CÁSSIA BORGES LIMA BULHÕES MARTINS

**Expressão Gênica Temporal de Melanopsina (*Opn4*), *Clock*, *Cry* e *Per* e sua
Regulação por Melatonina em Células de *Danio rerio*.**

São Paulo

2007

CÁSSIA BORGES LIMA BULHÕES MARTINS

**Expressão Gênica Temporal de Melanopsina (*Opn4*), *Clock*, *Cry* e *Per* e sua
Regulação por Melatonina em Células de *Danio rerio*.**

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

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Maria
de Lauro Castrucci

São Paulo

2007

Ficha Catalográfica

Martins, Cássia Borges
Lima Bulhões
Expressão Gênica Temporal de Melanopsina
(*Opn4*), *Clock*, *Cry* e *Per* e sua Regulação
por Melatonina em Células de *Danio rerio* /
Cássia Bulhões Martins. – São Paulo, 2007.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia.

1. Ritmos biológicos 2. Células
embrionárias 3. Melatonina I. Universidade
de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Fisiologia.

DEDICATÓRIA

***À prof. Dr. Ana Maria de Lauro Castrucci por sua orientação e confiança durante todo o processo, desde o estágio até a conclusão deste trabalho. Seu apoio foi fundamental!
Ao meu marido Marcelo pelo amor e dedicação.***

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci pela oportunidade, confiança, dedicação e paciência. Mil palavras seriam insuficientes para expressar toda minha gratidão e admiração por esta profissional exemplar.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Visconti por seu apoio e pela leitura crítica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz S. Menna-Barreto e Daniela Wey pela contribuição nas análises de ritmo. Ao Leonardo por sua ajuda nas análises estatísticas e seu companheirismo durante esses anos.

Ao pessoal do laboratório, pela experiência e contribuição.

À querida Gláucia que com sua competência e sabedoria me ensinou e ajudou em tudo que precisei, além de ser uma profissional excelente é minha grande amiga de momentos bons e não tão bons.

À Fernanda por seu carinho e sincera amizade, em qualquer hora e para qualquer coisa pude contar com sua ajuda.

À Andrea Natali por seu apoio e lealdade acima de tudo. Sem sua presença forte e amiga seria muito difícil, os momentos felizes e engraçados não seriam tão bons.

Aos técnicos Márcio e Telma, por todo o suporte que deram durante a realização deste trabalho.

A minha família, meu irmão Romesnir pelo apoio e incentivo. Ao meu irmão Amauri porque tudo começou com sua dedicação em minha formação. À minha irmã Rosy que sempre esteve presente.

Ao meu marido Marcelo por seu companheirismo, otimismo e amor que me dão suporte em tudo. Seu incentivo foi e é fundamental pra mim, suas aulas de inglês foram decisivas.

A minha filha Talita que me tornou uma pessoa melhor e mais dedicada. Fez tudo valer a pena!

Ao CNPQ e à FAPESP, pelo suporte financeiro, o qual possibilitou a

realização deste trabalho.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. Relógios Biológicos	1
2. Melanopsina	5
3. Melatonina	7
OBJETIVOS	10
MATERIAL E MÉTODOS	11
1. Manutenção de células ZEM-2S	11
2. Determinação da presença de RNAm para <i>Opn4</i> , receptor de melatonina MT2 e <i>Cry</i>	11
2.1. Extração de RNA total	11
2.2. Reação de transcriptase reversa - RT-PCR	12
2.3. Reação de polimerase em cadeia – PCR	12
3. Clonagem e sequenciamento de <i>Opn4</i> e do receptor de melatonina	16
4. Quantificação da expressão de RNAm para <i>Opn4</i> , <i>Per1</i> , <i>Clock</i> e <i>Cry1b</i> , em diferentes regimes de luz e na ausência ou presença de melatonina	17
RESULTADOS	20
1. Determinação da presença de RNAm de <i>Opn4</i> e <i>Cry</i> (experimentos realizados em colaboração com Fernanda Pizão Farhat) e de receptor de melatonina	20
2. Respostas fóticas e ensaios hormonais por PCR quantitativo (tempo real)	25
2.1. Melanopsina (<i>Opn4</i>)	25
2.2. <i>Clock</i>	28
2.3. <i>Per1</i> e <i>Cry 1b</i>	31
DISCUSSÃO	38
RESUMO	45
ABSTRACT	47
CONCLUSÕES	49
BIBLIOGRAFIA	50

INTRODUÇÃO

1. Relógios Biológicos

Muitos ritmos biológicos são claramente associados a um ciclo geofísico, dos quais o mais evidente é o ciclo claro/escuro. Este ciclo é importante para todas as espécies que possuem algum tipo de pigmento fotossensível. Os ritmos biológicos associados ao regime claro/escuro são conhecidos como ritmos circadianos, cujo período varia de 20 a 28 horas, de acordo com a espécie. Relógios circadianos (~24h) são sistemas de observação de tempo endógenos que dirigem o ritmo biológico diário nos organismos. A oscilação é gerada durante uma transcrição/tradução com circuito de regeneração autoregulatório, que é recomposto durante uma indicação do ciclo claro/escuro do tempo externo que envolve o controle dos ritmos biomecânicos e fisiológicos através dos genes controladores do relógio (Dunlap, 1999; King, 2000). O mecanismo circadiano é entendido como sendo um mecanismo com retroalimentação cíclica auto-sustentável, em que a expressão dos genes de relógio é suprimida periodicamente (Dunlap, 1999). O ciclo transcricional aparece para reforçar e estabilizar o ciclo de retroalimentação (Glossop *et al.*, 1999).

As flutuações diárias e sazonais da intensidade da luz e da temperatura ambiente são fatores que sincronizam os relógios biológicos internos. Os relógios biológicos responsáveis pelo programa temporal interno estão codificados no DNA (Hall & Rosbash, 1987; 1988); os genes de relógio têm que satisfazer alguns critérios, como: a ausência de proteína de relógio deve levar a arritmicidade, a sua síntese deve apresentar ritmo circadiano, a fase do ritmo deve ser alterada por *Zeitgebers* (neologismo alemão que significa “doador de tempo”) e a manipulação dos níveis protéicos deve mudar a fase do ritmo (Lopes *et al.*, 2003).

A ritmicidade de expressão de genes de relógio é observada em retinas e glândula pineal (Whitmore *et al.*, 1998). Para algumas espécies, o escuro constante, ou para outras, altas intensidades luminosas podem modificar, ou mesmo suprimir, a expressão da ritmicidade biológica (Marques *et al.*, 1999).

Para que o sistema funcione de forma adequada, há a necessidade de um marca-passo ou relógio que, por sua vez, precisa de um sistema de entrada e saída que forneça um sinal de forma rítmica. O marcapasso, junto com os sistemas de entrada e saída, constitui o sistema circadiano, que aparenta ser semelhante em todos os organismos. O sinal ocular surge de uma pequena população de células ganglionares que se projeta, via trato retino-hipotalâmico, para o núcleo supraquiasmático (Moore *et al.*, 1995; Abrahamson & Moore, 2001; Pichard *et al.*, 2002). Os olhos, o núcleo supraquiasmático e o órgão pineal são componentes chave do sistema circadiano em vertebrados (Collin *et al.*, 1989; Takahashi, 1995). O núcleo supraquiasmático isolado mantém a atividade rítmica, quando mantido em cultura (Gillette *et al.*, 1995), bem como a retina de *Xenopus laevis* (Besharse & Iuvone, 1983).

O funcionamento do relógio circadiano envolve mecanismos de retroalimentação positiva e negativa. Os genes *Clock* e *Bmal1* (*brain and muscle Arnt-like protein 1*) expressam as respectivas proteínas que formam um heterodímero, funcionando como fator de transcrição para a expressão dos genes *Per* (*period*), *Cry* (*cryptochrome*) e o receptor órfão REV-ERB. PER e CRY formam oligômeros que são transportados do citoplasma para o núcleo, onde bloqueiam a sua própria transcrição ao inibir a ação de CLOCK/BMAL1. Além disso, os mecanismos de retroalimentação positiva e negativa acabam por entrelaçarem-se, pois o heterodímero *Clock/Bmal1* também induz a expressão de REV-ERB que, por sua vez, reprime a transcrição de *Bmal1*, em um mecanismo ainda não totalmente esclarecido.

Quando a proteína REV-ERB está ausente, o gene *Bmal1* (e possivelmente também o gene *Clock*) é liberado, podendo formar novamente o fator de transcrição CLOCK/BMAL1, reiniciando um novo ciclo circadiano (Albrecht & Eichele, 2003). Em geral, um típico ciclo circadiano tem início nas primeiras horas da manhã com a ativação da transcrição de *Per* e *Cry* por CLOCK/BMAL1. Os níveis de transcrição atingem seu ápice por volta de meio-dia e os níveis de proteína no citoplasma atingem o seu apogeu cerca de duas horas depois. O modelo biológico, baseado principalmente em estudos realizados com células em cultura, postula que a

proteína PER mantém-se em constante vaivém entre o núcleo e o citoplasma. Após sofrer hiperfosforilação pela ação da caseína quinase I ϵ (Clk ϵ), a estabilidade de PER diminui. Ocorre, então, a sua degradação no citoplasma, enquanto a proteína CRY liga-se à PER no núcleo, impedindo sua saída. Desta forma, ocorrerá o bloqueio de CLOCK/BMAL1, resultando no fim da transcrição de *Per* e *Cry*. Em algum ponto, quando muita proteína PER é degradada no citoplasma, a concentração de PER no núcleo torna-se muito baixa para manter a retroalimentação, levando ao início de um novo ciclo. Assim, a periodicidade do relógio circadiano resulta da combinação entre retroalimentação transcricional positiva e negativa, o vaivém constante de PER entre o núcleo e o citoplasma, e a fosforilação e degradação de PER (Albrecht & Eichele, 2003). O relógio residente no núcleo supraquiasmático permite a entrada de sinais externos e gera sinais para sistemas periféricos. O núcleo supraquiasmático responde ao sinal neuronal pela indução do gene *Per* através de um elemento responsivo ao AMPc localizado no promotor de *Per* (Akashi & Nishida, 2000; Balsalobre *et al.*, 2000).

