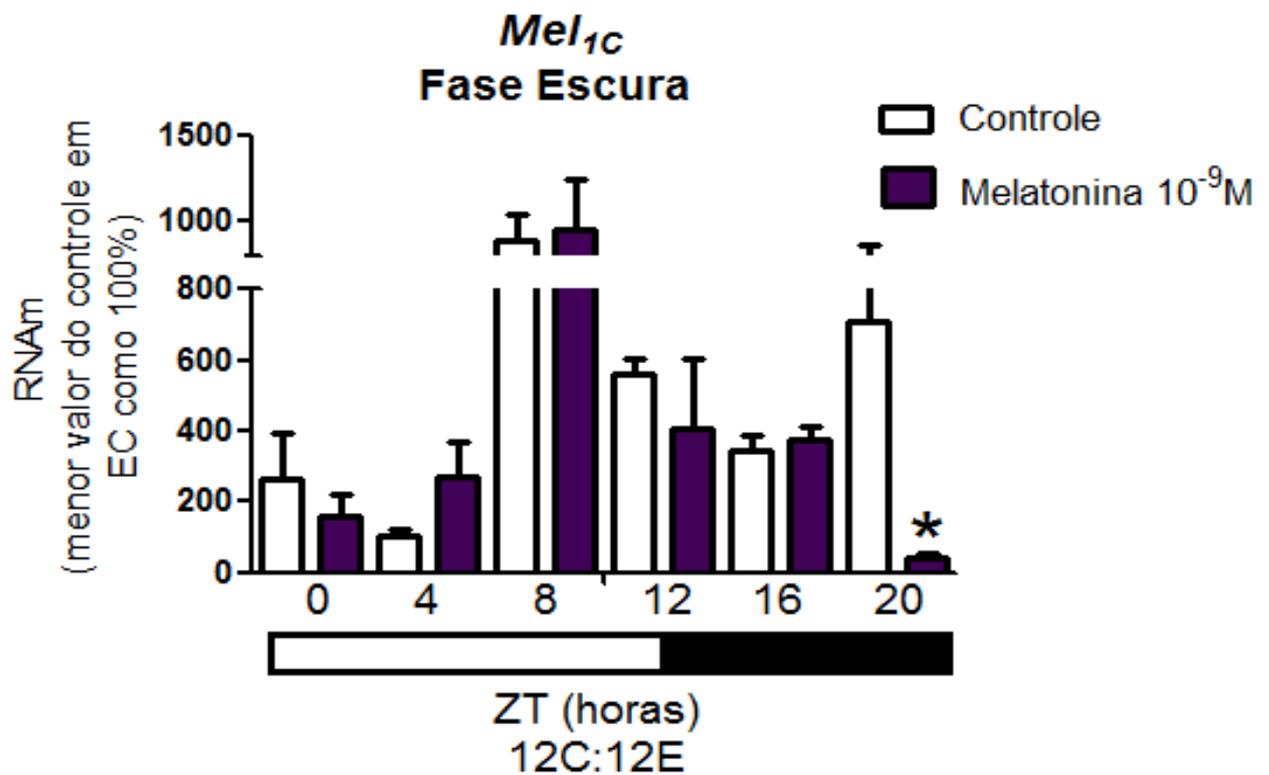


Fig. 13. PCR quantitativo para receptor de melatonina em melanóforos tratados ou não com melatonina. As células permaneceram em regime 12C:12E por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento, Valores são a média \pm SEM (n=3-4). (*) significativamente diferente do controle $p < 0,05$.

Quantificação dos níveis de RNAm para melanopsina homóloga de mamíferos (*Opn4m*)

12C:12E sem troca de meio

Nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) sem troca de meio, observou-se um aumento nos níveis de RNAm para melanopsina homóloga de mamíferos (*Opn4m*) durante o período de escuro, com uma maior expressão no ZT16 em relação ao ZT0. Apesar dessa diferença, a análise por COSANA não indicou ritmicidade.

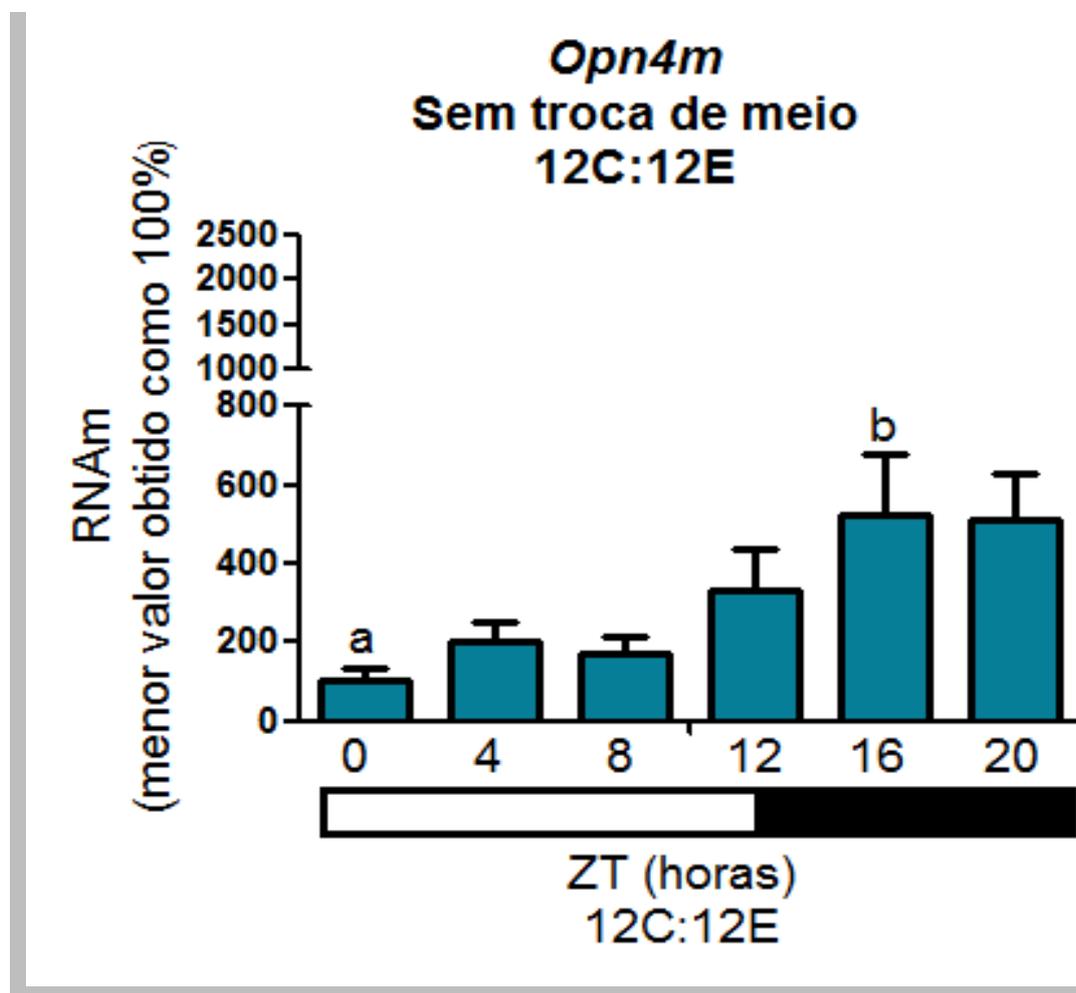


Fig. 14. PCR quantitativo para melanopsina homóloga de mamíferos. As células permaneceram em regime de 12C:12E por 5 dias antes do início da extração do RNA total, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (a) e (b) significativamente diferentes $p < 0,05$.

Escuro constante com troca de meio, na ausência e na presença de melatonina.

Nas células submetidas ao escuro constante com troca de meio às 6h e às 12h, observou-se um aumento nos níveis de RNAm para a melanopsina homóloga de mamíferos (*Opn4m*) às 14h em relação aos demais horários analisados. Apesar dessas diferenças, a análise por COSANA não indicou ritmicidade.

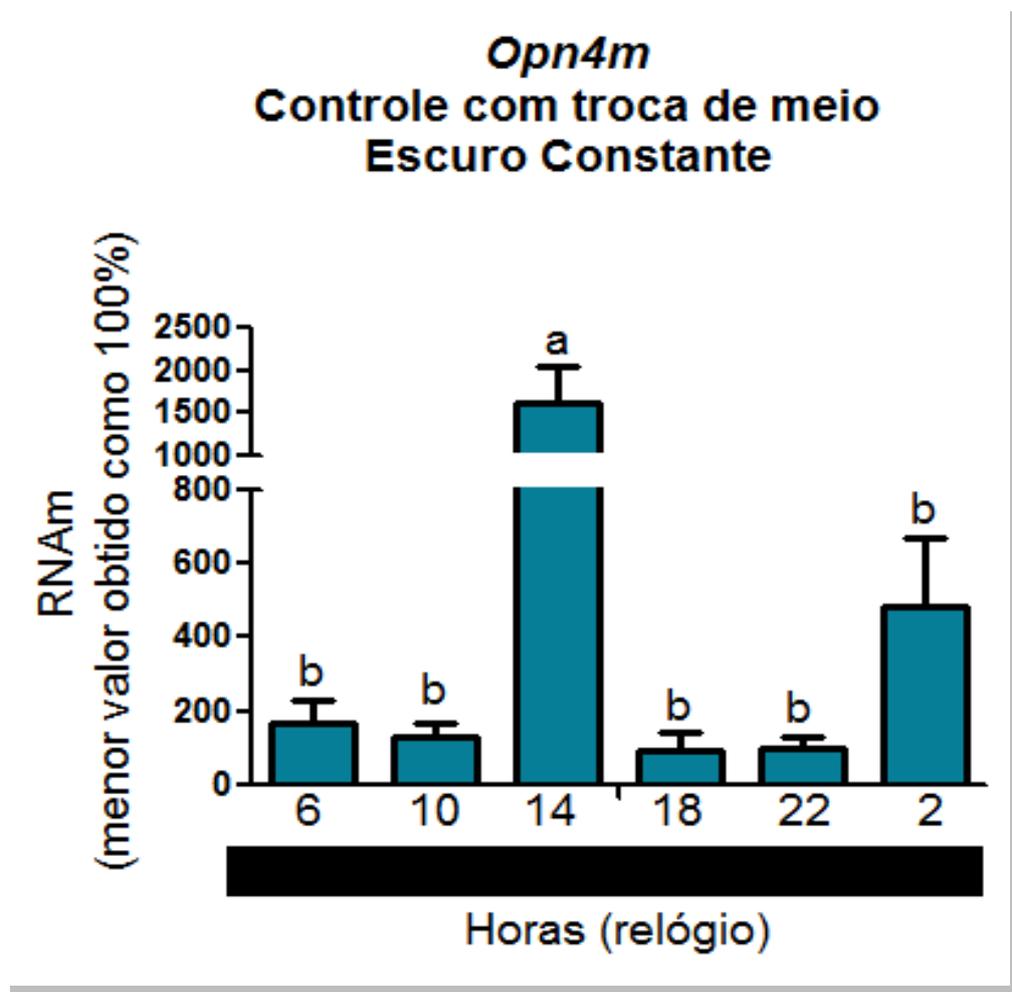


Fig. 15. PCR quantitativo para melanopsina homóloga de mamíferos. As células foram submetidas a duas trocas de meio e permaneceram em escuro constante por 6 dias antes da extração do RNA total. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (a) e (b) significativamente diferentes $p < 0,05$.

Nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao escuro constante e tratados com melatonina, observou-se um aumento dos níveis de RNAm para a melanopsina homóloga de mamíferos (*Opn4m*) às 14h em relação às 22h. Apesar dessa diferença, a análise por COSANA não indicou ritmicidade.

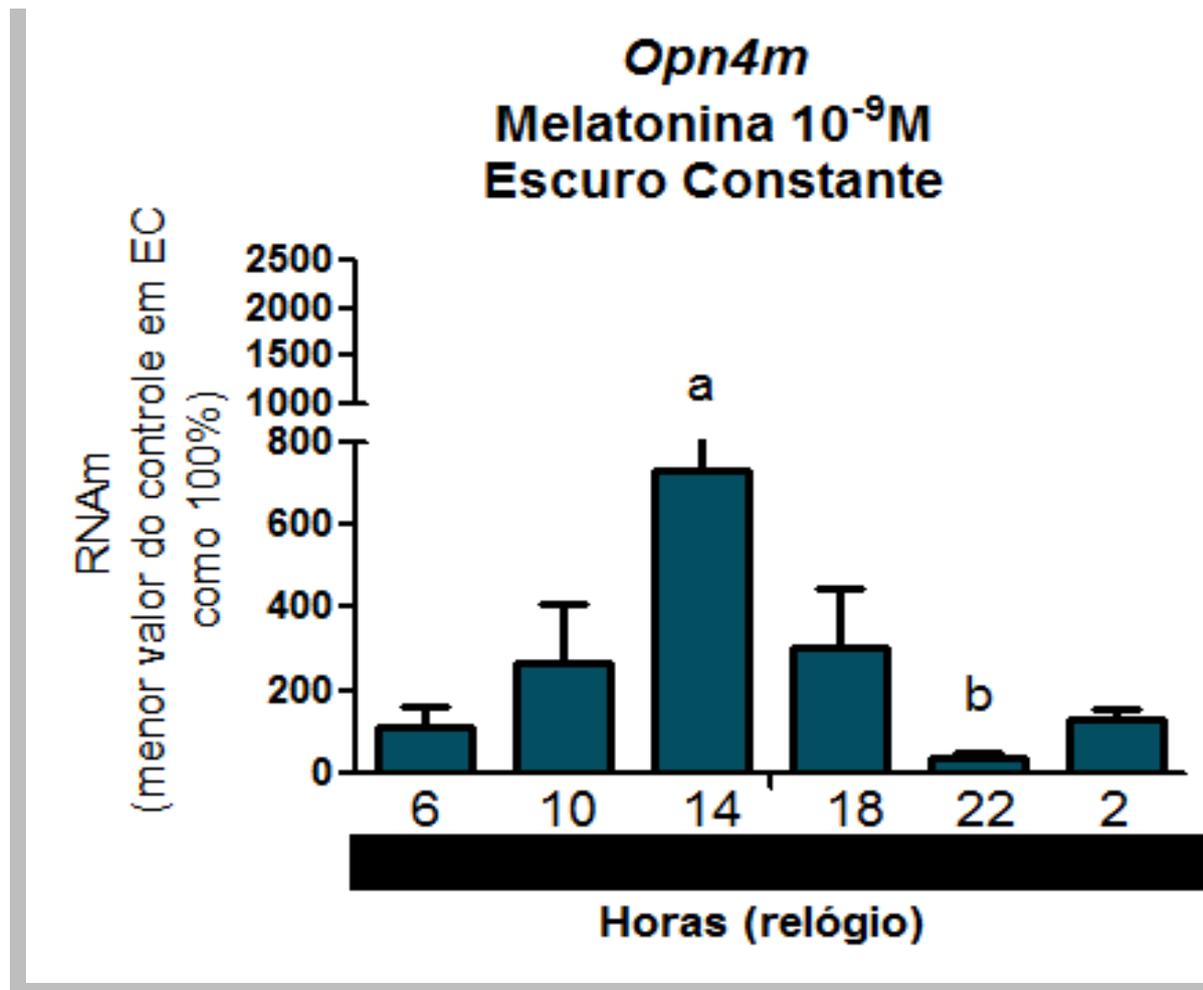


Fig. 16. PCR quantitativo para melanopsina homóloga de mamíferos em melanóforos tratados com melatonina (10^{-9} M) por 6h. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (a) e (b) significativamente diferentes $p < 0,05$.

De acordo com os dados obtidos, nas células submetidas ao escuro constante e tratadas com melatonina 10^{-9} M por 6h, não houve variação significativa dos níveis de RNAm da melanopsina homóloga de mamíferos (*Opn4m*) em relação aos seus controles.