Em contraste com esse conhecimento do núcleo supraquiasmático, os relógios periféricos vêm sendo menos estudados, mas já se sabe que ocorrem de peixes a mamíferos. A ritmicidade de expressão de genes de relógio já foi observada em coração e rim e em linhagens celulares embrionárias de *Danio rerio* (Whitmore *et al.*, 1998, 2000; Pando *et al.*, 2001; Carr & Whitmore, 2005). Está bem estabelecido hoje que, em adição ao marca-passo circadiano localizado no sistema nervoso central, há osciladores em tecidos periféricos (Yamazaki *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2002; Bartell *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2005; Davidson *et al.*, 2005). Como o marca-passo central isolado expressa ritmo sustentado, persistente por 30 ou mais ciclos, enquanto ritmos periféricos se atenuam em poucos dias (Yamazaki *et al.*, 2000), aceitava-se a hierarquia do central sobre o periférico. No entanto, vários laboratórios demonstraram a independência do oscilador em muitos tecidos (Yamazaki *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 2002; Bartell *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2005; Davidson *et al.*, 2005), que provavelmente contêm elementos sincronizadores (Yoo *et al.*, 2004).

É notável que a expressão circadiana, observada em tecidos periféricos, pode

ser ativada diretamente por exposição à luz tanto em organismos íntegros como em alguns tipos celulares em cultura (Balsalobre *et al.*, 1998; Whitmore *et al.*, 2000; Carr & Whitmore, 2005). Ou por outros sincronizadores como alimento (Costa *et al.*, 2005; Davidson *et al.*, 2005). Em *Drosophila* e *Danio rerio*, os osciladores periféricos podem ser sincronizados diretamente por luz (Emery *et al.*, 1998; Stanewsky *et al.*, 1998; Ceriani *et al.*, 1999; Whitmore *et al.*, 2000), enquanto em mamíferos o reinício de fase dos osciladores periféricos parece ser controlado por sinais regulados pelo marcapasso do núcleo supraquiasmático (Yamazaki *et al.*, 2000). Os mecanismos dessa sincronização parecem ser específicos para cada tecido, envolvendo sinais humorais e neurais (Balsalobre *et al.*, 2000; McNamara *et al.*, 2001; Terazono *et al.*, 2003). Relógios periféricos distinguem-se do relógio central uma vez que a expressão dos genes de relógio em órgãos em cultura persiste por apenas alguns dias (Yamasaki *et al.*, 2000).

O sistema circadiano de teleósteos tem recebido relativamente pequena atenção, com exceção de estudos do ritmo fisiológico de pineal e retina e do controle circadiano de comportamento (Cahill, 2001). Enquanto *Danio rerio* não representa totalmente esta diversificada classe de vertebrados, ele é um modelo para a análise comparativa. Uma razão para o recente aumento de atenção para o sistema circadiano de *Danio rerio* é o seu potencial como modelo de sistema para análise genética dos mecanismos de relógio (Allada *et al.*, 2001; Loros & Dunlap, 2001; Yong & Kay, 2001; Skanewsky, 2002; Okamura *et al.*, 2002).

Usando esta espécie de teleósteo como modelo para análise do desenvolvimento ontogenético de sistema de relógio em vertebrados, o gene de relógio *Per3* foi apresentado como sendo ritmicamente expresso durante a embriogênese (Delaunay *et al.*, 2000). Transcritos dos genes do relógio são expressos ritmicamente em todos os tecidos estudados de *Danio rerio*, e RNA mensageiro de *Clock* tem seu pico no início da noite e sua concentração mais baixa ao amanhecer. Nisto os relógios de *D. rerio* diferem do núcleo supraquiasmático de mamíferos, no qual *Clock* é constitutivamente expresso (Shearman *et al.*, 1999). Também difere o fato que *Per1* e *Per3* são rítmicos, e *Per2* é estimulado pela luz, semelhantemente à retina de *Xenopus* (Zhuang *et al.*, 2000), enquanto em

mamíferos os 3 genes *Per* são rítmicos em condições constantes, e *Per 1* e *2* são estimulados por luz.

Em *Danio rerio* há 6 genes *Cry* ritmicamente expressos (Kobayashi *et al.*, 2000), 2 deles semelhantes ao *Cry1* e 2 ao *Cry2* de mamíferos. O pico de *Cry1* é durante o dia, enquanto o pico de *Cry2* é à noite, o que sugere que não há aparente redundância (Cahill, 2002). As diferenças nestes zCrys ainda estão por serem esclarecidas (Kobayashi *et al.*, 2002).

Apesar de muitos seres unicelulares possuírem marcapassos circadianos, foi surpreendente a descoberta de que tecidos e linhagens celulares imortalizadas apresentavam relógios biológicos (Whitmore *et al.*, 2000; Carr & Whitmore, 2005). Os seis tipos de Crys estão presentes nas células Z3 de *Danio rerio*, classificados como *Cry* repressor (zCry1a, 1b, 2a e 2b) e não repressor (zCry3 e 4). Os zCry1b e 3 poderiam ser o fotopigmento, uma vez que são expressos nessa linhagem em todos os regimes de fotoperíodo (Cermakian *et al.*, 2002).

2. Melanopsina

Opsinas são proteínas de sete domínios transmembrânicos, acopladas à proteína G, e que se ligam covalentemente ao 11-*cis*-retinal (aldeído da Vitamina A1) pela base de Schiff. As opsinas de vertebrados e invertebrados possuem o mesmo cromóforo, mas diferem na sequência protéica. Nos vertebrados, o retinal está ligado à Lys296, e Glu113 é o contra-íon. O cromóforo encaixa-se em uma dobra da opsina, cuja porção C-terminal possui sítios de fosforilação, e interage com a proteína G (transducina no caso da rodopsina), arrestina e quinases (Nakagawa *et al.*, 1999; Filipek *et al.*, 2003).

Nos vertebrados, a ligação da base de Schiff com o retinal é hidrolizada e 11-*cis* isomerizado em all-*trans*-retinal em resposta à luz; all-*trans*-retinal é então liberado da apoproteína. 11-*cis* retinal é regenerado no epitélio pigmentar retiniano, retornando a seguir ao fotorreceptor. Em invertebrados, após exposição à luz, forma-se uma metarodopsina estável com o all-*trans* retinal ainda ligado a ela. All-*trans*-retinal é convertido de volta ao isômero 11-*cis* por luz, sem sair da dobra protéica

(Schwemer *et al.*, 1982; Paulsen & Schwemer, 1983).

A primeira opsina não visual, pinopsina, foi descrita em 1994 em pineal de galinha (Okano *et al.*, 1994) e é a responsável pela fotosensibilidade da pineal de aves (Okano *et al.*, 1994; Max *et al.*, 1995) e lagartos (Taniguchi *et al.*, 2001). Outras opsinas não visuais foram depois descritas, tais como parapinopsina em teleósteos, anfíbio *Xenopus* e lampréia (Blackshaw & Snyder, 1997; Koyanagi *et al.*, 2004). Em salmão foi encontrada uma opsina denominada VA (ancestral de vertebrados, Soni & Foster, 1997), ortóloga da opsina P de lampréia (Yokoyama & Zhang, 1997). Encefalopsina (OPN3) (Blackshaw & Snyder, 1999; Moutsaki *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2002), neuropsina (OPN5) (Tarttelin *et al.*, 2003), peropsina (Sun *et al.*, 1997) e RGR (receptor de protreína G retiniano) (Juang *et al.*, 1993) muito provavelmente funcionam como isomerases ou receptores de retinóides, e não como fotopigmentos.

Até a década de 80, acreditava-se que o ajuste do relógio residente no núcleo supraquiasmático dependia de cones e bastonetes. No entanto, camundongos *rd/rd* que degeneraram os bastonetes e praticamente todos os cones, exibem uma atividade normal sincronizada por luz (Freedman *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 1999). Deveria portanto existir na retina um fotorreceptor outro, diverso de cones e bastonetes, já que após enucleação bilateral a sincronização por luz era perdida (Nelson *et al.*, 1981).

Em 1998, Provencio e colaboradores clonaram de melanóforos do anfíbio *Xenopus laevis* uma nova opsina, que chamaram melanopsina (OPN4) (Provencio *et al.*, 1998). Melanopsina é a opsina não visual mais importante, encontrada na retina de todos os vertebrados, de peixes a humanos (Provencio *et al.*, 2000; Bellingham *et al.*, 2002; Provencio *et al.*, 2002; Drivenes *et al.*, 2003; Chaurasia *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2006), e em cefalocordados (Koyanagi *et al.*, 2004), apresenta maior semelhança estrutural (Provencio *et al.*, 2000) e funcional (Isoldi *et al.*, 2005; Kumbalasiri *et al.*, 2006) com as opsinas de invertebrados. Na retina de mamíferos, esse fotopigmento é expresso em uma pequena população de células ganglionares, que formam com sua extensa árvore dendrítica, uma extensa rede de células intrinsecamente fotossensíveis, as ipRGCs (Provencio *et al.*, 2002). Camundongos *Rd/rd* nocauteados para melanopsina não ajustam sua atividade ao ciclo claro/escuro e

comportam-se como se estivessem em escuro constante (Panda *et al.*, 2002; 2003).