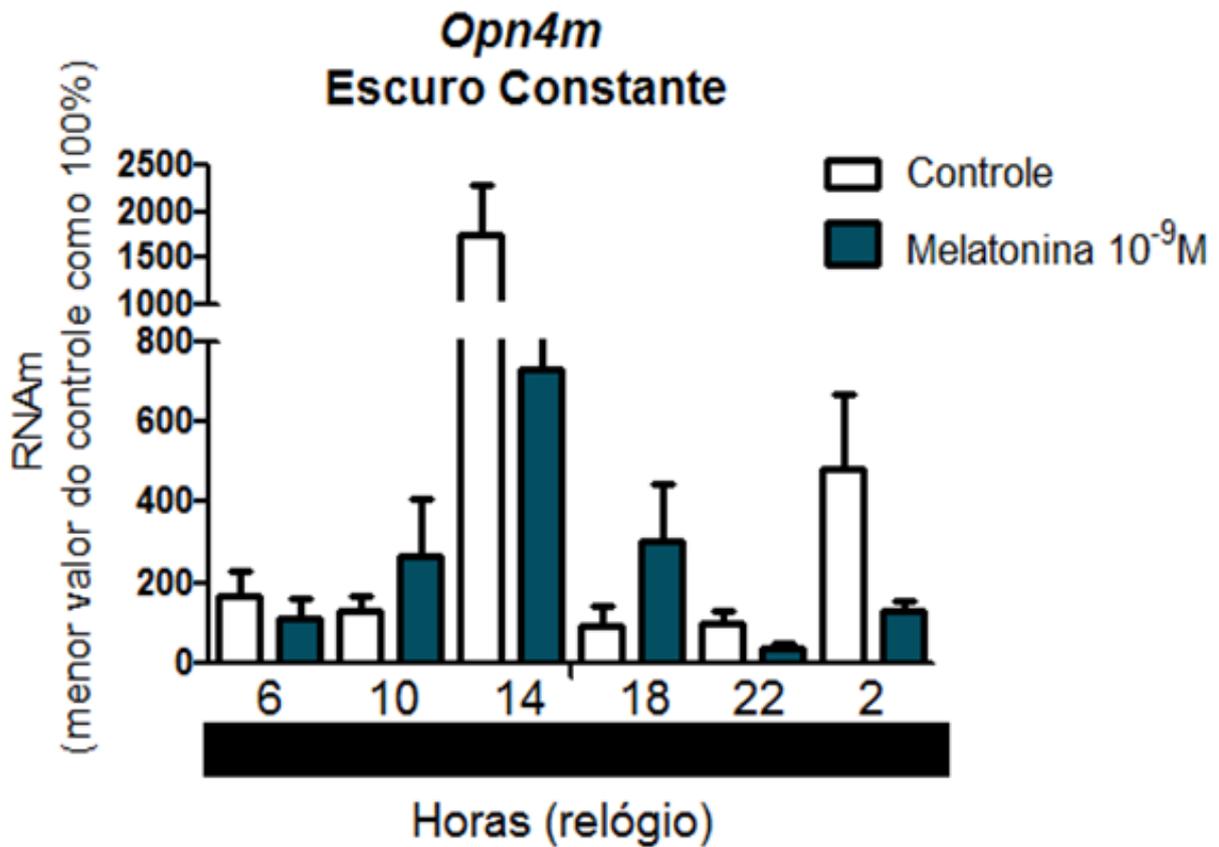


Fig. 17. PCR quantitativo para melanopsina homóloga de mamíferos em melanóforos tratados ou não com melatonina. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (*) significativamente diferente do respectivo controle $p < 0,05$.

12C:12E com troca de meio durante a fase clara, na ausência e na presença de melatonina

Nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) com troca de meio durante a fase clara, observou-se um aumento nos níveis de RNAm para a melanopsina homóloga de mamíferos (*Opn4m*) no ZT4 em relação ao ZT12.

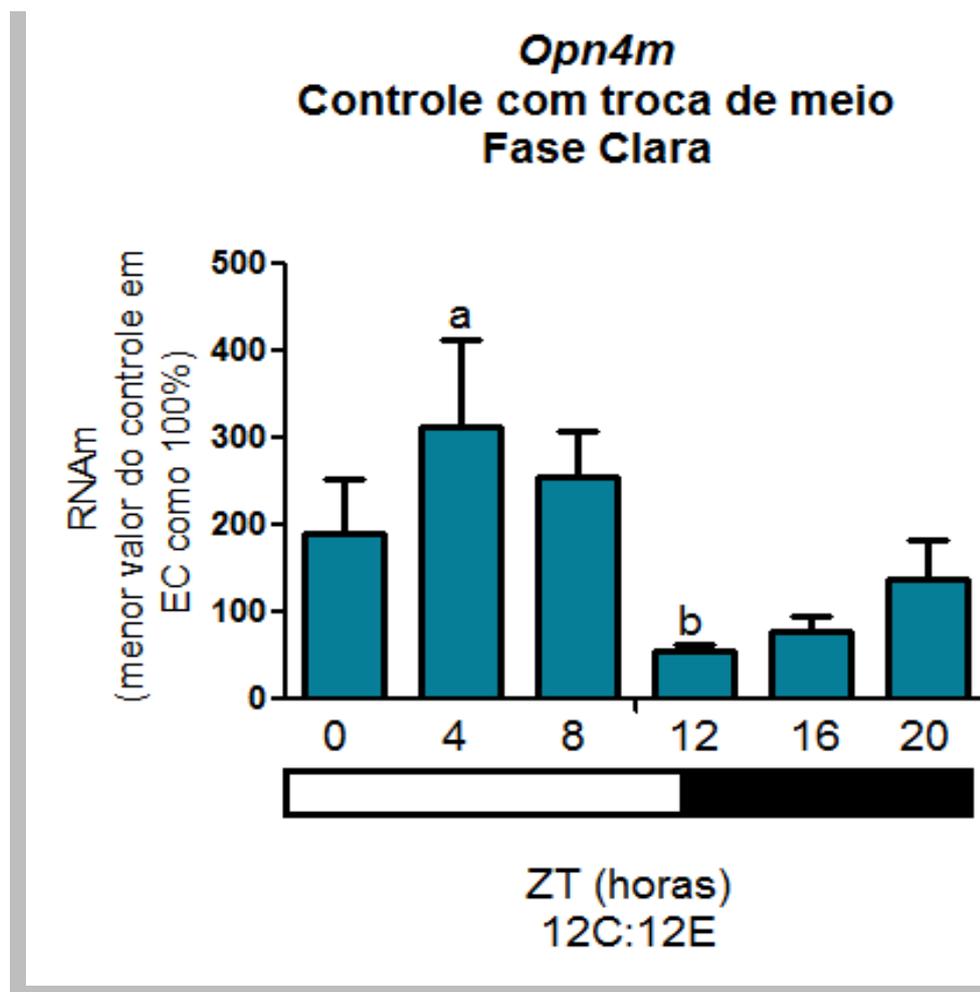


Fig. 18. PCR quantitativo para melanopsina homóloga de mamíferos. As células foram submetidas a duas trocas de meio e permaneceram em regime 12C:12E por 6 dias antes da extração do RNA total. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (a) e (b) significativamente diferentes $p < 0,05$.

Análise por COSANA indicou um padrão rítmico com $p=0,013$. Os dados indicam que a troca de meio associada ao fotoperíodo (12C:12E, com troca de meio durante a fase clara) foi capaz de sincronizar a expressão da melanopsina *Opn4m*, indicando a presença de um padrão de expressão ultradiano, com período de 16 horas.

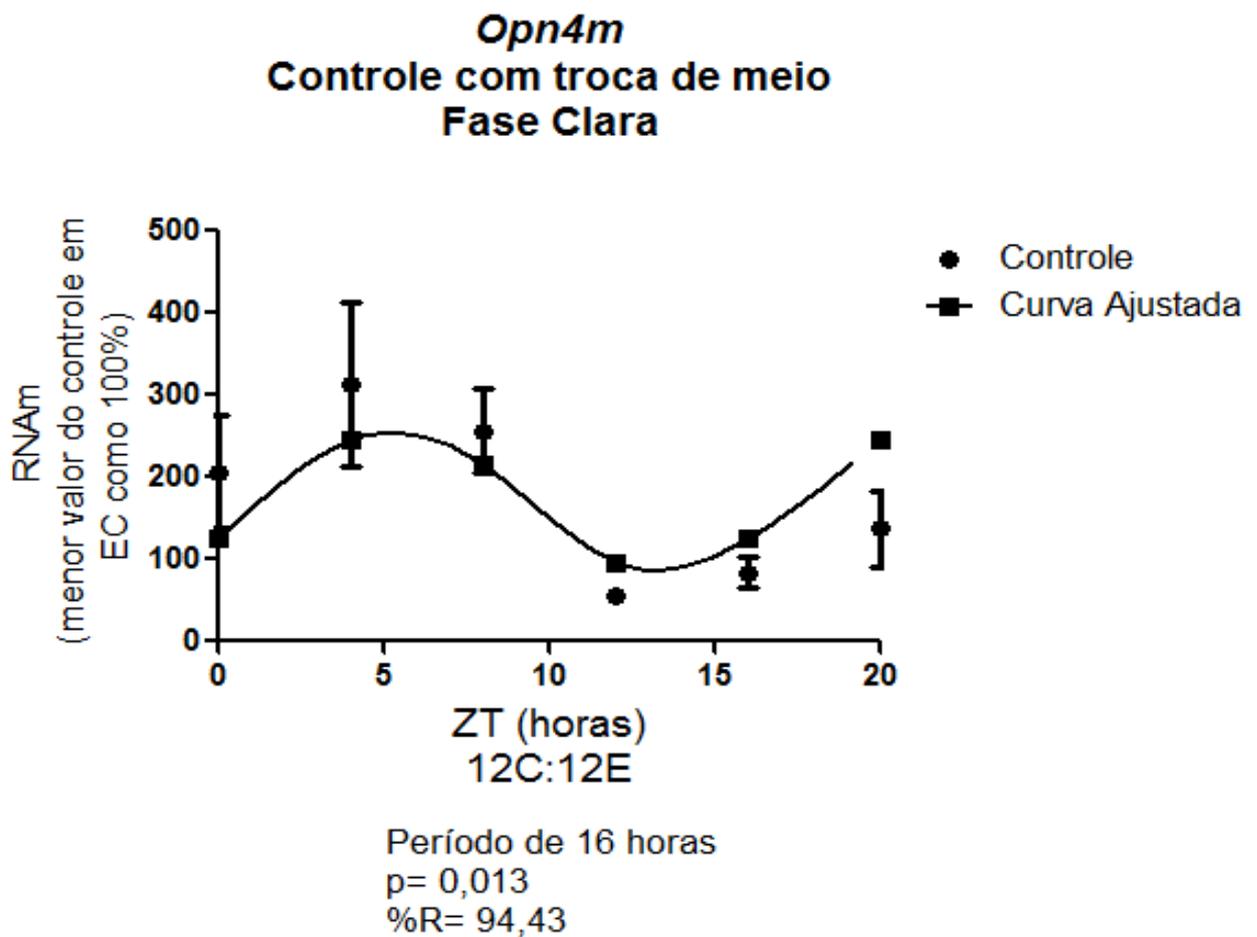


Fig. 19. Ajuste por COSANA do PCR quantitativo para melanopsina homóloga de mamíferos. As células foram submetidas a duas trocas de meio e permaneceram em regime 12C:12E por 6 dias antes da extração do RNA total.

Nas células submetidas ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) tratadas com melatonina por 6h durante a fase clara, observou-se uma constância nos níveis de RNAm para a melanopsina homóloga de mamíferos (*Opn4m*), indicando que o hormônio aboliu a ritmicidade observada nos controles.

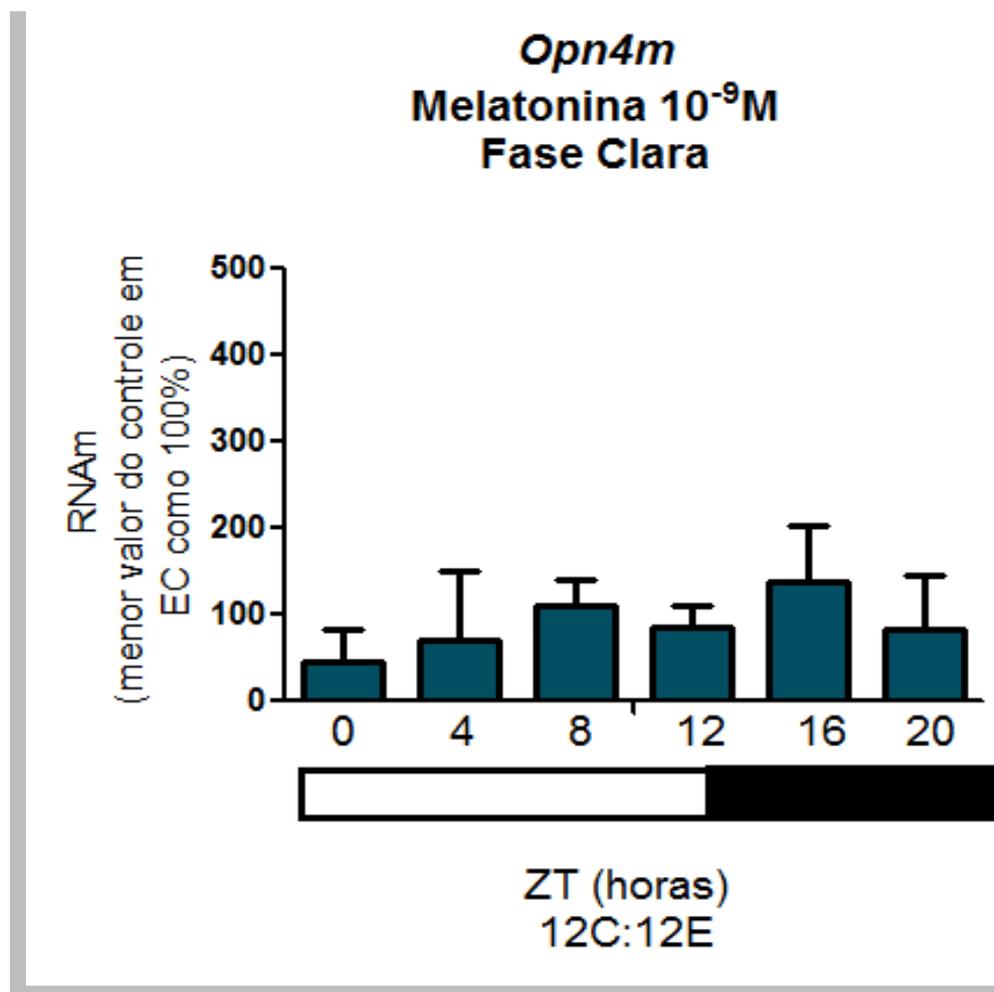


Fig. 20. PCR quantitativo para melanopsina homóloga de mamíferos em melanóforos tratados com melatonina (10^{-9} M) por 6h. As células permaneceram em regime 12C:12E por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-12).

Os dados obtidos demonstram que nas células submetidas ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) tratadas com melatonina por 6h, se observou uma queda dos níveis de RNAm durante a fase clara em todos os Zás analisados, com subsequente pequeno aumento no ZT12 (transição de claro para escuro), embora não significativos estatisticamente.