No geral, as opsinas de cones e bastonetes (fotorreceptores ciliares de vertebrados) estimulam uma proteína G, sensível à toxina de pertussis, a Gt ou transducina. A Gt α estimula uma fosfodiesterase de GMP cíclico, diminuindo os níveis desse nucleotídeo. No escuro, canais dependentes de nucleotídeos cíclicos que deixam passar Na⁺ e Ca²⁺ são mantidos abertos graças à ligação de 4 GMPC. Com a diminuição dos níveis de GMPC, os canais se fecham e o fotorreceptor se hiperpolariza (Yau & Baylor, 1989).

Em contraste, a via de transdução de sinal da melanopsina é semelhante à dos fotorreceptores rabdoméricos de invertebrados, particularmente *Limulus* (Shin *et al.*, 1993; Gargner *et al.*, 2004). Após exposição à luz, melanopsina estimula uma fosfolipase C, levando à produção de inositol trisfosfato (IP₃) e diacilglicerol com aumento de cálcio citossólico oriundo de compartimentos intracelulares. Uma despolarização lenta e sustentada ocorre nas células ganglionares, em decorrência de abertura de canais de Na⁺ (Berson *et al.*, 2002; Isoldi *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2005; Kumbalasiri *et al.*, 2006; Contin *et al.*, 2007). Em melanóforo de *Xenopus laevis*, não se demonstrou até o momento alteração de potencial de membrana durante a resposta à luz, mas há uma adicional ativação de uma proteína quinase C (Isoldi *et al.*, 2005).

3. Melatonina

A glândula pineal de vertebrados sintetiza o hormônio melatonina exclusivamente durante o período noturno, caracterizando uma variação diária típica dos ritmos circadianos. Essa síntese noturna da melatonina ocorre em todas as espécies de vertebrados, quer sejam elas noturnas, diurnas ou crepusculares (Armstrong, 1989; Cipolla-Neto & Afeche, 1999). Pelo fato de a melatonina ser sintetizada e secretada somente durante a noite, ela é um hormônio sinalizador do dia e da noite, para os organismos. Além disso, pela sua flutuação sazonal, dependente da duração da noite, ela sinaliza as estações do ano (Cipolla-Neto & Afeche, 1999). A produção e a secreção de melatonina são vistas como responsáveis pela transmissão da informação fotoperiódica para todo

o organismo, exercendo um papel regulatório sobre os mais diversos eventos fisiológicos, metabólicos e comportamentais.

Os órgãos pineais de peixes, anfíbios, répteis e algumas aves são diretamente fotossensíveis, sendo os pinealócitos estruturas semelhantes aos fotorreceptores da retina. Além disso, as glândulas pineais nestas espécies apresentam também a capacidade de gerar ritmicidade endógena, funcionando como verdadeiros relógios biológicos. Nestes casos, a sincronização e a geração do ritmo circadiano do hormônio melatonina independe da informação luminosa proveniente da retina. Por outro lado, na glândula pineal de mamíferos, o ritmo circadiano de produção de melatonina é dependente da geração de oscilações circadianas pelos núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos. Estes, por sua vez, sincronizam-se ao ciclo diário de iluminação ambiental através de uma via neural que se inicia nos fotorreceptores da retina e projeta-se para o hipotálamo, em particular para os núcleos supraquiasmáticos (a via retino-hipotalâmica) (Moore & Klein, 1974).

Os núcleos supraquiasmáticos controlam a glândula pineal através de uma via que inclui os núcleos paraventriculares hipotalâmicos, os neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermediolateral da medula espinhal, os gânglios cervicais superiores, de onde se originam os neurônios pós-ganglionares simpáticos, que se projetam para a glândula pineal através dos ramos carotídeos internos e dos nervos conários (Cipolla-Neto & Afeche, 1999; Erlich & Apuzzo, 1985).

Esse hormônio é distribuído rapidamente pela circulação sistêmica para todas as estruturas centrais e periféricas. 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). 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).

Os receptores de melatonina são denominados MT₁, MT₂ e MT₃, (Reppert *et al.*, 1996; Vanecek, 1998). O receptor MT₁ está presente em todos os vertebrados, principalmente no cérebro, o MT₂ está presente em todos os vertebrados, principalmente na retina e o MT₃ está presente unicamente nos vertebrados não-mamíferos (Reppert *et al.*, 1995a; Nosjean *et al.*, 2000). Em melanóforo de *Xenopus laevis*, melatonina agrega os melanossomos através de uma proteína Gi, levando ao decréscimo de AMP cíclico (White *et al.* 1987; Abe *et al.*, 1969), 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 cólera toxina 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 atividade de fosfolipase C (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).

A ativação do subtipo MT₂, além de acarretar a inibição de adenilil ciclase, via proteína G sensível a 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

Considerando-se que as células em cultura podem constituir modelos de relógios periféricos e apresentam respostas biológicas evidentes à luz visível, este trabalho visou investigar mecanismos de ajustes desses relógios em células do teleósteo *Danio rerio*, e sua regulação por diferentes regimes fotoperiódicos e por melatonina. Para esta finalidade testamos as seguintes hipóteses:

1. as células ZEM 2S embrionárias de *Danio rerio* são relógios periféricos e devem, portanto, apresentar expressão cíclica de genes como *Per1*, independentemente do ciclo claro e escuro;
2. essas células apresentam expressão cíclica da opsina presente, e essa ritmicidade independe do ciclo claro e escuro
3. nessas células a expressão de opsinas e de genes do relógio pode ser alterada por melatonina.

Portanto:

- Analisamos o padrão de expressão temporal de melanopsina, *Per1*, *Cry1b* e *Clock* em células embrionárias ZEM-2S submetidas a fotoperíodo 12C:12E e escuro constante;

- Analisamos se melatonina em condições de escuro constante simulou a situação fotoperíodo 12C:12E.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Manutenção de células ZEM-2S

Células ZEM-2S foram mantidas em cinco partes de meio L-15 (Gibco, CA, EUA) e quatro partes de meio D-MEM/F-12 (Gibco, CA, EUA) suplementados com 7,5% de NaHCO₃, 10% de soro fetal bovino (Cultilab, SP, Brasil) e 1% de penicilina/estreptomicina/anfoterecina B (Sigma Chem. Co., MO, EUA), pH 7,2, a 28°C. O meio de cultura foi trocado sob fluxo laminar (Trox modelo FLV) a cada 72 horas e as células subcultivadas (1:6) quando atingiram a confluência dos frascos. Para tanto foram removidas com solução de Tyrode/EDTA (em g/L: NaCl 8,0; KCl 0,2; NaHCO₃ 1,0; NaH₂PO₄ 0,05; MgCl₂ 1,0; EDTA 1,86) e transferidas para novos frascos.

2. Determinação da presença de RNAm para *Opn4*, receptor de melatonina MT2 e *Cry*

2.1. Extração de RNA total

Para extração do RNA total de células, utilizamos frascos de cultura de 25 cm² semiconfluentes (80 a 90%). Após o descarte do meio, adicionou-se 1 mL de *Tri-Reagent-LS* (Sigma Chem. Co., MO, EUA) diretamente sobre as células. O lisado celular foi coletado e incubado por 5min em temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação das proteínas nucleares. Adicionou-se 200 uL de 1-bromo-3-cloropropano (Sigma Chem. Co., MO, EUA) e, em seguida, as amostras foram agitadas vigorosamente por 15seg. Após incubação por 10min em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15min a 4° C, separando-se a seguir a fase superior aquosa, que contém RNA. O RNA foi precipitado com a adição de 650uL de isopropanol (Sigma Chem. Co., MO, EUA) por 10min em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 35min a 4° C. O sobrenadante foi removido e o pellet de RNA lavado com 1,3 mL de etanol 75%. O RNA foi recuperado por centrifugação a 12.000 x g por 15min a 4° C, e a lavagem com etanol repetida, sendo as amostras colocadas a -80°C por no mínimo

1h. Após nova centrifugação, o etanol foi descartado e o precipitado de RNA evaporado em temperatura ambiente, ressuscitado em 20uL de água tratada com dietil pirocarbonato (H₂O DEPC, Ambion Inc, TX, EUA) e tratado com DNase conforme instruções do fabricante (turbo-DNA-freeTM, Ambion Inc., TX, EUA). Resumidamente, a cada amostra foi adicionado 10% de volume do tampão para Turbo DNase e 1uL de Turbo DNase. A seguir, as amostras foram incubadas por 30min a 37°C. Foram acrescentados 10% do volume de reagente de inativação da Turbo DNase, seguido por incubação por 2min em temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 x g por 2min para precipitar o reagente de inativação. O sobrenadante foi removido para um novo tubo.

2.2. Reação de transcriptase reversa - RT-PCR

A concentração de RNA foi determinada por leitura da absorbância a 260nm em espectrofotômetro (GeneQuant *pro*, Amersham) e o RT-PCR foi realizado com 1µg de RNA total, utilizando 1 µL de oligonucleotídeos randômicos (50µg/µL) e 1µL de dNTPs 10mM (Gibco-BRL, CA, EUA), em reação com volume final de 13uL ajustado com H₂O DEPC. As amostras foram aquecidas por 5min a 65° C e a seguir transferidas para cuba com gelo, adicionando-se 4µL de tampão para PCR (5x), 1µL de DTT (0,1 M), 1µL de inibidor de ribonuclease (40 U/µL) e 1µL da enzima *Superscript III* (200U/uL, Invitrogen, CA, EUA), para um volume final de 20µL. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada por 5 minutos a 25°C, e a seguir por 50 minutos a 50°C. A reação foi inativada por incubação a 70°C por 15 minutos. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subseqüentes de PCR.

2.3. Reação de polimerase em cadeia – PCR

Para os experimentos seguintes, utilizamos cDNA de células embrionárias ZEM-2S de *D. rerio*, com *primers* para a melanopsina, para os receptores de melatonina MT2 e para os genes *Cry1a*, *Cry1b*, *Cry2a*, *Cry2b*, *Cry3*, *Cry4* (Tabela I e II); como controles positivos, os *primers* para o receptor de endotelina ET_A 14F e 17B.