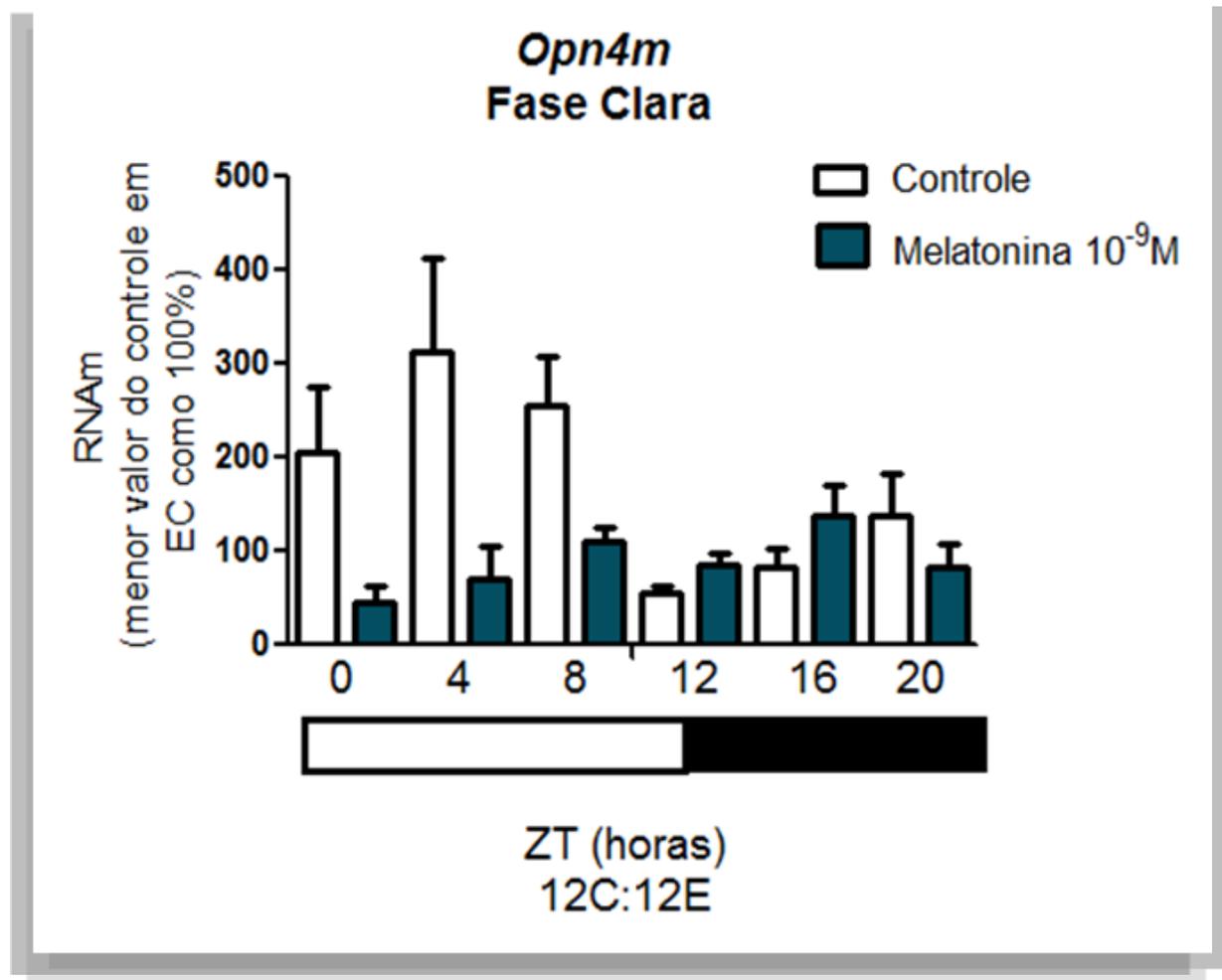


Fig. 21. PCR quantitativo para melanopsina homóloga de mamíferos em melanóforos tratados ou não com melatonina. As células permaneceram em regime 12C:12E por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (*) significativamente diferente do respectivo controle $p < 0,05$.

12C:12E com troca de meio durante a fase escura, na ausência e na presença de melatonina

Nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) com troca de meio durante a fase escura, observou-se um aumento nos níveis de RNAm para a melanopsina homóloga de mamíferos (*Opn4m*) no ZT8 em relação a ZT0, ZT4, ZT12 e ZT16. Apesar dessas diferenças, a análise por COSANA não indicou ritmicidade.

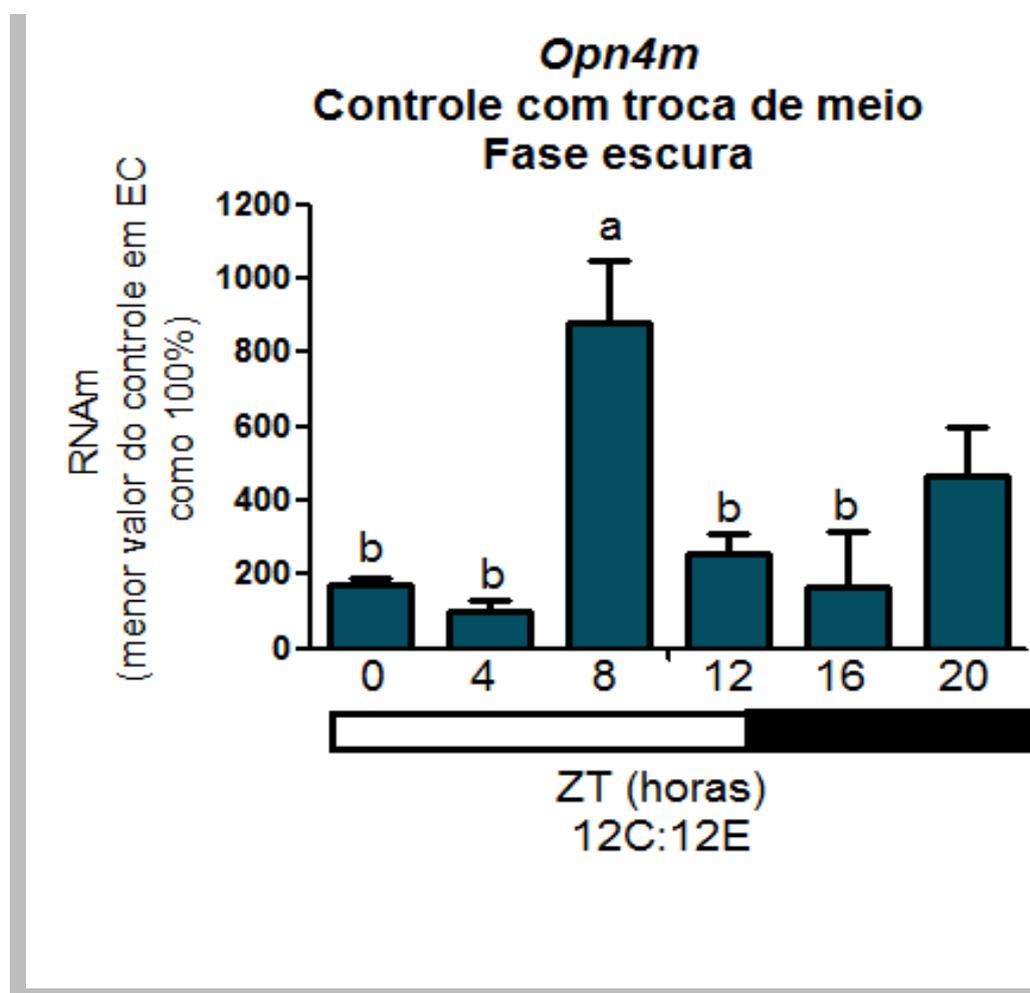


Fig. 22. PCR quantitativo para melanopsina homóloga de mamíferos. As células foram submetidas a duas trocas de meio e permaneceram em regime 12C:12E por 6 dias antes da extração do RNA total. Valores são a média \pm SEM ($n=3-12$). (a) e (b) significativamente diferentes $p<0,05$.

Quando as células foram mantidas no ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) e tratadas com melatonina por 6h durante a fase escura, foi mantido o aumento dos níveis de RNAm para a melanopsina homóloga de mamíferos (*Opn4m*) no ZT8 em relação a ZT0, já observado nas células não tratadas. A análise por COSANA não indicou ritmicidade.

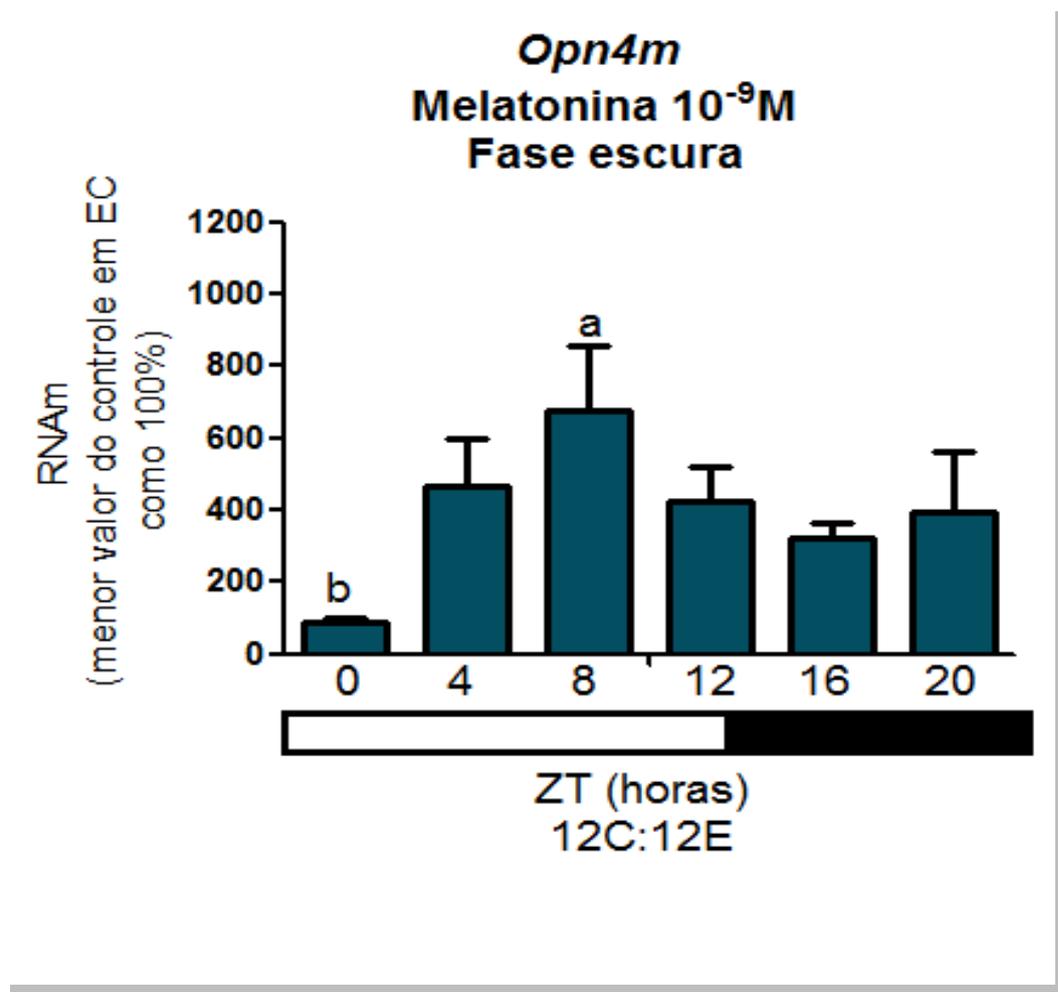


Fig. 23. PCR quantitativo para melanopsina homóloga de mamíferos em melanóforos tratados com melatonina (10^{-9} M) por 6h. As células permaneceram em regime 12C:12E por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (a) e (b) significativamente diferentes $p < 0,05$.

Os dados obtidos demonstram que nos melanóforos submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) tratados com melatonina por 6h durante a fase escura, não se observou diferença entre os níveis de RNAm para a melanopsina homóloga de mamíferos (*Opn4m*) em relação aos controles sem hormônio, exceto no ZT0.

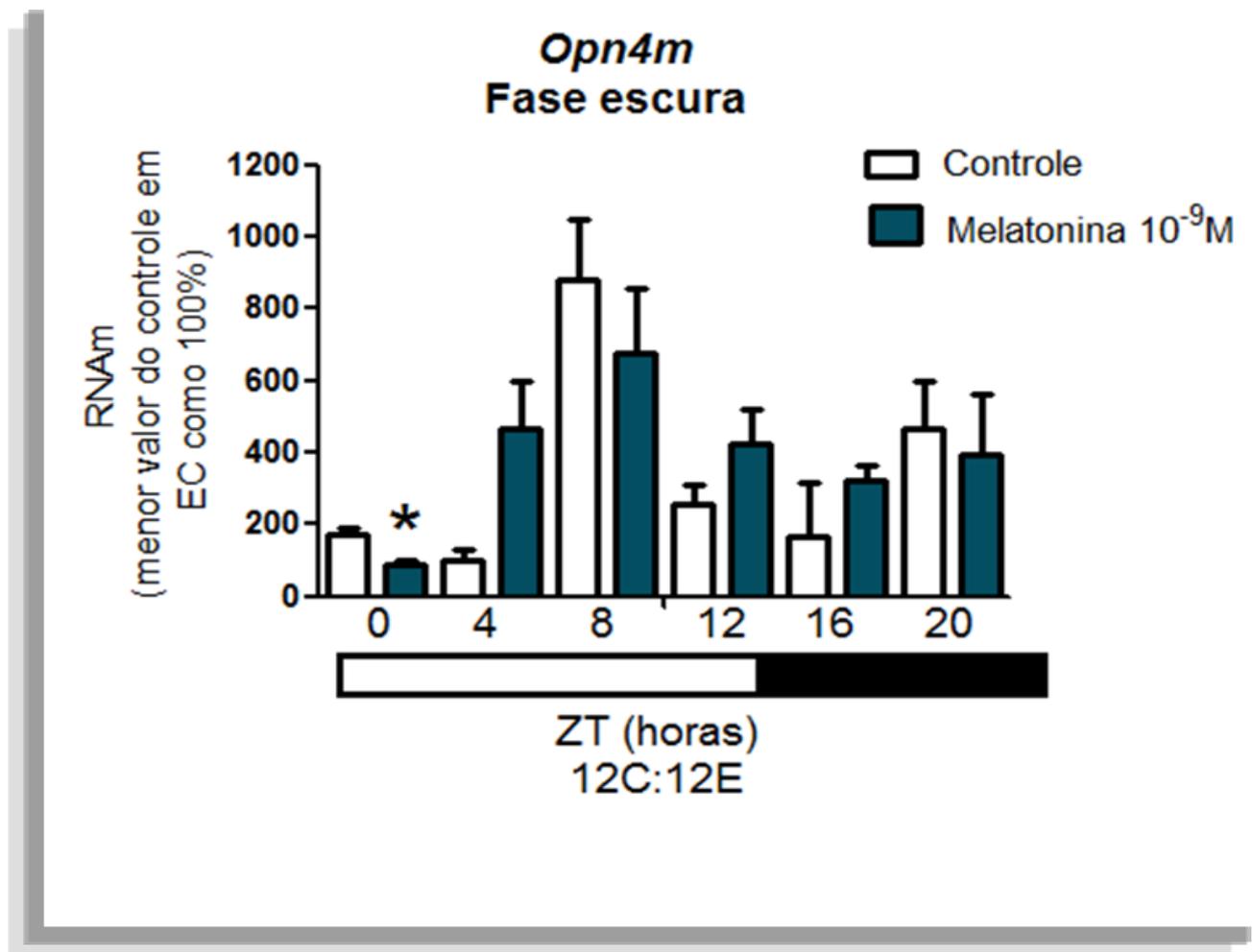


Fig. 24. PCR quantitativo para melanopsina homóloga de mamíferos em melanóforos tratados ou não com melatonina. As células permaneceram em regime 12C:12E por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média ± SEM (n=3-12).

Quantificação dos níveis de RNAm da melanopsina ortóloga de *Xenopus laevis* (*Opn4x*)

12C:12E sem troca de meio

Nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) sem troca de meio, observou-se um aumento nos níveis de RNAm para melanopsina ortóloga de *Xenopus* (*Opn4x*) durante o ZT0 em relação ao ZT20.

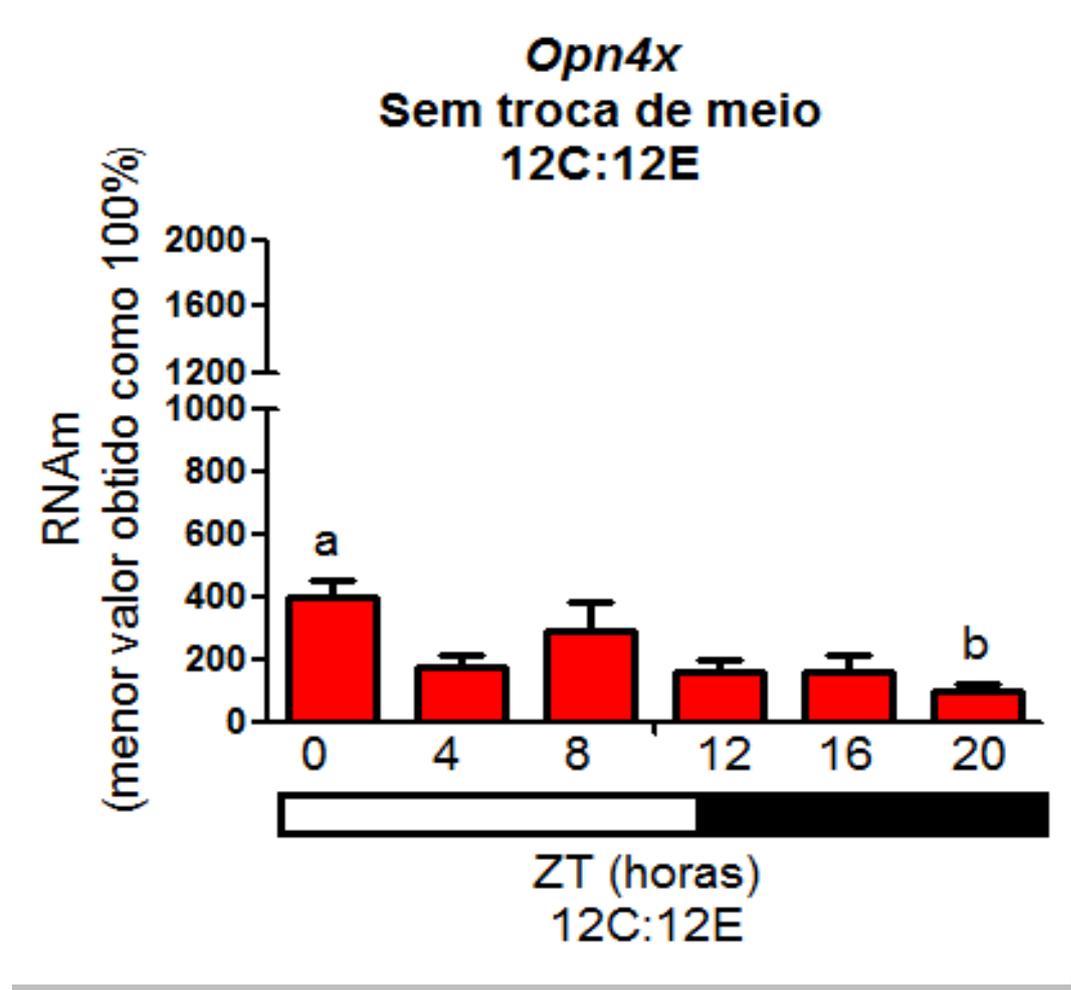


Fig. 25. PCR quantitativo para melanopsina ortóloga de *Xenopus*. As células permaneceram em regime de 12C:12E por 6 dias antes do início da extração do RNA total, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (a) e (b) significativamente diferentes $p < 0,05$.

Escuro constante com troca de meio, na ausência e na presença de melatonina.

Quando as células foram mantidas em escuro constante com troca de meio às 6h e às 12h, observou-se um aumento nos níveis de RNAm para a melanopsina de *Xenopus* (*Opn4x*) às 14h em relação aos demais horários analisados. Apesar dessas diferenças marcantes, a análise por COSANA não indicou ritmicidade.

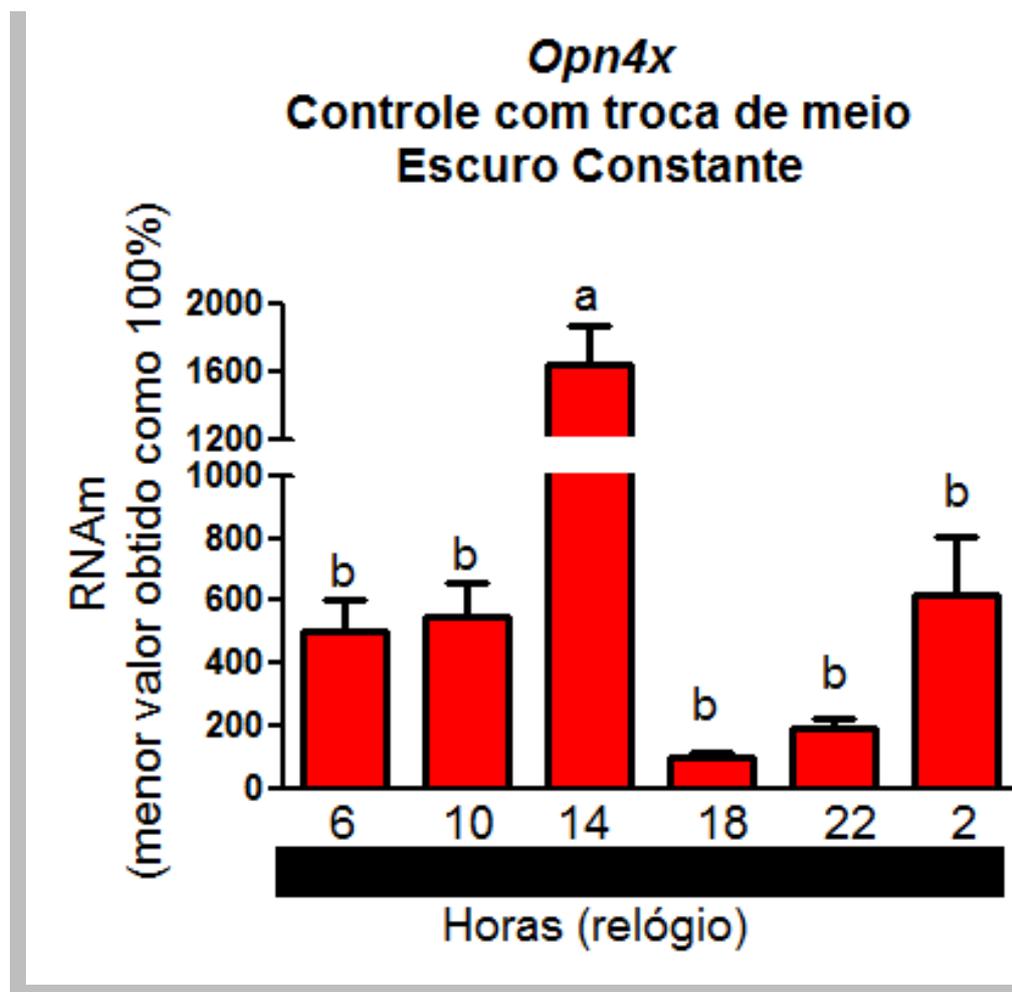


Fig . 26 .PCR quantitativo para melanopsina ortóloga de *Xenopus*. As células foram submetidas a duas trocas de meio e permaneceram em escuro constante por 6 dias antes da extração do RNA total. Valores são a média \pm SEM (n=312). (a) e (b) significativamente diferentes $p < 0,05$.

Nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos a escuro constante e tratados com melatonina por 6h, foi mantido o aumento nos níveis de RNAm para a melanopsina de *Xenopus* (*Opn4x*) às 14h em relação às 22h. A análise por COSANA não indicou ritmicidade.

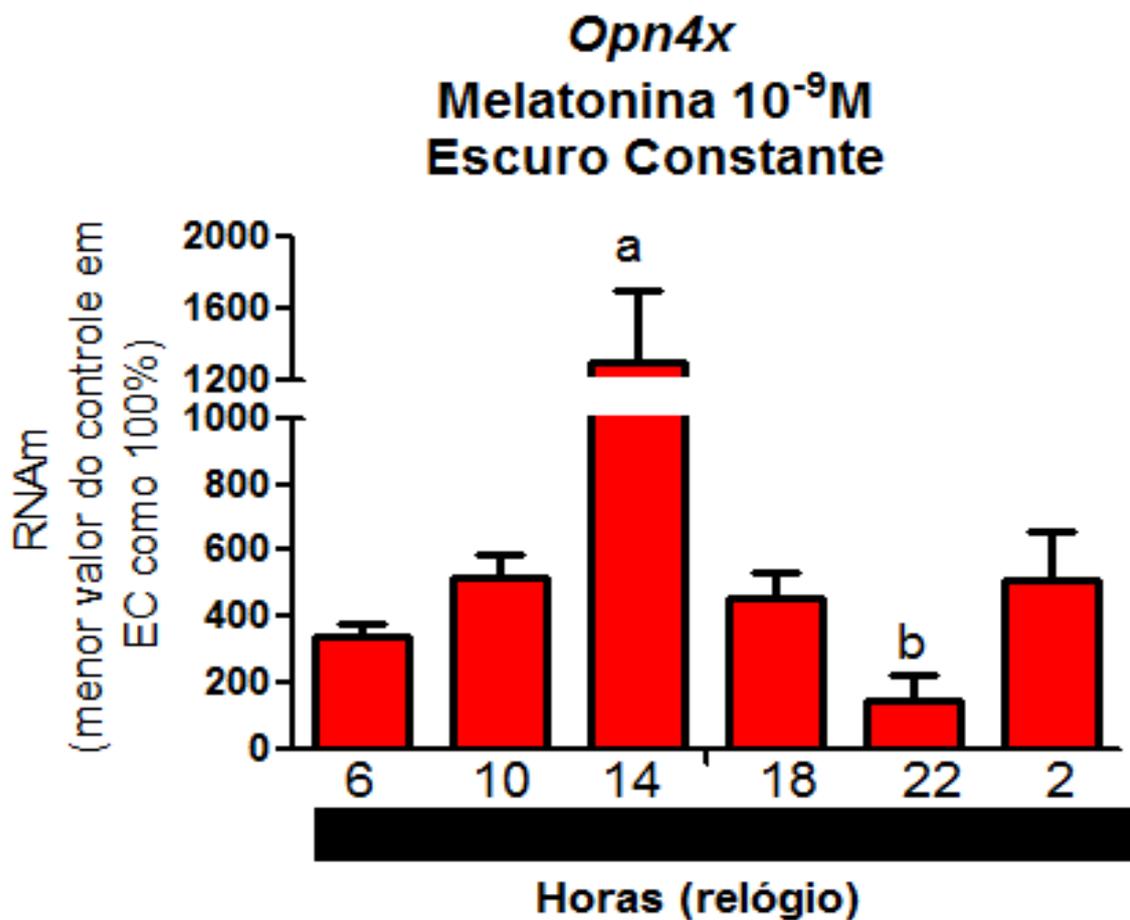


Fig. 27. PCR quantitativo para melanopsina ortóloga de *Xenopus* em melanóforos tratados com melatonina (10⁻⁹M) por 6h. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média ± SEM (n=3-12). (a) e (b) significativamente diferentes p<0,05.

Os dados obtidos demonstram que, nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao escuro constante e tratados com melatonina por 6h, observou-se um aumento significativo dos níveis de RNAm da melanopsina de *Xenopus* (*Opn4x*) às 18h em relação ao seu controle.

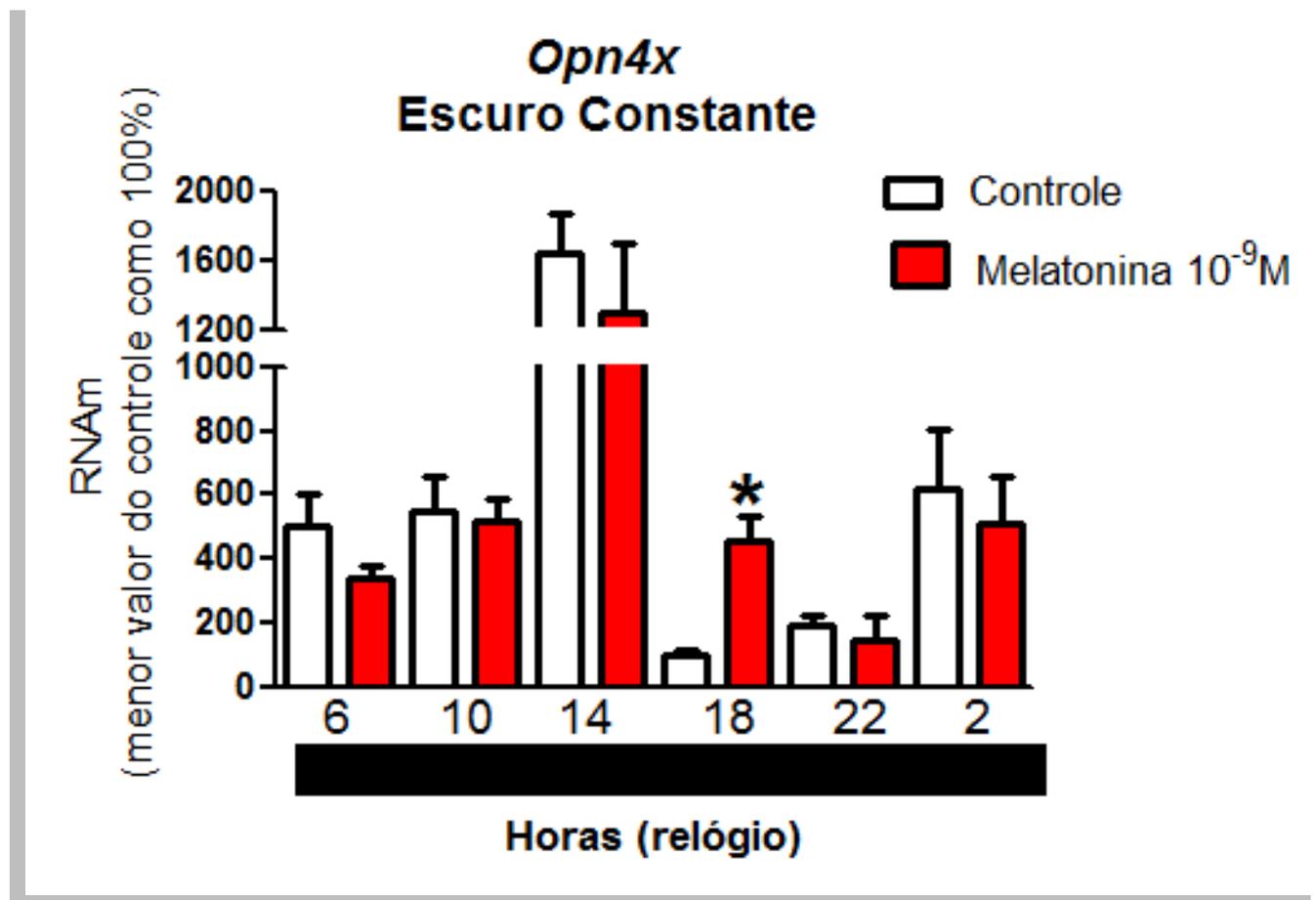


Fig. 28. PCR quantitativo para melanopsina ortóloga de *Xenopus* em melanóforos tratados ou não com melatonina. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (*) significativamente diferente do controle $p < 0,05$.

12C:12E com troca de meio durante a fase clara, na ausência e na presença de melatonina

Nos melanóforos de *Xenopus laevis* submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) com troca de meio durante a fase clara, observou-se um aumento nos níveis de RNAm para a melanopsina de *Xenopus* (*Opn4x*) durante a fase clara no ZT4 em relação a ZT12 e ZT16 (fase escura) e no ZT0 em relação ao ZT16.