Tabela I. Primers utilizados para PCR de *Opn4*, MT2 e *Cry*

<i>forward primer</i>	<i>backward primer</i>	cDNA	seletividade e tamanho esperado(pb)
IPF175	IPB202	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Opn4</i> 174
IPF175	IPB191	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Opn4</i> 195
IPF175	IPB184	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Opn4</i> 377
IPF175	IPB198	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Opn4</i> 695
IPF176	IPB184	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Opn4</i> 281
IPF176	IPB198	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Opn4</i> 599
IPF156	IPB184	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Opn4</i> 204
IPF156	IPB198	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Opn4</i> 522
IPF166	IPB198	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Opn4</i> 365
IPF212	IPB198	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Opn4</i> 187
IPF180	IPB198	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Opn4</i> 141
7F	7B	ZEM-2S de <i>D.rerio</i>	MT2 196
38F	43B	ZEM-2S de <i>D.rerio</i>	<i>Cry1a</i> 246
39F	44B	ZEM-2S de <i>D.rerio</i>	<i>Cry1b</i> 175

40F	45B	ZEM-2S de <i>D.rerio</i>	<i>Cry2a</i> 150
41F	46B	ZEM-2S de <i>D.rerio</i>	<i>Cry2b</i> 203
42F	47B	ZEM-2S de <i>D.rerio</i>	<i>Cry3</i> 216
43F	48B	ZEM-2S de <i>D.rerio</i>	<i>Cry4</i> 188

Tabela II. Sequências dos *primers* utilizados nos PCRs acima mencionados

<i>Primers</i>	Sequências
IPF175	5'-CCT AGC TGT GGC TGA TTT CTT-3'
IPF176	5'-CGA GCT CTA CGC CTT CTG C-3'
IPF156	5'-TAT CGC TGC TGA TCG TTG TC-3'
IPF166	5'-GGG CTT CAG ACG TCT TGT TC-3'
IPF212	5'-GGG AAA CGC ACA AGG TGT AT-3'
IPF180	5'-GGC GAA AGT CGC TCT TGT AG-3'
IPB202	5'-CGG TCA AAG TCA TCA TCG AG-3'
IPB191	5'-GAC AAC GAT CAG CAG CGA TA-3'
IPB184	5'-TGG GGT GAA GGT CAT GTA ATC-3'
IPB198	5'-CTT GGC AAT CAC AGC AGG TA-3'
7F	5'-GCGTTTATTCTGACCTTT-3'
7B	5'-AAGAAATGGCGCAACTCACT-3'
38F	5'- TTT GCT GCA GTG TTT GGA AG - 3'
39F	5'- CCA GCA ACT CTC CTG CTA CC - 3'
40F	5'- ACC AAC AAC TGT CCC GCT AC - 3'
41F	5'- AGA GGC ATG ATG GGA AAA TG - 3'
42F	5'- GAT CAA CCA TGC AGA GAG CA - 3'
43F	5'- CCA GAG GAA CCT GGA ATT GA - 3'
43B	5'- TCC AGA TCG TAG AGC GTG TG - 3'
44B	5'- TGC AAA TGC TGG AAA CTC TG - 3'
45B	5'- CAA CAG AGC CGC TTG ATA CA - 3'
46B	5'- GGT CGC TCA AAG TTC TCC TG - 3'
47B	5'- GGT GTA GAA GGT GCG GTG AT - 3'
48B	5'- TAT GGT CTG AGC TGC CAC TG - 3'

Tabela III. Parâmetros utilizados para as reações de PCR

Reagentes (Invitrogen, CA, EUA)	vol/tubo (ul)
Água estéril	11,7
10x PCR buffer (sem Mg ²⁺)	2,5
MgCl ₂ (25mM)	1,5
dNTPs (1.25mM)	4,0
<i>forward primer</i> (10pmol/ul)	2,0
<i>backward primer</i> (10pmol/ul)	2,0
AmpliTaq Gold	0,3
cDNA	1,0

A reação de PCR iniciou-se com 6min de desnaturação a 95° C, seguidos de 35 ciclos de: 30seg de desnaturação a 95° C; 1-2min de emparelhamento a 60° C; 1min de extensão a 72° C, terminando com 1 ciclo de 10 min a 72° C.

Os produtos amplificados por PCR foram submetidos a eletroforese em mini-gel de agarose 1,2% em voltagem constante (100 volts). Após a corrida, o gel foi incubado por 30min em temperatura ambiente em solução de brometo de etídio (0,05mg/ml, Sigma Chem. Co., MO, EUA). O DNA foi visualizado através de trans-illuminador-UV, e a imagem digitalizada pelo sistema Gel Pro Image, Fotodyne Inc.

3. Clonagem e sequenciamento de *Opn4* e do receptor de melatonina

Após PCR, a banda de peso correto foi cortada do gel de agarose, passada através de ponteira de 50µL em eppendorf por centrifugação (10.000 x g, 10min) e levada para o *Department of Anatomy and Cell Biology, Uniformed Services University of Health Sciences*, em Bethesda, Maryland, EUA, onde os procedimentos a seguir foram feitos.

O filtrado foi passado por colunas Millipore para remoção de sais, ficando o DNA retido na coluna. Este foi então eluído com 18µL de água destilada e 2µL de tampão de PCR (10x). Utilizando o kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, CA, EUA), 2µL da solução acima foram adicionados a 1µL de solução salina, 2µL de água estéril e

1µL do vetor pCR II TOPO. Após incubação em temperatura ambiente por 5min, os tubos foram colocados sobre gelo e 2µL da reação adicionados ao frasco de células competentes One Shot. O conteúdo total foi espalhado em placas de agar contendo ampicilina (Quality Biological Inc., MD, EUA), nas quais X-gal 50mg/ml (Invitrogen, CA, EUA) havia sido previamente aplicada. Após 12h a 37°C, colônias brancas foram coletadas, colocadas em 3mL de LB (Quality Biological Inc., MD, EUA) contendo 3µL de canamicina 50mg/mL e incubadas por mais 12h a 37°C. A seguir procedeu-se a PCR utilizando os *primers* promotores do vetor (T7 ou SP6) para verificação da inserção do produto (o peso deve ser o peso do produto de PCR + 190). Metade do volume foi congelado em LB contendo glicerol e a outra metade submetida à purificação de DNA com kit Mini-Prep (Promega, WI, EUA). Após quantificação do DNA em espectrofotômetro, nova reação de PCR foi feita para sequenciamento, com 400 a 500ng de plasmídeo, 6,4pmol de *primer* T7, 4µL de Big Dye, completando-se o volume com água destilada para 20uL. O volume total foi a seguir passado em colunas Edge Bio, evaporado e ressuspendido em 20µL de tampão ABI para sequenciamento.

As seqüências obtidas, com o fragmento pertencente ao plasmídeo subtraído, foram submetidas a comparação no *site* da *National Center for Biotechnology Information National Library of Medicine National Institutes of Health* (www.ncbi.nlm.nih.gov), no programa BLAST, tanto por nucleotídeos como traduzidas para amino-ácidos.

4. Quantificação da expressão de RNAm para *Opn4*, *Per1*, *Clock* e *Cry1b*, em diferentes regimes de luz e na ausência ou presença de melatonina

Após semeadura em frascos de 25cm², as células permaneceram por 5 dias em regime fotoperiódico de 12C :12E, sob intensidade luminosa de 650 lux, ou em escuro constante, ou em escuro constante sob pulso de melatonina. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. No decorrer do 6º dia sob aquela condição fótica, foram retiradas amostras de frascos em duplicatas a cada 3 horas. No grupo experimental tratado com melatonina, foi aplicado o pulso de 1 h de melatonina 10⁻⁷

⁹M em ZT0 do 5º. dia.

As amostras foram submetidas à extração de RNA e RTPCR para posterior análise da expressão do RNAm para melanopsina e para *Clock*, *Per1* e *Cry1b* através de PCR em tempo real. Para estes ensaios, foram preparadas soluções contendo os *primers* (300nM para *Clock*, *Cry 1b*, *Per 1* e *Opn4* e 50nM para RNA 18S), sondas (200nM para *Clock*, *Cry 1b*, *Per 1* e melanopsina e 50nM para 18S), Supermix 2X (KCl 100mM, Tris-HCl 40mM, dNTPs 1,6mM, iTaq DNA polimerase 50U/mL e MgCl₂ 6mM, BioRad, CA, EUA) suplementado com 400µM de dNTPS, 6mM de MgCl₂ e 0,1 U/uL de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, CA, EUA), e H₂O para volume final de 29uL/poço. Essa solução foi aliquoteada (cada alíquota suficiente para 3,5 poços) em tubos, e o cDNA de cada amostra dos diferentes tratamentos descritos acima foi adicionado (3,5uL/alíquota) a um tubo. As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa de experimento (30uL/poço). Controles negativos foram incluídos rotineiramente, feitos sem cDNA.

As sequências dos *primers* e sondas utilizados estão indicadas na Tabela IV, sendo utilizado RNA 18S como normalizador (*house-keeping gene*) dos experimentos. Todos os ensaios foram realizados em um termociclador iCycler (BioRad), nas seguintes condições: 7min a 95°C seguido por 50 ciclos de 10seg a 95°C e 1min a 60°C.

A análise dos dados foi feita pela comparação entre número de cópias dos poços, 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 o valor para o gene de interesse e o valor para RNA 18S. A seguir, subtraíram-se os valores encontrados para os poços tratados da média dos poços de menor valor, obtendo-se o $\Delta\Delta C_T$. Colocando-se esse valor como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) obteve-se o número de vezes que o gene está expresso após o tratamento em questão em relação ao controle (menor valor). Os resultados foram normalizados, estabelecendo-se o número de vezes em que o gene está expresso no grupo de menor expressão no escuro constante, como correspondendo a 100% da expressão.