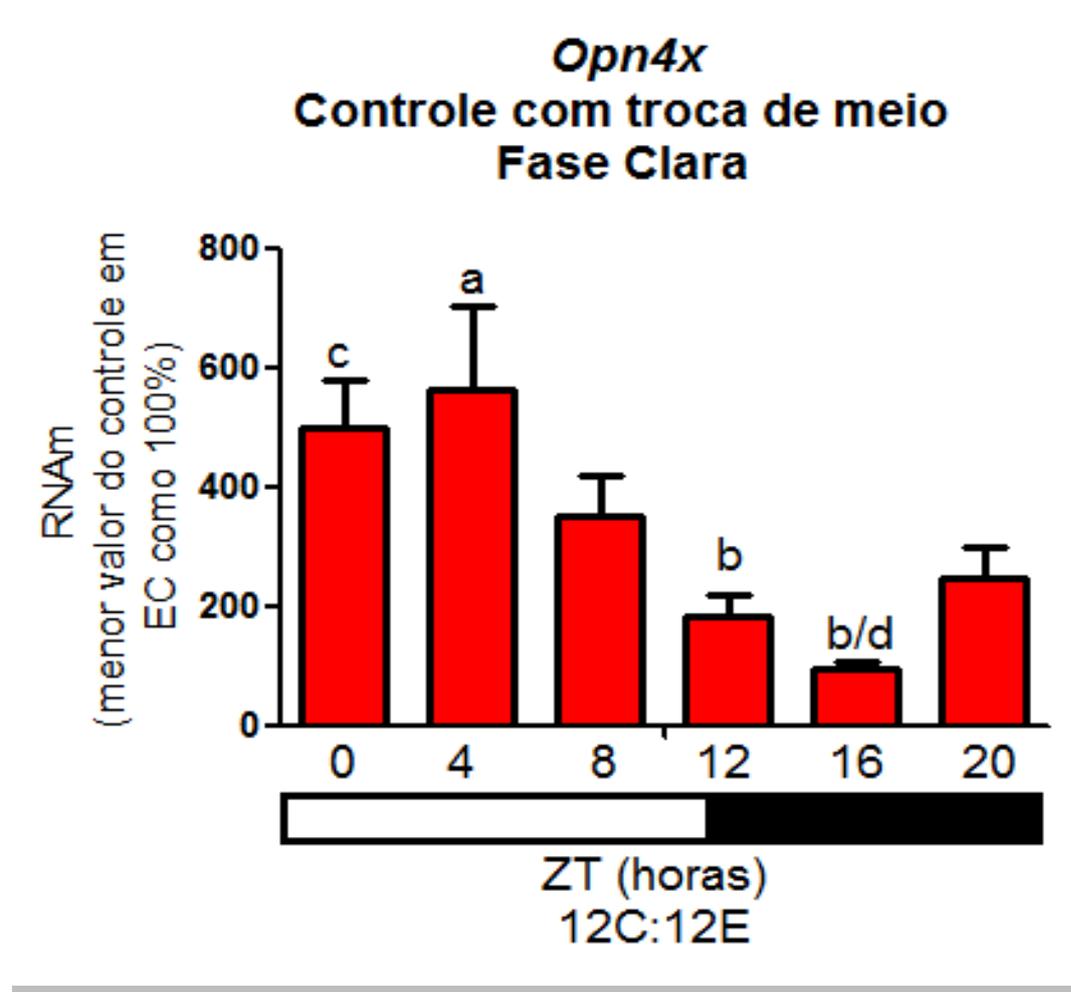


Fig. 29. PCR quantitativo para melanopsina ortóloga de *Xenopus*. As células foram submetidas a duas trocas de meio e permaneceram em regime 12C:12E por 6 dias antes da extração do RNA total. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (a) e (b); (c) e (d) significativamente diferentes $p < 0,05$.

Análise por COSANA indicou um padrão rítmico com $p=0,001$. Os dados indicam que a troca de meio associada ao fotoperíodo (12C:12E, com troca de meio durante a fase clara) foi capaz de sincronizar a expressão da melanopsina *Opn4x*, sugerindo a presença de um padrão de expressão circadiano com período de 25h.

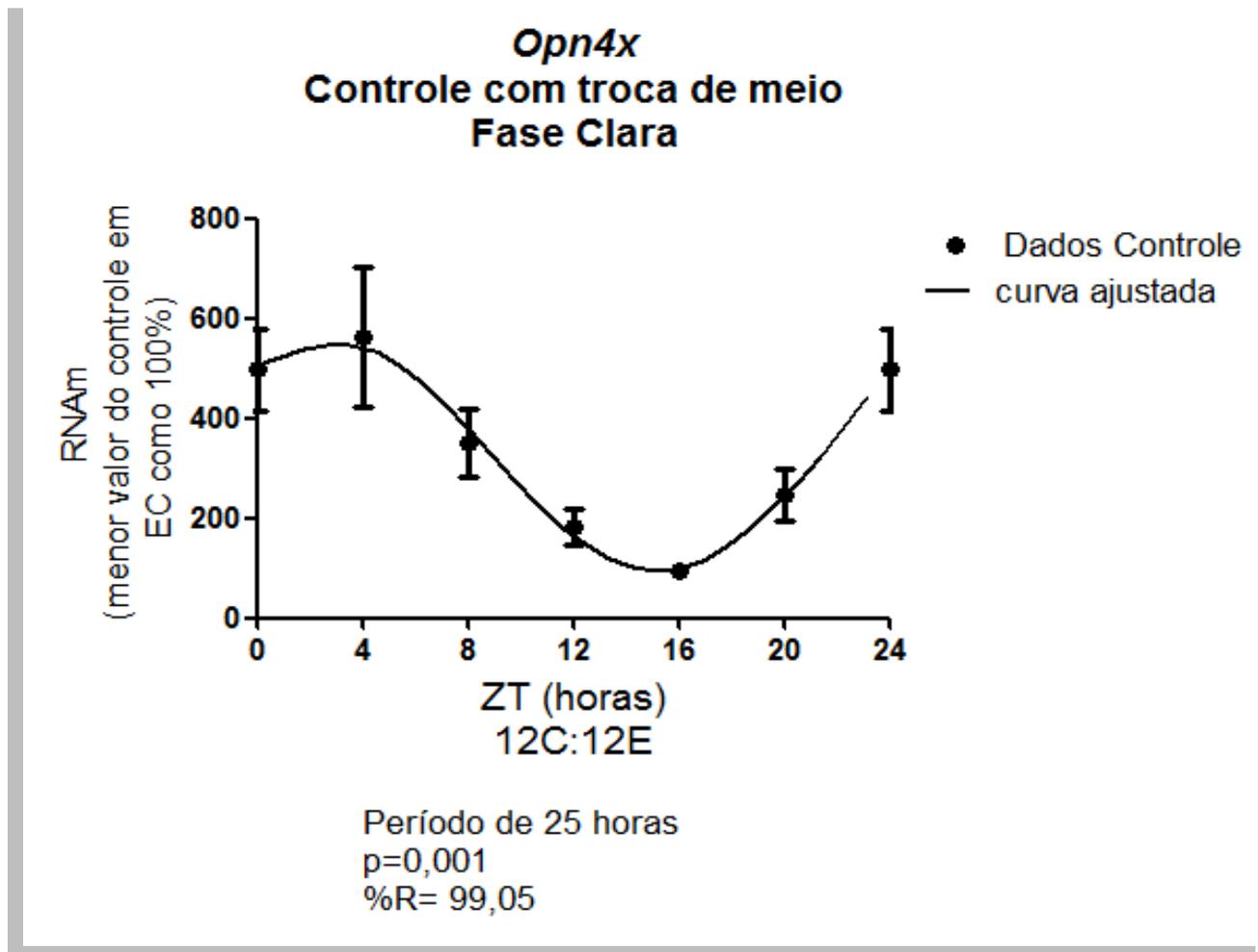


Fig. 30. Análise por COSANA do PCR quantitativo para melanopsina ortóloga de *Xenopus*. As células foram submetidas a duas trocas de meio e permaneceram em regime 12C:12E por 6 dias antes da extração do RNA total.

Nas células submetidas ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) tratadas com melatonina por 6h durante a fase clara, observou-se uma constância nos níveis de RNAm para a melanopsina de *Xenopus* (*Opn4x*), demonstrando que o hormônio aboliu a ritmicidade observada nas células não tratadas.

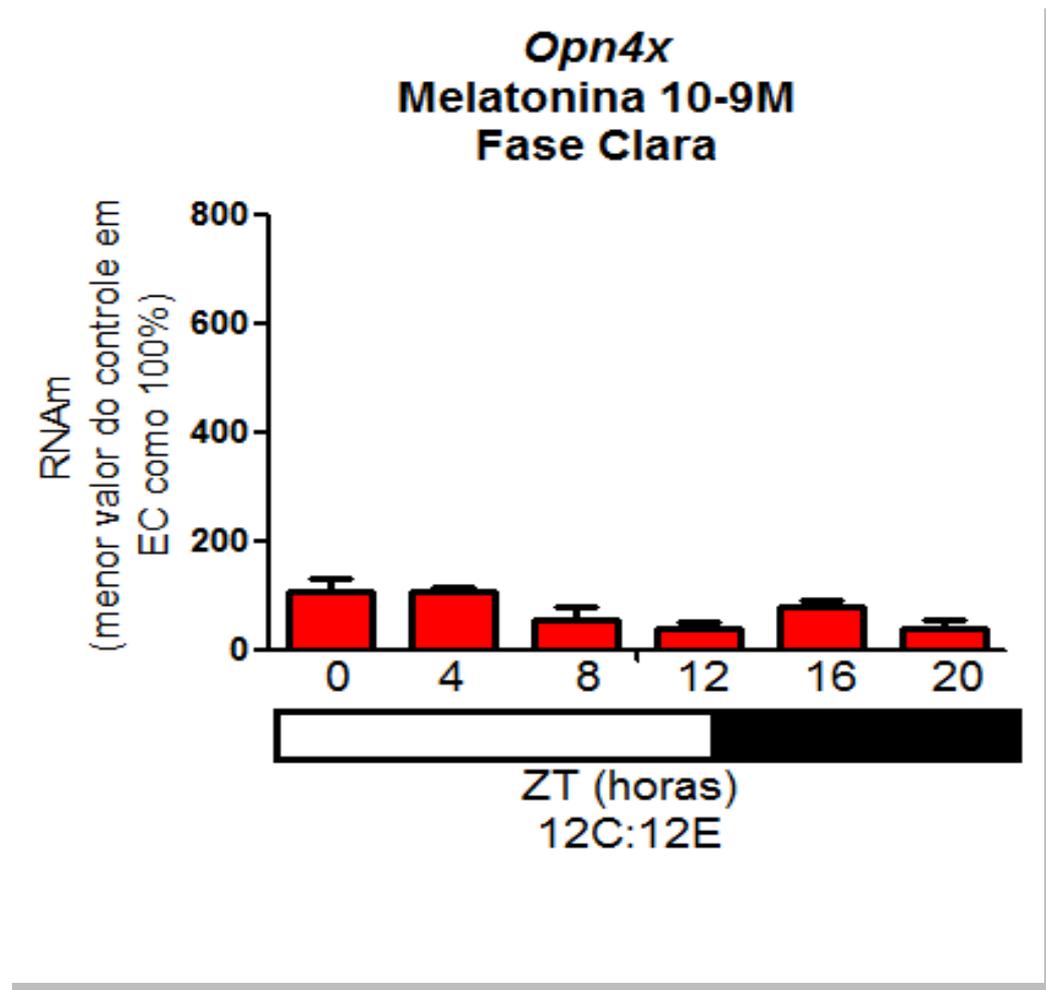


Fig. 31. PCR quantitativo para melanopsina ortóloga de *Xenopus* em melanóforos tratados com melatonina (10^{-9} M) por 6h. As células permaneceram em regime 12C:12E por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-12).

Os dados obtidos demonstram que nos melanóforos submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) tratados com melatonina por 6h durante a fase clara, ocorreu uma queda dos níveis de RNAm em todos os ZTs analisados, sendo essa queda significativa nos ZT4 e ZT20 em relação aos seus controles.

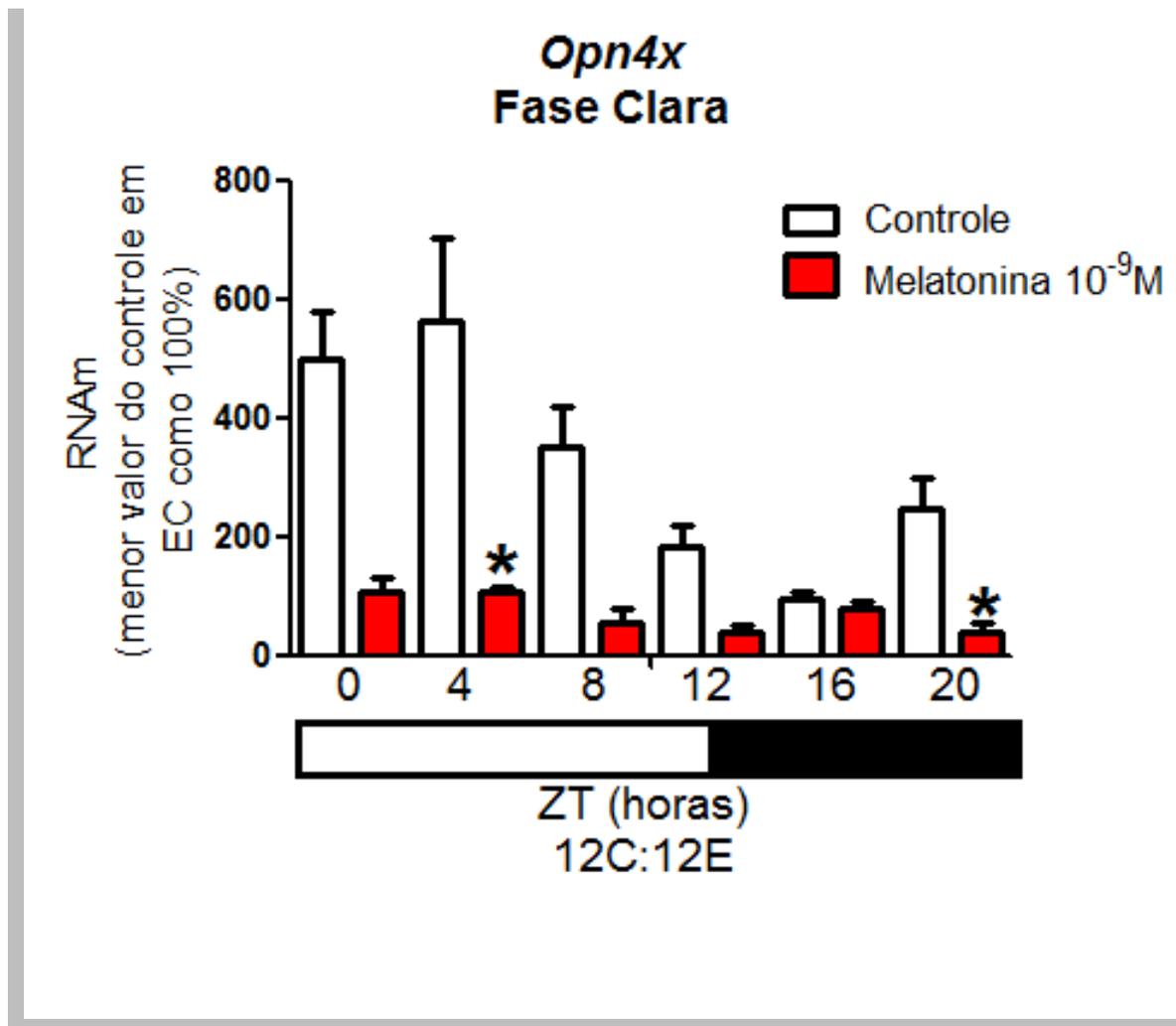


Fig. 32. PCR quantitativo para melanopsina ortóloga de *Xenopus* em melanóforos tratados ou não com melatonina. As células permaneceram em regime 12C:12E por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (*) significativamente diferente do respectivo controle $p < 0,05$.

12C:12E com troca de meio durante a fase escura, na ausência ou na presença de melatonina

Nas células submetidas ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) com troca de meio durante a fase escura, observou-se um aumento nos níveis de RNAm para a melanopsina de *Xenopus* no ZT0 em relação a ZT4, ZT12 e ZT20 e no ZT8 em relação a ZT4, ZT12, ZT16 e ZT20. Apesar dessas diferenças, a análise por COSANA não indicou ritmicidade.

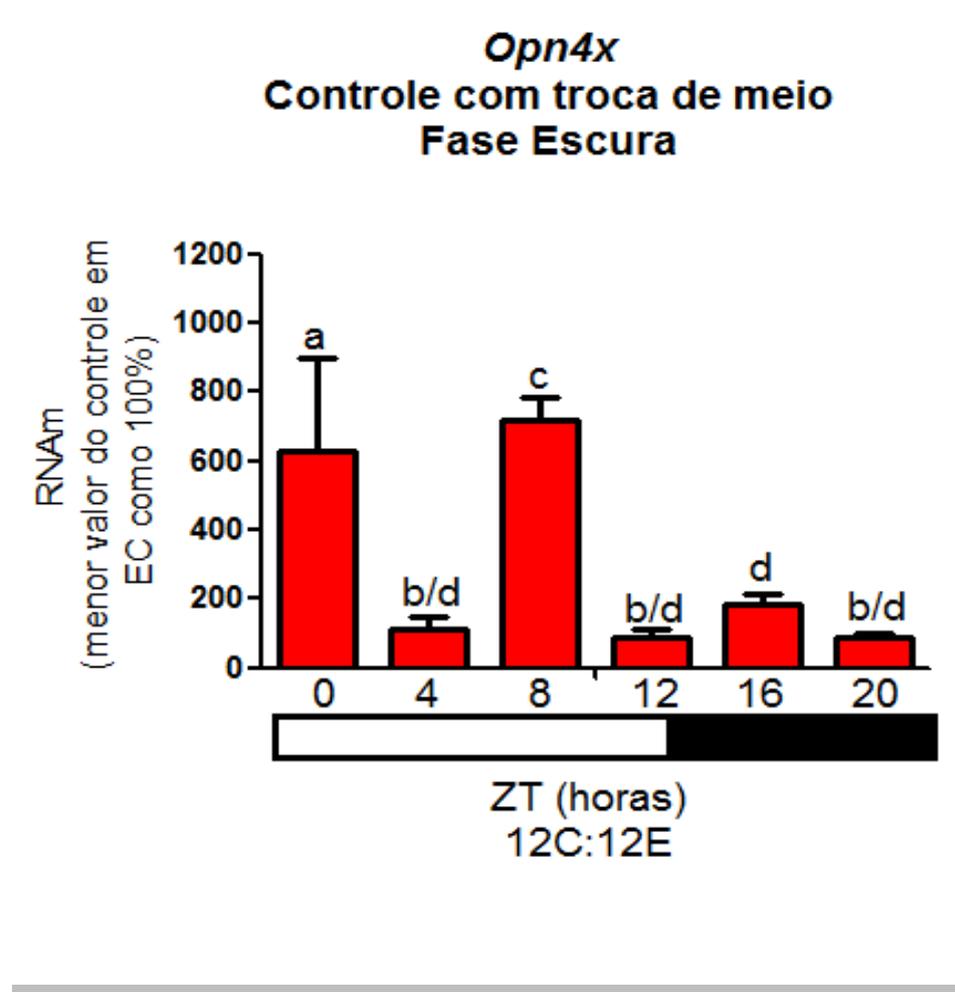


Fig. 33. PCR quantitativo para melanopsina ortóloga de *Xenopus*. As células foram submetidas a duas trocas de meio e permaneceram em regime 12C:12E por 6 dias antes da extração do RNA total. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (a) e (b); (c) e (d) significativamente diferentes $p < 0,05$.

Nas células submetidas ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) tratadas com melatonina por 6h durante a fase escura, observou-se um aumento nos níveis de RNAm para a melanopsina de *Xenopus* no ZT8 em relação aos demais ZTs analisados. Mais uma vez, a análise por COSANA não indicou ritmicidade.

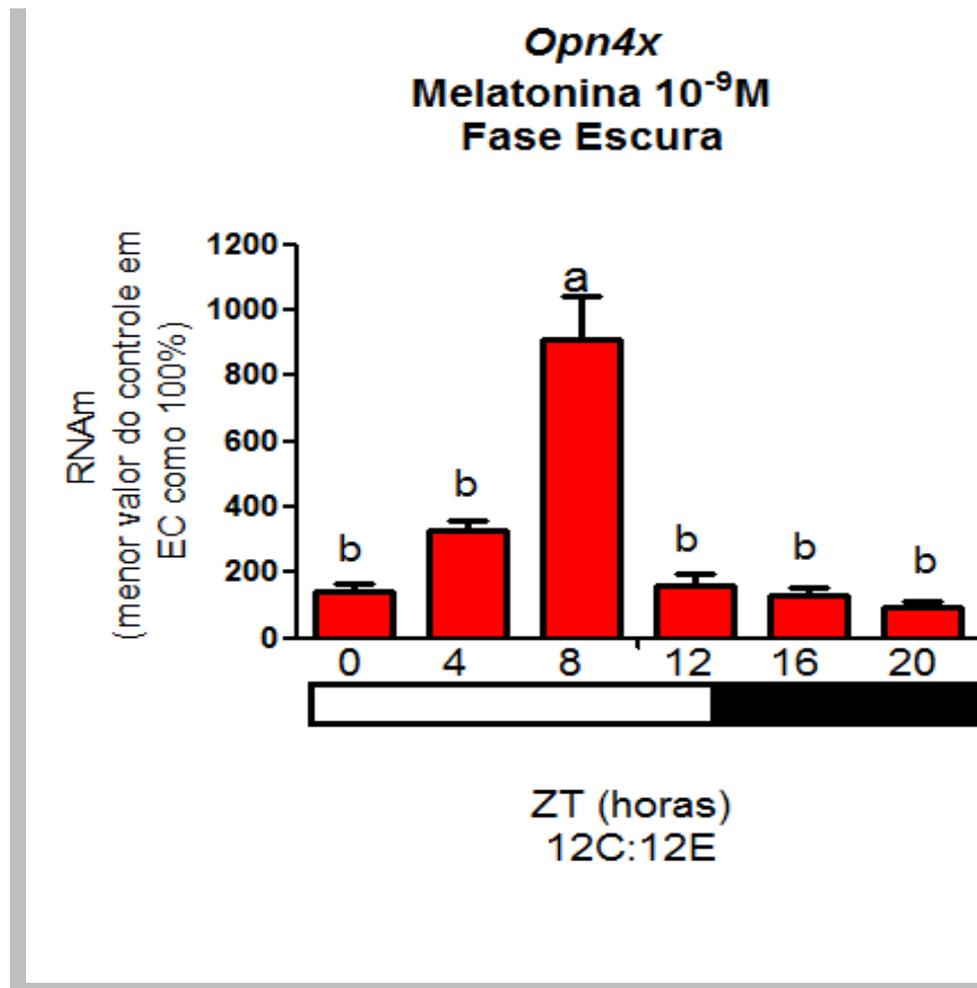


Fig. 34. PCR quantitativo para melanopsina ortóloga de *Xenopus* em melanóforos tratados com melatonina (10^{-9} M) por 6h. As células permaneceram em regime 12C:12E por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-12). (a) e (b) significativamente diferente $p < 0,05$.

Os dados obtidos demonstram que, nos melanóforos submetidos ao ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (12C:12E) tratados com melatonina por 6h durante a fase escura, houve um aumento significativo nos níveis de RNAm para a melanopsina de *Xenopus* no ZT4 em relação ao seu controle.

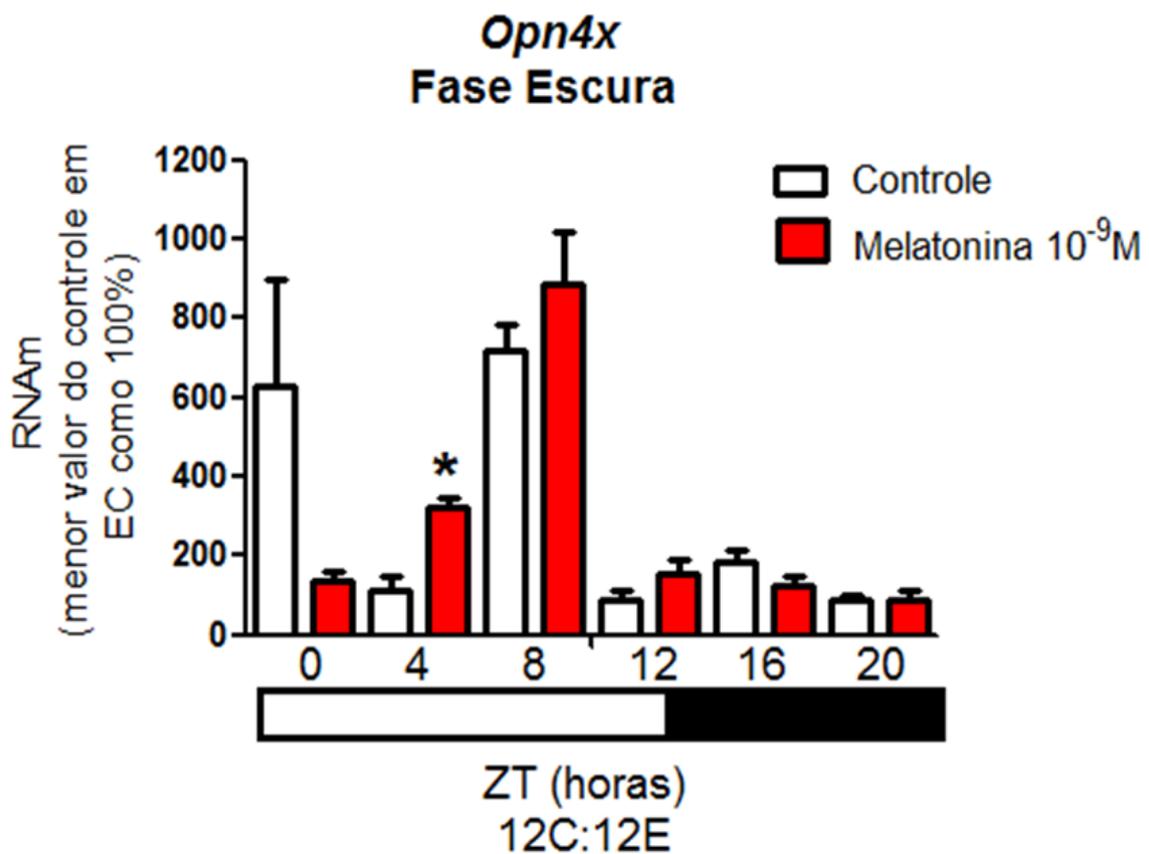


Fig. 35. PCR quantitativo para melanopsina ortóloga de *Xenopus* em melanóforos tratados ou não com melatonina. As células permaneceram em regime 12C:12E por 5 dias sem melatonina antes do início do tratamento. Valores são a média \pm SEM (n=3-12).

Resumo dos Resultados

- A expressão dos genes *Opn4m* e *Opn4x* foi sincronizada pelo ciclo de claro e escuro associado a troca de meio, porém isso parece não ocorrer com o receptor de melatonina.
- Em escuro constante, a melatonina inibiu a expressão de seu receptor às 6h e estimulou às 18h; para *Opn4x* também estimulou às 18h, porém para o gene *Opn4m*, o hormônio não teve efeito.
- Melatonina administrada durante a fase clara do fotoperíodo inibiu a expressão do gene *Opn4x* em todos os ZTs estudados. A expressão do gene *Opn4m* foi inibida durante a fase clara e na transição do claro para o escuro, embora não estatisticamente demonstrado. Para ambas as melanopsinas, melatonina aboliu a sincronização. Para o gene *Mel_{1c}*, o hormônio inibiu no ZT4 e ZT20.
- Quando administrada durante a fase escura do fotoperíodo, melatonina levou a um aumento da expressão de *Opn4x* no ZT4 e uma inibição de seu receptor no ZT20, mas praticamente não afetou a expressão de *Opn4m*.
- Melatonina não foi capaz de sincronizar a expressão dos três genes estudados em nenhuma das condições experimentais.

DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos a expressão temporal das melanopsinas *Opn4m* e *Opn4x* e do receptor de melatonina *Mel_{1c}* e o efeito da melatonina sobre esses três genes nos melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis*.

Os melanóforos de *Xenopus laevis* respondem à luz com a dispersão dos melanossomos, resposta que é característica de melanóforos derivados de embriões deste anfíbio (ROLLAG *et al.*, 2000). A capacidade de melanóforos reagirem diretamente à luz é freqüente, mas nem sempre é mantida. Duas respostas cromáticas primárias são observadas em anfíbios, sendo que a mais comum é a dispersão dos grânulos de pigmentos pelo citoplasma quando os melanóforos são expostos à luz (DANIOLOS *et al.*, 1990; ISOLDI *et al.*, 2005).

A foto-dispersão e o espectro de ação da luz nos melanóforos de *Xenopus* demonstraram inicialmente o envolvimento de uma opsina (DANIOLOS *et al.*, 1990) e a dependência do aldeído retinal (ROLLAG & LYNCH, 1993; ISOLDI *et al.*, 2005), essencial para resposta de foto-dispersão (ROLLAG, 1996b). De fato, após clonagem pelo grupo de Rollag (PROVENCIO *et al.*, 1998), foi demonstrado que a melanopsina, assim como as demais opsinas, possui um resíduo lisina no sétimo domínio transmembrânico, que é necessário para a formação de uma base *shiff* com 11-cis-retinaldeído (EBREY & KOUTALOS, 2001). Sua estrutura protéica suporta a hipótese de que seja um membro da família das opsinas que, por sua vez, fazem parte da superfamília de receptores acoplados à proteína G (PROVENCIO *et al.*, 1998; ISOLDI & CASTRUCCI, 2009).

As melanopsinas têm um papel bem evidente nos melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis*, que é a percepção das condições luminosas para resposta de ajuste cromático corporal com fins de mimetismo e termorregulação através da

dispersão pigmentar. Em outros tipos celulares onde melanopsina está presente, mas não há resposta de translocação pigmentar, como em melanócitos de aves, supõe-se que esse fotopigmento tenha outras funções (CATANIA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2006).

O padrão de expressão de melanopsina difere entre as classes de vertebrados, mas sua presença em células ganglionares da retina é constante (PROVENCIO *et al.*, 2000; 2002; ROLLAG *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2006). Na retina de *Gallus gallus*, este padrão de expressão difere do que é encontrado em mamíferos, pois um número muito pequeno de células que expressam melanopsina foi visto na camada das células ganglionares, enquanto que um número muito grande de células que expressam melanopsina foi encontrado na camada nuclear interna por ensaio imunocitoquímico (LIMA *et al.*, 2006).

Embora as ipRGCs também expressem melanopsina, as respostas de ativação da opsina nessas células parecem ser diferentes das respostas de ativação encontradas nos melanóforos. Quando expostos à luz, os melanóforos redistribuem os melanosomos sem alteração de potencial de membrana (dados de nosso laboratório), já as ipRGCs sofrem despolarização na membrana. Isso poderia sugerir que esses dois tipos celulares apresentam respostas à luz por vias de sinalização diferentes.

Demonstramos em nosso laboratório que a luz em comprimento de onda de 460nm maximamente estimula a(s) melanopsina(s) em melanóforos de *Xenopus*, desencadeando uma cascata de ativação da via dos fosfoinosítídeos. Em última instância, leva ao aumento de Ca^{2+} citossólico e aumento de GMPc (ISOLDI *et al.*, 2005). No entanto, bloqueio do aumento de GMPc não impede a dispersão pigmentar, deixando ainda em questão o papel desse nucleotídeo cíclico na foto-

resposta. A fonte de cálcio também é controversa. Alguns autores relatam que cálcio origina-se de compartimentos intracelulares (KUMBALASIRI *et al.*, 2007), outros do meio externo através de canais TRP6 ou TRP7 (WARREN *et al.*, 2006; SEKARAN *et al.*, 2007). Em cultura de células ganglionares expressando melanopsina de rato, 90% da resposta à luz pode ser bloqueada por tetrodotoxina, demonstrando que a maior parte de Ca^{2+} entra na célula através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (HARTWICK *et al.*, 2007).