Para determinar os níveis de significância das possíveis diferenças entre os ZTs e aquelas induzidas pelo tratamento hormonal em relação ao controle, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por Tukey. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$. Para determinar-se a probabilidade da variação temporal ser devida a um componente circadiano, os dados foram analisados por Cosinor modificado (Cosana), (Benedito-Silva, 2003), com nível de significância de $p \leq 0,05$.

Tabela IV. Sequências dos *primers* e sondas utilizados nos ensaios de PCR quantitativo

RNA 18S	<p>Forward primer: 5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3'</p> <p>Backward primer: 5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3'</p> <p>Sonda: 5'-TexasRed-TGC TGG CAC CAG ACT TGC CCT C-BlackHole2-3'</p>
Melanopsina	<p>Forward primer: 5'-GCG ATT GTC TTC TGC CTC TGA-3'</p> <p>Backward primer: 5'-AGG GAA CTG ACA CTG GAA CCA-3'</p> <p>Sonda: 5'-6-FAM-AGT GAT TCT TGC TGG ACT GAG AGT GAG GCT-BlackHole1-3'</p>
Cry 1b	<p>Forward primer: 5'-CGT CTC TGG AGG AGC TCG G-3'</p> <p>Backward primer: 5'-TCT CCC CCG GGC CAC-3'</p> <p>Sonda: 5'-HEX-TTT GAA ACA GAG GGA CTG TCC ACT GCT G-BlackHole1-3'</p>
Per1	<p>Forward primer: 5'-AGC TCA AAC TCT CAC AGC CCT T-3'</p> <p>Backward primer: 5'-TCA GAG CTG GCA CTC AAC AGA-3'</p> <p>Sonda: 5'-Cy5-TCC ACC CAG CAG TTC TCT GGC ATA CA-BlackHole2-3'</p>
Clock	<p>Forward primer: 5'-GCAACCAGTCTACCCAGCTGAT-3'</p> <p>Backward primer: 5'-CGGTTGTGAATGTGCCTTGT-3'</p> <p>Sonda: 5'-HEX-CTCCAGGCGGCGTTTCCTCTTCA-BlackHole1- 3'</p>

RESULTADOS

1. Determinação da presença de RNAm de Opn4 e Cry (experimentos realizados em colaboração com Fernanda Pizão Farhat) e de receptor de melatonina

Determinamos a presença de RNA mensageiro de melanopsina em células embrionárias ZEM-2S por PCR (Fig. 1), o que foi confirmado por sequenciamento (Fig. 2).

Os experimentos de PCR para receptores de melatonina em cDNA de células ZEM-2S (Fig. 3) sugeriram a presença do subtipo MT2 em células ZEM-2S. Não foram identificadas bandas correspondentes ao peso esperado para MT1 ou Mel 1C. A identidade do receptor MT2 em ZEM-2S foi confirmada por sequenciamento (Fig. 4).

Determinamos ainda que, em células embrionárias ZEM-2S, os seis genes *Cry* conhecidos estão expressos (Fig. 5)

Figura 1. Fotografia do gel de agarose 1,2% contendo os produtos de PCR resultantes da utilização de diferentes *primers* para melanopsina de *Danio rerio* em cDNA de células embrionárias ZEM-2S. L corresponde ao marcador de peso molecular (DNA ladder, 100bp Promega). As setas correspondem respectivamente às bandas com *primers*: IPF175+IPB184, 377pb (linha 3); IPF176+IPB184, 281pb (linha 5) e IPF156+IPB184, 204pb (linha 7).

Melanopsina, células ZEM-2S, linha 3, 377pb

```
TTGGGCCCTCTANATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCT
GCAGAATTGCCCCCTTTGGGGTGAAGGTCATGTAATCCCAAGAACAAGACG
TCTGAAGCCCCTCAGGGACATAAGCACTCCAGCCAAAGAAAGGCGGAAG
GCTCCAACCCAGGGAGTAGAGCCACACAACGACCAACACAGCTCCAGCT
TTGCGTCGGCTTACTCTGCTTACTAGGGCGAGAGGCTGAGTTATGGCGA
GACAACGATCAGCAGCGATGGCGGTCAAAGTCATCATGGAGCAGATTCC
AAAGAGGGCACCGCAGAAGGCGGTANAGCTCGCAAGGGCGCTCGCCAAA
TACCCAGCGCCTGTGTAAACTGGCTGCAAAGAACACAGGAGACTGGGTG
ACGGACATTAANAAATCAGCCACAGCTAGGAA
```

Fig. 2. Resultado do sequenciamento de melanopsina em células ZEM-2S, feito a partir de produto amplificado com o par de *primers* IPF175 + IPB184.

Fig. 3. Fotografia de gel de agarose 1,2% contendo os produtos de PCR resultantes da utilização de diferentes *primers* para *Crys* de *Danio rerio* em cDNA de células embrionárias ZEM-2S. L corresponde ao marcador de peso molecular (DNA ladder, 1kb Promega) e as linhas 8 e 11 à ausência de cDNA. Linhas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem respectivamente aos genes *Cry1a* (246pb), *Cry1b* (175pb), *Cry2a* (150pb), *Cry2b* (203pb), *Cry3* (216pb) e *Cry4* (188pb). A linha 7 corresponde ao receptor de endotelina ETA (544pb) e a linha 10 corresponde à melanopsina (522pb), aqui presentes como controles positivos.

Fig. 4. Fotografia de gel de agarose 1,2% contendo os produtos de PCR resultantes da utilização de diferentes *primers* para receptor de melatonina de *Danio rerio* em cDNA de células embrionárias ZEM-2S. L corresponde ao marcador de peso molecular (DNA ladder, 1kb Promega) e as linhas 1 e 4 à ausência de cDNA. As setas indicam as bandas que apresentaram os tamanhos esperados para receptor MT2 em ZEM-2S (196bp, linha 3, *primers* 7F e 7B), e Mel_{1C} em melanóforos de *X. laevis* (linha 5).

Receptor de melatonina MT2, células ZEM-2S, linha 3, 196pb

```
AGAAATGGNGCAACTNACTNNGACGGNGGNGTGGNCTGNCATNANTTGTG
ACCCGCCTNCTNACGCGAAGAACCAGCACCCAAATTNTTANATNGCAGAA
GGNAACCACNGCGATNGGAAGCAGAAAATGCACNGTCACCNCTGNGATGG
NGNATNCCGCACTTGTCGTCTGACTAAAGGNGNAGGAATAAACGC
```

Fig. 5. Resultado do sequenciamento de receptor de melatonina MT2 em células ZEM-2S, feito a partir de produto amplificado com o par de *primers* 7F e 7B.

2. Respostas fóticas e ensaios hormonais por PCR quantitativo (tempo real)

2.1. Melanopsina (*Opn4*)

Quando as células ZEM-2S foram expostas ao regime de claro e escuro, a expressão de melanopsina apresentou dois picos: no início da fase de claro ZT3, e no início da fase de escuro ZT12 (Fig. 6). Estes picos foram mantidos quando as células foram submetidas a escuro constante e, curiosamente, em todos os ZTs houve aumento significativo de expressão (Fig. 7) quando comparados aos ZTs equivalentes das células submetidas a ciclo claro:escuro .

Melanopsina não apresentou ritmicidade de expressão em células ZEM-2S em nenhuma das condições (Cosana 12C:12E $R\%=37,58$; $p=0,31$, escuro constante $\%R=1,8$; $p=0,96$ e escuro com pulso de melatonina $\%R=35,30$; $p=0,34$). No entanto, há uma tendência a ritmicidade em células mantidas em 12C:12E, que desaparece em escuro constante. O pulso de melatonina aparentemente estimulou a expressão na fase de escuro subjetivo, mas sem significância estatística.

Fig. 6. PCR quantitativo da expressão do gene da melanopsina em células ZEM-2S. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 6 dias (luz acesa às 9h) a fim de sincronizar a função celular pelo ciclo claro-escuro. No 6º. dia foram retiradas células de frascos em duplicata a cada 3h. Os valores são a média (n=4 frascos), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado em escuro constante. Nesta e nas figuras seguintes, o inserto mostra as curvas resultantes das medidas experimentais e da análise pelo Cosana.

Fig. 7. PCR quantitativo da expressão do gene da melanopsina em células ZEM-2S. As células permaneceram em escuro constante durante 6 dias. No 6º. dia foram retiradas células de frascos em duplicata a cada 3h. Os valores são a média (n=4 frascos), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado em escuro constante.

Fig. 8. PCR quantitativo da expressão do gene da melanopsina em células ZEM-2S. As células permaneceram em escuro constante durante 6 dias. No 5º. dia foi aplicado um pulso de melatonina (10^{-9} M) e no 6º. dia foram retiradas células de frascos em duplicata a cada 3h. Os valores são a média (n=4 frascos), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado em escuro constante.

2.2. Clock

O RNAm de *Clock* não exibiu ritmo em células ZEM-2S mantidas em condições de 12C:12E (Fig. 9, Cosana %R=2,58; p=0,937), escuro constante (Fig. 10, Cosana %R=68,22; p=0,057), ou em escuro constante recebendo pulso de melatonina (Fig. 11, Cosinor %R=2,39; 0,941). Há, no entanto, visível tendência a aumento de expressão na escotofase e durante o escuro subjetivo, a qual é abolida pelo pulso de melatonina.

Fig. 9. PCR quantitativo da expressão do gene *Clock* em células ZEM-2S. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 6 dias (luz acesa às 9h) a fim de sincronizar a função celular pelo ciclo claro-escuro. No 6º. dia foram retiradas células de frascos em duplicata a cada 3h. Os valores são a média (n=4 frascos), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado em escuro constante.

Fig. 10. PCR quantitativo da expressão do gene *Clock* em células ZEM-2S. As células permaneceram em escuro constante durante 6 dias. No 6º. dia foram retiradas células de frascos em duplicata a cada 3h. Os valores são a média (n=4 frascos), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado em escuro constante.

Fig. 11. PCR quantitativo da expressão do gene *Clock* em células ZEM-2S. As células permaneceram em escuro constante durante 6 dias. No 5º. dia foi aplicado um pulso de melatonina (10^{-9} M) e no 6º. dia foram retiradas células de frascos em duplicata a cada 3h. Os valores são a média (n=4 frascos), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado em escuro constante.

2.3. *Per1* e *Cry 1b*

O RNAm de *Per 1* e *Cry 1b* apresentou marcada ritmicidade (Cosana %R=86,79; p=0,006 e %R=61,44; p=0,036, respectivamente) em células submetidas a fotoperíodo 12C:12E (Figs. 12 e 13). Vê-se aumento significativo 3 horas antes do início da fase de luz (ZT21), e acentuado declínio na fase de escuro.

Em escuro constante, a ritmicidade de *Per1* e *Cry1b* foi grandemente atenuada (Figs. 14 e 15, Cosana %R=75,09; p=0,029 e %R=73,38; p=0,092, respectivamente), mas persistiu. O pulso de melatonina foi ineficaz em recuperar a

amplitude da ritmicidade observada em 12C:12E, e ainda mais, aboliu a ritmicidade para ambos os genes (Figs. 16 e 17, Cosana %R=45,57; $p=0,22$ para *Per1* e %R=14,82; $p=0,67$ para *Cry1b*).

Fig. 12. PCR quantitativo da expressão do gene *Per1* em células ZEM-2S. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 6 dias (luz acesa às 9h) a fim de sincronizar a função celular pelo ciclo claro-escuro. No 6º. dia foram retiradas células de frascos em duplicata a cada 3h. Os valores são a média ($n=4$ frascos), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado em escuro constante.

Fig. 13. PCR quantitativo da expressão do gene *Cry1b* em células ZEM-2S. . As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 6 dias (luz acesa às 9h) a fim de sincronizar a função celular pelo ciclo claro-escuro. No 6º. dia foram retiradas células de frascos em duplicata a cada 3h. Os valores são a média (n=4 frascos), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado em escuro constante.

Fig. 14. PCR quantitativo da expressão do gene *Per1* em células ZEM-2S. As células permaneceram em escuro constante durante 6 dias. No 6º. dia foram retiradas células de frascos em duplicata a cada 3h. Os valores são a média (n=4 frascos), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado em escuro constante.

Fig. 15. PCR quantitativo da expressão do gene *Cry1b* em células ZEM-2S. As células permaneceram em escuro constante durante 6 dias. No 6º. dia foram retiradas células de frascos em duplicata a cada 3h. Os valores são a média (n=4 frascos), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado em escuro constante.

Fig. 16. PCR quantitativo da expressão do gene *Per1* em células ZEM-2S. As células permaneceram em escuro constante durante 6 dias. No 5º. dia aplicou-se um pulso de melatonina (10^{-9} M) e no 6º. dia foram retiradas células de frascos em duplicata a cada 3h. Os valores são a média (n=4 frascos), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado em escuro constante.

Fig. 17. PCR quantitativo da expressão do gene *Cry1b* em células ZEM-2S. As células permaneceram em escuro constante durante 6 dias. No 5º. dia aplicou-se um pulso de melatonina (10^{-9} M) e no 6º. dia foram retiradas células de frascos em duplicata a cada 3h. Os valores são a média (n=4 frascos), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado em escuro constante.

DISCUSSÃO

Tecidos periféricos e células em cultura de *Drosophila* e de *Danio rerio* são diretamente sensíveis à luz e constituem modelos de estudo de relógios circadianos periféricos (Plautz *et al.*, 1997; Vallone *et al.*, 2004; Whitmore *et al.*, 2000). Evidência experimental direta do fotopigmento responsável pela fotossensibilidade de células de *Danio rerio* ainda não foi obtida. São alguns prováveis candidatos a melanopsina (*Opn4*, Bellingham *et al.*, 2002), TMT (*teleost multiple tissue*) (Moutsaki *et al.*, 2003) e criptocromos (*Crys*, Cermakian *et al.*, 2002).

A melanopsina foi inicialmente descoberta em melanóforos dérmicos do anfíbio *Xenopus laevis*; hoje está bem estabelecido sua presença em uma subpopulação de células ganglionares da retina de todos os vertebrados, e seu papel no ajuste do relógio central de mamíferos (núcleo supraquiasmático, NSQ) ao ciclo claro:escuro (Panda *et al.*, 2002, 2003; Provencio *et al.*, 1998, 2002). Em vertebrados não mamíferos há dois genes para duas melanopsinas, a *Opn4x* homóloga à originalmente clonada de *Xenopus*, e a *Opn4m*, homóloga à única melanopsina encontrada nos mamíferos (Lucas *et al.*, 2006). Na linhagem de células embrionárias de *Danio rerio* ZEM-2S, demonstramos a expressão de RNAm de *Opn4x* e da proteína correspondente.

A regulação da expressão de melanopsina é ainda pouco conhecida, mas sabe-se que pode ser diretamente regulada por luz e escuro em células ganglionares da retina. Em hamsters dourados albinos (dados de nosso laboratório em colaboração com M. Menaker) e ratos albinos (Hannibal, 2006), a expressão da proteína melanopsina é inibida pela luz, representando uma adaptação das células ganglionares na retina (ipRGCs), durante mudanças de luminosidade do ambiente.

Na retina e glândula pineal de galinha, a transcrição de melanopsina (*Opn4x*) aumenta no final da noite subjetiva (Bailey & Cassone, 2004), o mesmo sendo observado por outros autores nos fotorreceptores de galinha (Chaurasia *et al.*, 2005). Dados de nosso laboratório (Lima *et al.*, 2007) demonstram que tanto a expressão de *Opn4x*, como a de *Opn4m* é maior no escuro subjetivo nas culturas mantidas em escuro constante e na escotofase naquelas mantidas em regime de 12C:12E. Mas, em ambos os regimes, a amplitude do ritmo foi bem maior para

Opn4m do que para *Opn4x*.

Nas células embrionárias ZEM-2S, a expressão da melanopsina *Opn4x* não apresentou ritmicidade em nenhuma das condições de iluminação, semelhantemente ao observado em retina de camundongos (dados de nosso laboratório em colaboração com I. Provencio).

Os elementos moleculares do NSQ aparecem também como componentes de relógios periféricos, mas sua ritmicidade pode variar. A expressão de *Clock* é constante no relógio central, mas pode ser rítmica em outros órgãos (Lowrey & Takahashi, 2004). Nas células ZEM-2S observamos, no entanto, ausência de ritmicidade de *Clock*, tanto em 12C:12E, quanto em escuro constante. Por outro lado, há uma evidente tendência de aumento, embora não significativo estatisticamente, durante a escotofase, semelhante ao descrito em tecidos de *Danio rerio* (Shearman *et al.*, 1999).

Em mamíferos, os genes *Per* do NSQ são os únicos ativados por luz (Albrecht *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1999), dessa forma o fotoperíodo regula a transcrição e a tradução de *Per1* em roedores (Messenger *et al.*, 1999; Sumová *et al.*, 2002; Carr *et al.*, 2003; Steinlechner *et al.*, 2002). Em camundongos, há 3 genes *Per*, todos rítmicos, mas os pulsos de luz ativam a transcrição apenas de *Per1* e *Per2* (Albrecht *et al.*, 1997; Field *et al.*, 2000; Shearman *et al.*, 2000; Takumi *et al.*, 1998; Zylka *et al.*, 1998). Em tecidos periféricos originários de animais mantidos em 12C:12E, o ritmo de *Per1* atenua-se após 2 a 7 dias em escuro constante, mas pode ser restabelecido por sincronização após troca de meio (Zylka *et al.*, 1998).

Em anfíbios, *Per 1* e *Per 3* são rítmicos e somente *Per2* é ativado por luz (Zhuang *et al.*, 2000). Em células de *Danio rerio*, há um aumento da expressão de *Per1* e *Per2* em antecipação da fase de luz, além da luz aumentar ainda mais a transcrição (Pando *et al.*, 2001). Nas células ZEM-2S, há um dramático aumento de expressão de *Per1* durante a fotofase e, semelhantemente à linhagem Z3, essas células prevêm o início da fotofase, com um grande aumento de transcrição de *Per1* nas últimas horas da escotofase. Esse ritmo mantém-se, embora menos robusto, também em condições de escuro constante.

Em *Danio rerio*, quatro genes *Cry*, *Cry1a*, *Cry1b*, *Cry2a* e *Cry2b*, apresentam

seqüência homóloga à de mamíferos (*Cry1*), e têm função semelhante, pois as proteínas inibem a transcrição mediada por CLOCK/BMAL1. *zCry3* e *zCry4* não inibem a transcrição e é provável que tenham assumido outras funções (Kobayashi *et al.*, 2000). Apesar da linhagem ZEM-2S expressar os 6 genes *Cry* como aqui demonstramos, *Cry1b* foi escolhido para análise por ser um dos dois genes *Cry* (o outro é *Cry3*) cuja expressão é mantida em células em cultura. Os outros 4 genes apresentam muito baixa expressão em células em cultura, mesmo em ciclo claro:escuro (Cermakian *et al.*, 2002).