Os dados de nosso trabalho demonstram que as melanopsinas em melanóforos de *Xenopus laevis* são sincronizadas aos ciclos de claro-escuro, expressando robustos ritmos ultradiano com período de 16h para *Opn4m* e circadiano com período de 25h para *Opn4x*. Curiosamente, essa ritmicidade só foi observada quando os melanóforos foram mantidos em ciclos 12C:12E e sofreram troca de meio realizada durante a fase clara do fotoperíodo. Os melanóforos que foram submetidos aos demais regimes experimentais (12C:12E sem troca de meio; 12C:12E com troca de meio durante a fase escura; ou escuro constante) não apresentaram essa sincronização. Isso demonstra que, além de ser necessária a presença do fotorpigmento melanopsina, outros fatores estão envolvidos para o estabelecimento da sincronização. Alguns estudos demonstram que um choque de soro é capaz de sincronizar diversos tipos celulares mantidos em cultura (CHAPPELL *et al.*, 2003; OTWAY *et al.*, 2009). É possível especular que alguns componentes encontrados no soro, e no meio que utilizamos, possam estar mimetizando componentes endógenos envolvidos no processo de sincronização *in vivo*.

A melatonina, hormônio derivado da serotonina descrito por Lerner *et al.* (1958) como a substância que clareia a cor da pele de anfíbios, é liberada pela

glândula pineal no período de escuro. Esta molécula também marca o período do escuro em plantas, organismos unicelulares, bactérias e invertebrados (HARDELAND & POEGGELER, 2003). Em vertebrados, melatonina também é sintetizada pela retina, onde exerce uma ação parácrina participando de processos adaptativos da visão noturna (TOSINI & FUKUHARA, 2003). Também células imunocompetentes da medula (TAN *et al.*, 1999) e presentes no colostro (PONTES *et al.*, 2005) sintetizam esta molécula e, neste caso, melatonina não está relacionada à marcação do ciclo claro/escuro ambiental, mas sim a diferentes funções celulares locais. Além disso, a melatonina é encontrada em altas concentrações na bile de vários mamíferos incluindo o homem, e essas concentrações chegam a ser de duas a três vezes maiores do que a concentração noturna da melatonina no sangue (REITER *et al.*, 2000).

A melatonina é uma molécula lipossolúvel, entrando facilmente em qualquer célula, podendo atravessar a barreira hemato-encefálica. Sua ação pode ser mediada por receptores de membrana acoplados a proteína G ou pode diretamente modular reações intracelulares (REITER, 1991; GILAD *et al.*, 1998; POON *et al.*, 1994; WRIGHT *et al.*, 2000). Os receptores de membrana de melatonina estão acoplados à proteína G_i, portanto, quando estimulados levam à inibição da adenilil ciclase. Estudos utilizando melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis* fizeram com que fosse possível a clonagem do primeiro gene de receptor de melatonina (subtipo *Mel_{1c}*, o mesmo investigado neste trabalho). Esses estudos foram importantíssimos para a investigação dos demais receptores de melatonina (EBISAWA *et al.*, 1994), desencadeando um grande interesse nos prováveis papéis fisiológicos exercidos por esse hormônio, que é profundamente estudado até os dias de hoje (EBISAWA *et al.*, 1994; SUGDEN *et al.*, 2004). Os melanóforos de *Xenopus* desempenham

um papel de vital importância nas pesquisas conduzidas por Lerner e colaboradores (1958), que fizeram uso da resposta de clareamento da pele desse anfíbio para monitorar o isolamento do princípio contido na glândula pineal, posteriormente identificado como melatonina. Esta resposta é mediada pelo movimento centrípeto dos grânulos de melanina contidos nos melanóforos dérmicos (SUGDEN, 2004).

A melatonina possui diversas funções dependendo do tipo celular estudado. Além da sinalização circadiana, possui potente ação antioxidante, que pode ser ou não mediada por receptores. Melatonina tem a capacidade de agir mobilizando mecanismos reparadores do DNA e regular o processo de apoptose celular (MAYO *et al.*, 1998). Sua ação anti-proliferativa tem sido descrita em células tumorais diversas (SLOMINSKI & PRUSKI, 1993, KADEKARO *et al.*, 2004) mas ao menos em melanoma humano, alguns trabalhos mostram que esse efeito pode ser controverso (GARCÍA-PATTERSON *et al.*, 1996, SOUZA *et al.*, 2003).

A ação inibitória da melatonina sobre o NSQ dá-se via receptor MT1, levando a um aumento do RNAm de *Per* (MASSON-PÉVET *et al.*, 1994; McNAMARA *et al.*, 2001; POIREL *et al.*, 2002; 2003). Também na *pars tuberalis*, *Per1*, *Per2* e *Rev-erb- α* só são rítmicos na ausência de melatonina. Essa indolamina aumenta a expressão de *Cry* e deprime a expressão máxima dos outros genes do relógio (JOHNSTON *et al.*, 2006).

Os dados do nosso trabalho demonstram que o tratamento com melatonina 10^{-9} M por 6h em melanóforos de *Xenopus laevis*, durante a fase escura do fotoperíodo, levou a um declínio da expressão de *Opn4x* no ZT0 e de seu receptor no ZT20, mas não afetou a expressão de *Opn4m*. Em escuro constante, a melatonina estimulou a expressão de *Opn4x* e de seu receptor, porém para o gene *Opn4m*, o hormônio causou inibição.

Trabalhos demonstram que o tempo e a concentração de melatonina em contato com a cultura ou *in vivo*, é o fator limitante para obter uma resposta fotoperiódica (SIMONNEAUX & RIBELAYGA, 2003). O tratamento com melatonina por 6h na fase clara do fotoperíodo, além de inibir drasticamente a expressão de *Opn4x* e *Opn4m*, aboliu a ritmicidade de ambas as melanopsinas. É interessante que, semelhantemente ao que ocorre no NSQ de mamíferos (MASSON-PÉVET *et al.*, 1994, McNAMARA *et al.*, 2001; POIREL *et al.*, 2002; 2003) melatonina parece também atenuar a ritmicidade de relógios periféricos. É instigante notar essa robusta resposta inibitória durante a fotofase na presença de melatonina, pois se pensarmos no que estaria ocorrendo com o animal no meio ambiente, a melatonina não estaria presente durante a fase clara do fotoperíodo (dia) *in vivo*. Através desses dados, é possível especular que essas células estejam respondendo negativamente a presença de melatonina, como que sinalizando que o hormônio não deveria estar atuando sob essas condições. Se transpusermos os regimes experimentais nos quais as células foram submetidas para o animal em seu habitat, melatonina não estaria circulante e agindo como um sinalizador circadiano durante o dia e/ou por 6h consecutivas.

As poucas variações na expressão gênica do receptor de melatonina *Mel_{1c}*, quer sob diferentes regimes de luz, quer sob tratamento por melatonina, sugerem que esse gene é extremamente estável, não sofrendo alterações ao ser submetido a estímulos exógenos, podendo ser considerado um gene constitutivo. Os resultados demonstram que o controle gênico do receptor de melatonina *Mel_{1c}* não se encontra atrelado a um padrão de expressão temporal, dada a ausência de oscilação rítmica.

Em conclusão, os resultados demonstram que os melanóforos de *Xenopus laevis* possuem um relógio funcional e podem ser caracterizados como relógios

periféricos, porém necessitam do ciclo claro-escuro associado à troca de meio para exibirem sua sincronização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K. *et al.* Role of cyclic AMP in mediating the effects of MSH, norepinephrine and melatonin on frog skin color. **Endocrinology**, 85: 674–82, 1969.
- ABE, M. *et al.* Circadian rhythms in isolated brain regions. **J Neurosci**, 22: 350-56, 2002.
- AFEICHE, S.C.; CIPOLLA-NETO, J. Ritmos Biológicos, In: **Fisiologia**. Aires, M.M. (Coord.). Rio de Janeiro: ed. Guanabara-Koogan, p. 90-94, 2007.
- ALMEIDA-PAULA, L.D. *et al.* Melatonin modulates rat myotube-acetylcholine receptors by inhibiting calmodulin. **Eur J Pharmacology**, 525: 24–31, 2005.
- ARNHEITER, H. Evolutionary biology. Eyes viewed from the skin. **Nature**, 391: 632-33, 1998.
- BAGNARA, J.T. Hypophysectomy and the tail darkening reaction in *Xenopus*. **Proc Soc Exp Biol Med**, 94: 572-75, 1957.
- BAGNARA, J.T.; HADLEY, M.E. Chromatophores and color change. **Prentice Hall Englewood Cliffs**, 304pp, 1973.
- BALDO, M.V.C. Visão, In: **Fisiologia**. Aires, M.M. (Coord.). Rio de Janeiro: ed. Guanabara-Koogan, p. 288-311, 1973.
- BAN, E. *et al.* The signaling pathways in photoresponses that may be mediated by visual pigments in erythrophores of Nile tilapia. **Pigment Cell Res**, 18: 360-69, 2005.
- BARR, L. Photomechanical coupling in the vertebrate sphincter pupillae. **CRC Crit Rev Neurobiol**, 4: 325-66, 1989.
- BELLINGHAM, J.; FOSTER, R. Opsins and mammalian photoentrainment. **Cell Tissue Res**, 309: 57-71, 2002.
- BELLINGHAM, J. *et al.* Evolution of melanopsin photoreceptors: Discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. **Plos Biol**, 4: 1334-43, 2006.
- BENEDITO-SILVA, A.A. Aspectos metodológicos da cronobiologia. In: Marques N. & Menna-Barreto L.S.(eds.) **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**, 3a. Ed., EDUSP: 297-320, 2003.
- BERSON, D.M. *et al.* Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. **Science**, 295: 1070-73, 2002.
- BINKLEY, S. The Pineal – Endocrine and Non-Endocrine Functions. **Prentice Hall, Englewood Cliffs**, 1988.

- BLASK, D.E. *et al.* New actions of melatonin on tumor metabolism and growth. **Biol Signals Recept**, 8: 49-55, 1999.
- BOISSY, R.A. The melanocyte. Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes and hair. **Dermatol Clin**, 6: 161-73, 1988.
- BRYDON, L. *et al.* Dual signaling of human *Mel1a* melatonin receptors via G(i2), G(i3) and G(q/11) proteins. **Mol Endocrinol**, 13: 2025–38, 1999.
- CARLSON, L.L. *et al.* Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G-protein. **Endocrinology**, 125: 2670–76, 1989.
- CASTRUCCI, A.M.L. *et al.* Melanotropin bioassays: *in vitro* and *in vivo* comparisons. **Gen Comp Endocrinol**, 55: 104-11, 1984.
- CATANIA, A. *et al.* Alpha-melanocyte stimulating hormone in normal human physiology and disease states. **Trends in Endocrinol and Metabolis**, 8: 304-8, 2000.
- CHAPPELL, P.E. *et al.* Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1–7 cell line. The **Journal of Neurosci**, 23: 11202-13, 2003.
- COSTA, A. *et al.* Daily rhythm of lactate dehydrogenase in the rat (*Rattus norvegicus*) carrying a *Per1* luciferase transgene: assessment on serum and liver. **Vet Res Commun**, 29:183-86, 2005.
- CLAUSTRAT, B. *et al.* The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med Rev**, 9: 11-24, 2005.
- DANIOLOS, A. *et al.* Action of light on frog cells in culture. **Pigment Cell Res**, 3: 38-43, 1990.
- DAVIDSON, A.J. *et al.* Cardiovascular tissues contain independent circadian clocks. **Clin Exp Hypertens**, 27: 307-11, 2005.
- DUBOCOVICH, M.L. Pharmacology and function of melatonin receptors. **FASEB J**, 2: 2765-73, 1988.
- DUBOCOVICH, M.L.; TAKAHASHI, J.S. Use of 2-[125I]-iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. **J Pharmacology Exp Ther**, 219: 701-07, 1987.
- EBISAWA, T. *et al.* Expression cloning of high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. **Proc Natl Acad Sci**, 91: 6133-37, 1994.
- EBREY, T.; KOUTALOS, Y. Vertebrate photoreceptors. **Prog Retina Eyes Res**, 20: 49-94, 2001.

- EDWARDS, M.L.O.; PIVORUN, E.B. The effects of photoperiod and different dosages of melatonin on metamorphic rate and weight gain in *Xenopus laevis* tadpoles. **Gen Comp Endocrinol**, 81: 28-38, 1991.
- FILADELFI, A.M.C.; CASTRUCCI, A.M.L. Comparative aspects of the Pineal/melatonin system of poikilothermic vertebrates. **J Pineal Res**, 20: 175-86, 1996a.
- FILADELFI, A.M.C.; CASTRUCCI, A.M.L. Mechanism of melatonin desensitizing action on *Bufo ictericus* pigment cell responses to alpha-MSH. **J Comp Biol**, 1: 115-122, 1996b.
- FILADELFI, A.M.C. *et al.* 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: 480-87, 2004.
- FITZGIBBON, J. *et al.* The rhodopsin-encoding gene of bony fish lacks introns. **Gene**, 164: 273-77, 1995.
- FUJII, R.; OSHIMA, N. Control of chromatophores movements in teleost fishes. **Zool Sci**, 3: 13-47, 1986.
- FUJII, R. Cytophysiology of fish chromatophores. **Int Rev Cytol**, 143: 191-255, 1993.
- FUJII, R. The regulation of motile activity in fish chromatophores. **Pigment Cell Res**, 13: 300-19, 2000.
- FUJITA, T.; FUJII, R. Endothelins disperses light-scattering organelles in leucophores of the medaka, *Oryzias latipes*. **Zool Sci**, 14:559-69, 1997.
- GARCIA-PATTERSON, A. *et al.* Thirty years of human pineal research: Do we know its clinical relevance? **J Pineal Res**, 20: 1-6, 1996.
- GILAD, E. *et al.* Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophage: role of inhibition of NFkappaB activation. **FASEB J**, 12: 685-93, 1998.
- GOLOMBEK, D.A.; ROBLERO, R.A. Mecanismos de temporização nos vertebrados. In: Marques N. & Menna-Barreto L.S.(eds.) **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**, 3a. Ed., EDUSP 163-190, 2003.
- GUYTON, A. C.; HALL, J.E. A glândula pineal: sua função no controle da fertilidade sazonal em alguns animais. **Fisiologia humana e Mecanismos das doenças**. 6ª ed., Guanabara-Koogan, 585, 1997.