O padrão de expressão do gene *Cry1b* na linhagem ZEM-2S foi muito semelhante ao de *Per1*: alta expressão na fotofase e antecipação da fase de luz com aumento da transcrição em ZT21. Mais uma vez, o ritmo foi atenuado em escuro constante, mas persistiu. A expressão dos genes *c-fos*, *fos-B* e *jun-B* no NSQ de mamíferos pode ser induzida por um pulso de luz durante a noite subjetiva (Kornhauser *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 1998). C-Fos associa-se à proteína Jun formando o complexo AP-1 (*activator protein 1*), que se liga a sequências TGA(C/G)TCA nos promotores de muitos genes, aumentando sua expressão (Halazonetis, *et al.*, 1988). O aumento da expressão de c-Fos parece estar envolvida na mudança de fase acarretada pela luz no relógio circadiano (Kornhauser *et al.*, 1996), através, por exemplo, do gene *zCry1a* (Hirayama *et al.*, 2005).

Presentemente pouco se sabe sobre a regulação da expressão de melanopsina ou dos genes do relógio por hormônios e neurotransmissores. Foi demonstrada oscilação rítmica do RNAm de melanopsina em ratos com retina íntegra, tanto em ciclo claro:escuro como em escuro constante. Em animais com cones e bastonetes degenerados, a expressão foi praticamente abolida (<90%), sugerindo a atuação destes fotorreceptores sobre a expressão da melanopsina (Sakamoto *et al.*, 2004). Em recente estudo neuroanatômico, foram descritas sinapses entre as células ganglionares da retina portadoras de melanopsina e as células amácrimas bipolares, indicando interação entre os fotorreceptores clássicos e o sistema fotorreceptivo baseado em melanopsina (Belenky *et al.*, 2003). Os níveis de melanopsina podem ser regulados por dopamina na retina de ratos (Sakamoto *et al.*, 2005) e de camundongos (dados de nosso laboratório), através de receptores

D2, indicando influência das células dopaminérgicas da camada amácrina sobre as células ganglionares melanopsina-positivas.

Em mamíferos, a retina percebe informação luminosa e transmite impulsos inibitórios para o NSQ. Durante a noite, liberto da inibição, o NSQ envia sinais eferentes para a glândula pineal através de elevada liberação de noradrenalina. Subsequentemente, por ativação dos receptores β 1-adrenérgicos, o AMP cíclico induz a produção de melatonina. Alta densidade de expressão de receptores para melatonina não é somente encontrada no NSQ e na *pars tuberalis* da hipófise, formando uma janela do sistema nervoso central para mediar a informação do relógio para periferia, mas também em outros tecidos (Ross *et al.*, 2002).

Melatonina endógena está relacionada ao tempo biológico e é considerada o melhor indicador de tempo circadiano também em humanos (Klerman *et al.*, 2002). Existe uma vasta literatura sobre efeitos de melatonina exógena indicando que ela não tem, no entanto, uma participação primária direta no mecanismo de tempo (Batsch & Batsch, 1997; Maestroni, 1998; Mahle *et al.*, 1997; Reiter, 2003).

Dois receptores para melatonina clonados, MT1 e MT2 (Masana & Dubocovich, 2001; Reppert *et al.*, 1995a, b), são de particular importância em respeito a ritmos fisiológicos e farmacológicos. MT1 tem importante papel na *pars tuberalis* da hipófise, controlando a variação sazonal de prolactina em ruminantes (de Riviers *et al.*, 1998; Lincon & Clarke, 1994; Williams & Morgan, 1988), e influenciando na expressão de diversos genes (Messenger *et al.*, 1999). Usando camundongos com gene nocauteado e manipulação farmacológica, foi demonstrado que o receptor para melatonina responsável pela alteração de fase do NSQ é MT2, enquanto que MT1 estaria associado com a supressão aguda da atividade elétrica do NSQ (Liu *et al.*, 1997).

Ativação do receptor MT2 para melatonina inibe a liberação de dopamina na retina (Dubocovich *et al.*, 1997), medeia respostas de vasodilatação em ratos (Doolen *et al.*, 1998), e avança a fase de ritmo circadiano determinado pela atividade em rodas de camundongos C3H/HeN (Dubocovich *et al.*, 1998).

Em fatias de NSQ de rato, melatonina aplicada tardiamente no dia subjetivo ou precocemente na noite subjetiva promove um avanço de fase no ritmo de

atividade elétrica, enquanto em outras horas do dia não apresenta efeito (McArthur *et al.*, 1991). O receptor MT2 pode ser de crítica importância para modificar respostas do relógio para outro regulador neuroquímico da fase de relógio durante o período do nascer e entardecer (Gillette & McArthur, 1996). No NSQ, a ativação do receptor MT2 leva à estimulação de fosfolipase C (PLC) gerando inositol trifosfato e diacilglicerol (DAG), o qual ativa PKC. Em suporte a esta hipótese, a ativação direta de PKC com éster de forbol induz a fase eliciada por melatonina (Mc Arthur *et al.*, 1997).

Gillette & McArthur (1996) sugerem que as janelas para ajuste de fase estariam além dos receptores de membrana, dentro da célula, em componentes da via de sinalização. As mudanças de sensibilidade *in vitro* demonstram que os relógios circadianos controlam múltiplas janelas em nível intracelular, seletivamente abertas em pontos específicos do ciclo circadiano.

Em estudo com camundongo proficientes em melatonina (C3H) e deficientes em melatonina (C57BL) revelam uma variação rítmica em retina nos níveis de proteína de *Per 1*, *Cry2* e de fosforilação de CREB em C3H mas não em C57BL. Nessa linhagem, no entanto, os níveis de RNAm de *Per1* e *Cry2* oscilam ritmicamente, indicativo de que melatonina é necessária apenas para eventos pós transcricionais de *Per1* e *Cry2*. Além disso, apresenta um papel na regulação rítmica da fosforilação do fator de transcrição CREB (Dinet *et al.*, 2007).

A expressão de *Opn4* não foi alterada por melatonina nas células ZEM-2S. O receptor para melatonina identificado em células ZEM-2S foi o MT2. A literatura indica que concentrações fisiológicas de melatonina dessensibilizam o receptor MT2 de rato, possivelmente sem afetar a sensibilidade do receptor MT1 (Gerdin *et al.*, 2004). No entanto, se houvesse dessensibilização do sistema, não teríamos a alteração do perfil de expressão de *Clock*, *Per* e *Cry1b* por melatonina nesse mesmo tipo celular. Como não investigamos os efeitos pós-transcricionais de melatonina em células ZEM-2S, pode ser que o hormônio tenha afetado a síntese protéica. Por outro lado, como pouco se sabe sobre a regulação da expressão de melanopsina por hormônios, é possível que a melatonina de fato não tenha efeito sobre o fotopigmento.

O fator de transcrição CREB liga-se especificamente a CRE e ativa a transcrição de genes quando fosforilado por PKA (Haus-Seuffert & Meisterernst, 2000). Os promotores dos genes *Per1* e *Per2* de mamíferos contêm elementos responsivos a AMPc, CREs (*cAMP-responsive elements*) (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002). *Per1* contém quatro CREs (Yamaguchi *et al.*, 2000). A ação de AMPc e MAPK sobre o promotor de *Per1* apresenta sinergismo, e precisa da integridade de CRE (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002).

CREB também medeia o efeito estimulador de Ca^{2+} sobre a expressão de *Per1*, pois além da fosforilação por PKA, CREB pode também ser fosforilado por quinases dependentes de cálcio, como a Ca^{2+} -calmodulina II e IV (Hardingham & Bading, 1998). Assim, por exemplo, em cerebelo de camundongo em cultura, a expressão de *Per1* é estimulada por Ca^{2+} e AMPc (Akiyama *et al.*, 2001).

O efeito da ativação de vias dependentes de MAPK no NSQ é bem conhecido (Obrietan *et al.*, 1998). O aumento da expressão de *Per1* em fibroblastos NIH-3T3 promovido por ésteres de forbol é dependente de MAPK (Akashi & Nishida, 2000), que é portanto ativada via PKC. Também em invertebrados, como *Drosophila*, a transcrição de genes circadianos é dependente de vias de sinalização de nucleotídeos cíclicos, Ca^{2+} e da cascata de Ras/MAPK (Weber *et al.*, 2006), semelhantemente aos relógios circadianos de mamíferos.

Na presença de melatonina, os genes *Clock*, *Per1* e *Cry1b* de células ZEM-2S perderam a expressão rítmica que ainda persistia em escuro constante. Na *pars tuberalis*, *Per1*, *Per2* e *Rev-erb- α* só são rítmicos na ausência de melatonina, que por sua vez, aumenta a expressão de *Cry* e deprime a expressão máxima dos outros genes do relógio (Johnston *et al.*, 2006), mas esses efeitos ocorrem via receptores MT1. Em NSQ de ratos e na *pars tuberalis* de ovinos, a fosforilação de CREB por agonistas é inibida por melatonina (Kopp *et al.*, 1997; McNulty *et al.*, 1994), o que poderia também estar acontecendo nas células ZEM-2S. É provável ainda que, em células ZEM-2S, a melatonina esteja ativando promotores de genes inibitórios dos genes de relógio, reprimindo dessa forma sua expressão. De qualquer forma, poderíamos interpretar que, semelhantemente a seu papel no NSQ de ratos *in vitro* (McArthur *et al.*, 1991), melatonina traz os genes de relógio para um mesmo

patamar, dessa forma reajustando o ritmo, independente da fase.

Nosso estudo traz contribuições importantes para o conhecimento da fisiologia de relógios periféricos e abre novas perspectivas para futuras investigações sobre mecanismos subjacentes a ritmos em células em cultura e sua regulação por hormônios e luz.

RESUMO

Determinamos a presença de RNA mensageiro de melanopsina em células embrionárias ZEM-2S por PCR, o que foi confirmado por sequenciamento. Os experimentos de PCR para receptores de melatonina em cDNA de células ZEM-2S sugeriram a presença do subtipo MT2 em células ZEM-2S. Não foram identificadas bandas correspondentes ao peso esperado para MT1 ou Mel 1C. A identidade do receptor MT2 em ZEM-2S foi confirmada por sequenciamento. Determinamos ainda que, em células embrionárias ZEM-2S, os seis genes *Cry* conhecidos para *Danio rerio* estão expressos.