- HADLEY, M.E.; CASTRUCCI, A.M.L. Melanotropin mechanisms of actions: melanosome movements. **The Melanotropic Peptides**, ed. M.E.Hadley, CRC Press, Washington, 3:15-26, 1988.
- HARDELAND, R.; POEGGELER, B. Non-vertebrate melatonin. **J Pineal Res**, 34: 233-41, 2003.
- HARTWICK, A.T.E. *et al.* Light-evoked calcium responses of isolated melanopsin-expressing retinal ganglion cells. **J Neurosci**, 27: 13468-80, 2007.
- HATTAR, S. *et al.* Melanopsin containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. **Science**, 295: 1065-70, 2002.
- HELTON, R.A. *et al.* Melatonin interactions with cultured murine B16 melanoma cells. **Melanoma Res**, 3: 403-413, 1993.
- HENDRICKSON, A.E.; KELLY, D.E. Development of the amphibian pineal organ; cell proliferation and migration. **The Anatomical Record**, 2: 211-17, 1969.
- HUNT, A.E. *et al.* Activation of *MT(2)* melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. **Am J Physiol**, 280: 110–18, 2001.
- IM, L.H.J. *et al.* Rhythmic expression, light entrainment and α -MSH modulation of rhodopsin in a teleost pigment cell line. **Comp Biochem Physiol**, 147: 691-96, 2006.
- ISOLDI, M.C. *et al.* Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. **PNAS**, 102: 1217-21, 2005.
- ISOLDI, M.C.; CASTRUCCI, A.M.L. Opsins and the perception of light. In Yamanouie, N. **G-protein receptors**, Research SignPost, India, 1-22, 2009.
- ISOLDI, M.C. *et al.* Light modulates the melanophore response to α -MSH in *Xenopus laevis*: an analysis of the signal transduction crosstalk mechanisms involved. **Gen Comp Endocrinol**, 165: 104-10, 2010.
- JOHNSTON, J. D. *et al.* Multiple effects of melatonin on rhythmic clock gene expression in the mammalian pars tuberalis. **Endocrinology**, 147: 959-65, 2006.
- KADEKARO, A.L. *et al.* Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation and survival. **Ann NY Acad Sci**, 994: 359-65, 2003.
- KADEKARO, A.L. *et al.* MT-1 melatonin receptor expression increases the antiproliferative effect of melatonin on S-91 murine melanoma cells. **J Pineal Res**, 36: 204-11, 2004.

- KOPP, M., MEISSL, H. & KORF, H.W. The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced phosphorylation of the transcription factor CREB (Camp response element binding protein) in the rat suprachiasmatic nucleus is inhibited by melatonin. **Neurosci Lett**, 227: 145–148, 1997.
- KORF, H-W.; ORSCHE, A. The pineal organ, in: Pang, P.K.T. & Schreibman, M.P. eds. **Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications- Morphological Considerations**. Academic Press Inc., New York, 1:105-145, 1986.
- KORF, B. *et al.* Ontogenetic development of S-antigen and rodopsin immunoreactions in retinal and pineal photoreceptors of *Xenopus laevis* in relation to the onset of melatonin-dependent color-change mechanisms. **Cell Tissue Res**, 258: 319-29, 1989.
- KUMBALASIRI, T. *et al.* Melanopsin triggers the release of internal calcium stores in response to light. **Photochem Photobiol**, 83: 273-79, 2007.
- LERNER, A.B. *et al.* Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **J Am Chem Soc**, 80: 2587, 1958.
- LOTUFO, C.M.C. *et al.* Melatonin and *N*-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **European Journ of Pharmacol**, 430: 351–57, 2001.
- LERNER, M.R. Tools for investigating functional interactions between ligands and G protein-coupled receptors. **Trends Neurosci**, 17: 142-46, 1994.
- LIMA, L.H.R.G. *et al.* Melanopsin in chicken melanocytes and retina. **Biological Rhythm Res**, 37: 393-404, 2006.
- MASANA, M. I.; DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. **Science**, 107: PE39, 2001.
- MASSON-PÉVET, M. *et al.* An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic function: a study in five hibernator species. **Cell Tissue Res**, 278: 97-106, 1994.
- MAYO, J.C. *et al.* Melatonin prevents apoptosis induced by 6 hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson disease. **J Pineal Res**, 24: 179-92, 1998.
- McNAMARA, P. *et al.* Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: A humoral mechanism to reset a peripheral clock. **Cell**, 105: 877-89, 2001.
- McARTHUR, A.J. *et al.* Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. **Endocrinology**, 138: 627–34, 1997.

- McNULTY, S. *et al.* Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine *pars tuberalis*. **J Neuroendocrinol**, 6: 523–32, 1994.
- MENAKER, M. *et al.* Evolution of circadian organization in vertebrates. **Braz J Med Biol Res**, 30: 305-13, 1997.
- MEYSKEN, F.L.; SALMON, S.E. Modulation of clonogenic human melanoma cells by FSH, melatonin, and nerve growth factor. **Br J Cancer**, 43: 111-15, 1981.
- MOORE, R.Y.; KLEIN, D.C. Visual pathways and the central neural control of rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. **Brain Res**, 71: 17-33, 1974.
- MOORE-EDE, M.C. *et al.* Characteristics of a circadian clock. In: The clocks that time us. **Cambridge, MA: Harvard University Press**, 1982.
- MORGAN, P.J. *et al.* Melatonin receptors couple through a cholera toxin-sensitive mechanism to inhibit cyclic AMP in the ovine pituitary. **J Neuroendocrinol**, 7: 361-69, 1995.
- MORGAN, P.J. *et al.* Melatonin inhibits cyclic AMP in cultured ovine *pars tuberalis* cells. **J Mol Endocrinol**, 5: 3–8, 1989.
- MORIYA, T. Light sensitive response in melanophores of *Xenopus laevis*: I. Spectral characteristics of melanophore response in isolated tail fin of *Xenopus* tadpole. **J Exp Zool**, 276: 11-18, 1996.
- NATH, K. *et al.* Effects of ethidium bromide and SYBR Green I on different polymerase chain reaction systems. **J Biochem Biophys Methods**, 42:15-29, 2000.
- NELSON, W. *et al.* Methods for cosinor rhythmometry. **Chronobiologia**, 6: 305-23, 1979.
- NERY, L.E.; CASTRUCCI, A.M.L. Pigment cell signalling for physiological color change. **Comp Biochem Physiol A**, 118: 1135-44, 1997.
- NOSJEAN, O. *et al.* Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. **J Biol Chem**, 275: 31311–17, 2000.
- OHTA, T. Melanosome dispersion in direct response to light in melanophores of *Rhodeus ocellatus* fry. **Annot Zool Jpn**, 56: 155–62, 1983.
- OHTA, T.; MURAMATSU, K. Spectral sensitivity of melanophores in the primary color response of the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus*. **Jpn J Ichthyol**, 34: 483-87, 1988.
- OHTA, T.; SUGIMOTO, S. Leucosome dispersion under light in medaka leucophores. **Jpn J Ichthyol**, 27: 72–76, 1980.

- OLIVER, J.; BAYLE, J.D. Brain photoreceptors for the photo-induced testicular response in birds. **Experientia**, 38: 1021-29, 1982.
- OSHIMA, N. *et al.* Light-induced pigment aggregation in xanthophores of the medaka *Oryzias latipes*. **Pigment Cell Res**, 11: 362–67, 1998.
- OSHIMA, N.; YOKOZEKI, A. Direct control of pigment aggregation and dispersion in tilapia erythrophores by light. **Zool Sci**, 16: 51–54, 1999.
- OTWAY, D.T. *et al.* . Circadian rhythmicity in murine pre adipocyte and adipocyte cells. **Chronobiol Int**, 26: 1434-54, 2009.
- PANDA, S. *et al.* Melanopsin (*Opn4*) is required for circadian phase shifting under low light conditions. **Science**, 298 :2213-16, 2002.
- PANDA, S. *et al.* Melanopsin is required for non–image-forming photic responses in blind mice. **Science**, 301: 525-27, 2003.
- PETIT, L. *et al.* Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. **Biochem Pharmacol**, 58: 633–39, 1999.
- PIRES, S.S. *et al.* Isolation and characterization of melanopsin (*Opn4*) from the Australian marsupial *Sminthopsis crassicaudata* (fat-tailed dunnart). **Proc R Soc B**, 279, 2791-2799, 2007.
- POIREL, J.V. *et al.* MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. **Brain Research**, 946: 64-71, 2002.
- POIREL, V.J. *et al.* Contrary to other no-photoc cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. **Neuroscience**, 120: 745-55, 2003.
- PONTES, G.N. *et al.* Avaliação da ritmicidade de secreção de melatonina em colostro de mães, clinicamente sadias e com mastite. **Anais da XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE**, Águas de Lindóia, São Paulo, pp. 78, 2005.
- POON, A.M. *et al.* Evidence for a direct action of melatonin on the immune system **Biol Signals**, 3: 107-17, 1994.
- PROVENCIO, I. *et al.* Melanopsin: an opsin in melanophores, brain and eye. **Proc Natl Acad Sci**, 95: 340-45, 1998.
- PROVENCIO, I. *et al.* A novel human opsin in the inner retina. **J Neurosci**, 20: 600-05, 2000.
- PROVENCIO, I. *et al.* Photoreceptive net in the mammalian retina. **Nature**, 415: 493, 2002.

- RAWDING, R.S.; HUTCHINSON, V.H. Influence of temperature and photoperiod on plasma melatonin in the mudpuppy, *Necturus maculosus*. **Gen Comp Endocrinol**, 88: 364-74, 1992.
- REITER, R.J. Pineal melatonin: cell biology of its physiological intrainment by melatonin. **Science**, 219: 1089-91, 1991.
- REITER, R. J. *et al.* Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. **Ann NY Acad Sci**, 917: 376-86, 2000.
- REPERT, S.M. *et al.* Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. **Neuron**, 13: 1177-85, 1994.
- REPERT, S.M. *et al.* Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the *Mel_{1b}* melatonin receptor. **Proc Natl Acad Sci**, 92: 8734-38, 1995a.
- REPERT, S.M. *et al.* Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptorsubtypes differentially expressed in chick brain. **Neuron**, 15: 1003-15, 1995b.
- ROKA, F. *et al.* Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. **Mol Pharmacol**, 56: 1014-24, 1999.
- ROLLAG, M.D. Pertussis toxin sensitive photoaggregation of pigment in isolated *Xenopus* tail-fin melanophores. **Photochem Photobiol**, 57:862-66, 1993.
- ROLLAG, M.D.; LYNCH, G.R. Melatonin-induced desensitization in amphibian melanophores. **J Exp Zool**, 265: 488-95, 1993.
- ROLLAG, M.D. Amphibian melanophores become photosensitive when treated with retinal. **J Exp Zool**, 275: 20-6, 1996a.
- ROLLAG, M.D. Response of amphibian melanophores to melatonin. **Pineal Res**, 6: 67-93, 1996b
- ROLLAG, M.D. *et al.* Cultured amphibian melanophores: a model system to study melanopsin photobiology. **Methods Enzymol**, 316: 291-309, 2000.
- ROLLAG, M.D. *et al.* Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors and mammalian photoentrainment. **J Biol Rhythms**, 18: 227-34, 2003.
- ROSEBOOM, P.H. *et al.* Melatonin synthesis: analysis of the more than 150- fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. **Endocrinology**, 137: 3033-45, 1996.
- ROTH, J.A. *et al.* Melatonin supression of PC12 cell growth and death. **Brain Res**, 768: 63-70, 1997.

- SATO, M. *et al.* Direct effects of visible and UVA light on pigment migration in erythrophores of Nile tilapia. **Pigment Cell Res**, 17: 519–24, 2004.
- SCHOMERUS, C. *et al.* Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteosomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. **J Neurochem**, 75: 2123-32, 2000.
- SELDENRIJK, R. *et al.* Morphological and physiological aspects of melanophores in primary culture from tadpoles of *Xenopus laevis*. **Cell Tissue Res**, 198: 397-409, 1979.
- SEKARAN, S. *et al.* 2-Aminoethoxydiphenylborane is an acute inhibitor of directly photosensitive retinal ganglion cell activity *in vitro* and *in vivo*. **J Neurosci**, 27: 3981-86, 2007.
- SHERBROOKE, W.C. *et al.* Melanotropic peptides and receptors: an evolutionary perspective in vertebrates. In: **The Melanotropic Peptides**, ed. M.E. Hadley, CRC Press, Washington DC, 2: 175-90, 1988.
- SHIU, S.Y.W.; PANG, S.F. An update phylogenetic analysis of vertebrate melatonin receptor sequences: reflection on the melatonin receptor nomenclature by the Nomenclature Subcommittee of the International Union of Pharmacology. **Biol Signals Recept**, 7: 244-48, 1998.
- SHIU, S.Y.W. *et al.* Inhibition of malignant trophoblastic cell proliferation *in vitro* and *in vivo* by melatonin. **Life Sci**, 67: 2059-74, 2000.
- SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacological Rev**, 55: 325-95, 2003.
- SLOMINSKI, A.; PAWELEK, J. Animals under the sun: effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. **Clin Dermatol**, 16: 503–515, 1998.
- SLOMINSKI, A. *et al.* Metabolism of serotonin to N-acetylserotonin, melatonin and 5-methoxytryptamine in hamster skin culture. **J Biol Chem**, 271: 12281-86, 1996.
- SLOMINSKI, A.; PRUSKY, D. Melatonin inhibits proliferation and melanogenesis in rodent melanoma cells. **Exp Cell Res**, 206: 189-94, 1993.
- SOUZA, A.V. *et al.* Melatonin biological activity and binding sites in human melanoma cells. **J Pineal Res**, 34: 242-48, 2003.
- SU, C. *et al.* Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. **Science**, 311: 1617-21, 2006.
- SUGDEN, D. *et al.* Melatonin, melatonin receptors and melanophores: a moving story. **Pigment Cell Res**, 17: 454–60, 2004.

- TAM, C.W. *et al.* Signaling mechanisms of melatonin in antiproliferation of hormone-refractory 22Rv1 human prostate cancer cells: implications for prostate cancer chemoprevention. **J Pineal Res**, 42: 191-202, 2007.
- TAN, D.X. *et al.* Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. **Biochim Biophys Acta**, 1472: 206-14, 1999.
- TERAKITA, A. *et al.* Counterion displacement in the molecular evolution of the rhodopsin family. **Nat Struct Mol Biol**, 11: 284-89, 2004.
- TOSINI, G.; FUKUHARA, C. Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. **J Neuroendocrinol**, 15: 364-69, 2003.
- TORRES-FARFAN, C. *et al.* Immunocytochemical demonstration of day/night changes of clock gene protein levels in the murine adrenal gland: Differences between melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. **J Pineal Res**, 40: 64-70, 2006.
- TSATMALI, M. *et al.* Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. **J Histochem Cytochem**, 50: 125–33, 2002.
- VANECEK, J.; VOLLRATH, L. Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. **Brain Res**, 505: 157–59, 1989.
- VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol Rev**, 78: 687-721, 1998.
- VIJAYALAXMI, C.R.T. *et al.* Melatonin: From Basic Research to Cancer Treatment Clinics. **J Clin Oncol**, 20: 2575-2601, 2002.
- VON GALL, C. *et al.* CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP, and melatonin for clockwork access. **J Neurosci**, 18: 10389-97, 1998.
- VON GALL, C. *et al.* Melatonin limits transcriptional impact of phosphoCREB in the mouse SCN via the Mel1a receptor. **Neuroreport**, 11: 1803-07, 2000.
- WAKAMATSU, Y. Light-sensitive fish melanophores in culture. **J Exp Zool**, 204: 299–304, 1978.
- WARREN, E.J. *et al.* The light-activated signaling pathway in SCN-projecting rat retinal ganglion cells. **Eur J Neurosci**, 23: 2477-87, 2006.
- WHITE, B.H. *et al.* Pertussis toxin blocks melatonin induced pigment aggregation in dermal melanophores. **J Comp Physiol**, 157: 153–57, 1987.
- YAMAZAKI, S. *et al.* Interaction of the retina with suprachiasmatic pacemakers in the control of circadian behavior. **J Biol Rhythms**, 17: 315-29, 2002.

- YING, S.W. *et al.* Human malignant melanoma cells express high-affinity receptors for melatonin: antiproliferative effects of melatonin and 6-chloromelatonin. **Eur J Pharmacol**, 246: 89-96, 1993.
- YOKOYAMA, S. Molecular evolution of vertebrate visual pigments. **Prog Retina Eyes Res**, 19: 385-419, 2000.
- YOO, S.H. *et al.* Period2::Luciferase real time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. **Proc Natl Acad Sci**, 101: 5339-46, 2004.
- WHITMORE, D. *et al.* Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. **Nature**, 404: 87-91, 2000.
- WRIGHT, M.L. *et al.* Direct influence of melatonin on the thyroid and comparison with prolactin. **J Exp Zool**, 12: 625-31, 2000.
- ZATZ, M. *et al.* Photoendocrine transduction in cultured chick pineal cells: effects of light, dark and potassium on the melatonin rhythm. **Brain Res**, 438: 199-215, 1988.