Quando as células ZEM-2S foram expostas ao regime de claro e escuro (12C:12E), a expressão de melanopsina apresentou dois picos: no início da fase de claro ZT3, e no início da fase de escuro ZT12. Estes picos foram mantidos quando as células foram submetidas a escuro constante e, curiosamente, em todos os ZTs houve aumento significativo de expressão quando comparados aos ZTs equivalentes das células submetidas a ciclo claro:escuro. Melanopsina não apresentou ritmicidade de expressão em células ZEM-2S em nenhuma das condições. No entanto, há uma tendência a ritmicidade em células mantidas em 12C:12E, que desaparece em escuro constante. O pulso de melatonina aparentemente estimulou a expressão na fase de escuro subjetivo, mas sem significância estatística.

O RNAm de *Clock* não exibiu ritmo em células ZEM-2S mantidas em condições de 12C:12E, escuro constante, ou em escuro constante recebendo pulso de melatonina. Há no entanto visível tendência a aumento de expressão na escotofase e durante o escuro subjetivo, a qual é abolida pelo pulso de melatonina.

O RNAm de *Per 1* e *Cry 1b* apresentou marcada ritmicidade em células submetidas a fotoperíodo 12C:12E. Vê-se aumento significativo 3 horas antes do início da fase de luz (ZT21), e acentuado declínio na fase de escuro. Em escuro constante, a ritmicidade de *Per1* e *Cry1b* foi grandemente atenuada, mas persistiu. O pulso de melatonina foi ineficaz em recuperar a amplitude da ritmicidade observada em 12C:12E, e ainda mais, aboliu a ritmicidade para ambos os genes.

Após um pulso de melatonina, os genes *Clock*, *Per1* e *Cry1b* de células ZEM-2S perderam a expressão rítmica que ainda persistia em escuro constante. É provável que melatonina, semelhantemente ao observado em outras preparações, iniba a fosforilação de CREB nas células ZEM-2S, assim reduzindo a ativação dos promotores dos genes do relógio. De qualquer forma, poderíamos interpretar que a melatonina traz os genes de relógio para um mesmo patamar, dessa forma reajustando o ritmo, independente da fase.

Nosso estudo traz contribuições importantes para o conhecimento da fisiologia de relógios periféricos e abre novas perspectivas para futuras investigações sobre mecanismos subjacentes a ritmos em células isoladas e sua regulação por hormônios e luz.

ABSTRACT

The presence of melanopsin mRNA in ZEM-2S embryonic cells was determined through PCR, followed by sequencing. PCR experiments for melatonin receptors with ZEM-2S cell cDNA suggested the presence of the MT2 subtype. Bands corresponding to the expected weight for MT1 or Mel 1C were not identified. The identity of the MT2 receptor in ZEM-2S was confirmed through sequencing. We have also determined that the six *Cry* genes known in *Danio rerio* are expressed in ZEM-2S embryonic cells.

When ZEM-2S cells were submitted to a light:dark (12L:12D) cycle, melanopsin expression presented two peaks, one at the beginning of the light phase (ZT3), the other at the beginning of the dark phase (ZT12). These peaks of expression remained when the cells were kept under constant darkness, and interestingly, a significant rise in expression was found in all ZTs when compared with the corresponding ZTs of cells kept under the light:dark cycle. Melanopsin did not exhibit a rhythmic expression in ZEM-2S cells in none of the conditions. However, there is a tendency of a rhythm in cells kept under 12L:12D, which disappears under constant darkness. Melatonin pulse seems to stimulate the expression during the subjective dark phase, but without any statistical significance.

Clock mRNA did not present a rhythm in ZEM-2S cells kept either under 12L:12D, constant darkness or constant darkness with a melatonin pulse. However, there is a tendency of a rise in expression during the dark phase and during the subjective darkness, which is abolished by the melatonin pulse.

Per 1 and *Cry 1b* mRNAs presented a robust rhythmicity in cells kept under 12L:12D. There is a significant rise three hours before the beginning of the light phase (ZT21), and sharp fall during the dark phase. Under constant darkness, *Per1* and *Cry1b* rhythmicity, although present, was greatly attenuated. Melatonin pulse was not able to recover the amplitude observed under 12L:12D, moreover, it abolished rhythmicity of both genes.

After melatonin pulse, *Clock*, *Per1* and *Cry1b* genes in ZEM-2S cells lost the rhythmic expression, which still persisted under constant darkness. It is possible that

melatonin, as observed in other preparations, inhibits the phosphorylation of CREB in ZEM-2S cells, reducing the activation of the clock genes promoters. Anyway, one could interpret that melatonin brings the clock genes to the same level, therefore resetting the rhythm, independently of the phase.

This study brings important contributions to the understanding of peripheral clock physiology and opens new perspectives for future investigations of the underlying mechanisms of rhythms in isolated cells and their regulation by hormones and light.

CONCLUSÕES

- Células ZEM 2S expressam melanopsina *Opn4*, e os genes de relógio *Clock*, *Per1*, *Cry 1a*, *Cry1b*, *Cry2a*, *Cry2b*, *Cry3* e *Cry4*.
- Foi determinada ainda a presença de RNA mensageiro do receptor para melatonina do subtipo MT2.
- *Opn4* não apresenta ritmo em células submetidas a 12C:12E, escuro constante ou escuro constante com pulso de melatonina.
- *Clock* não apresenta ritmo em nenhuma das condições acima, mas há uma tendência a um aumento de expressão durante o escuro subjetivo, a qual é abolida pelo pulso de melatonina.
- *Per1* e *Cry1b* exibem robusta ritmicidade em células submetidas a 12C:12E; em células mantidas em escuro constante, este ritmo é atenuado, mas ainda significativo. O pulso de melatonina abole a ritmicidade de *Per1* e *Cry1b* em células mantidas em escuro constante.
- Células Zem-2S constituem relógios, pois apresentam intrínseca ritmicidade de genes de relógio quando mantidas em condições constantes de iluminação.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, K., Robison, G.A., Liddle, G.W., Butcher, R.W., Nicholson, W.E. & Baird, C.E. 1969. Role of cyclic AMP in mediating the effects of MSH, norepinephrine, and melatonin on frog skin color. **Endocrinology**, **85**: 674–682.
- Abe, M., Herzog, E.D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M. & Block, G.D. 2002. Circadian rhythms in isolated brain regions. **J. Neurosci.**, **22**: 350-356.
- Abrahamson, E.E. & Moore, R.Y. 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. **Brain Res.**, **916**:172-191.
- Akashi, E. & Nishida, E. 2000. Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. **Genes Dev.**, **14**: 645-49.
- Albrecht, U. & Eichele, G. 2003. The mammalian circadian clock. **Cur. Opin. Gen. Dev.**, **13**: 271-277.
- Allada, R.; Emery, P.; Takahashi, J.S. & Rosbash, M. 2001. Stopping time: the genetics of fly and mouse circadian clocks. **Annu. Rev. Neurosci.**, **24**: 1091-1119.
- Almeida-Paula, L.D., Costa-Lotufo, L.V., Ferreira, Z.S., Amanda Elisa G. Monteiro, A.E., Isoldi, M.C., Godinho, R.O. & Markus, R.P. 2005. Melatonin modulates rat myotube-acetylcholine receptors by inhibiting calmodulin. **Eur. J. Pharmacol.**, **525**: 24–31.
- Arendt, D. 2003. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. **Int. J. Develop. Biol.**, **47**: 563-571.
- Arendt, D., Tessmar-Raible, K., Snyderman, H., Dorresteyn, A.W. & Wittbrodt, J. 2004, Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. **Science**, **306**: 869-871.
- Armstrong, S. M. 1989. Melatonin and circadian control in mammals. **Experientia**, **45**: 932-938.
- Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Schutz, G. & Schibler, U. 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. **Science**, **289**: 2344-47.
- Balsalobre, A. Damiola, F. & Schibler, U.A. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. **Cell**, **93**: 929-37.
- Bartell, P.A., Miranda-Anaya, M. & Menaker, M. 2004. Period and phase control in a multioscillatory circadian system (*Iguana iguana*). **J. Biol. Rhythms**, **19**: 47-57.
- Bellingham, J., Whitmore, D., Philp, A.R., Wells, D.J. & Foster, R.G. 2002. Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localisation and phylogenetic position. **Brain Res. Mol.**

Brain Res., **107**: 128-136.

- Benedito-Silva, A.A. 2003. Aspectos metodológicos da cronobiologia. In: Marques, N. & Menna-Barreto, L.S. (eds.) **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**, 3ª. Ed., EDUSP: 297-320.
- Berson, D.M., Dunn, F.A. & Takao, M. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. **Science**, **295**: 1070-1073.
- Besharse, J.C. & Iuvone, P.M. 1983. Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. **Nature**, **305**: 133-135.
- Blackshaw, S. & Snyder, S.H. 1997. Parapinopsin, a novel catfish opsin localized to the parapineal organ, defines a new gene family. **J. Neurosci.**, **17**: 8083-8092.
- Blackshaw, S. & Snyder, S.H. 1999. Encephalopsin: a novel mammalian extraretinal opsin discretely localized in the brain. **J. Neurosci.**, **19**: 3681-3690.
- Brydon, L., Roka, F., Petit, L., Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P.J., Nanoff, C., Strosberg, A.D. & Jockers, R. 1999. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. **Mol. Endocrinol.**, **13**: 2025-2038.
- Cahill, G.M. 2001. Circadian organization in fish and amphibians. In: Kumar, V. (ed.) **Biological Rythms**, New Delhi: Narosa: 125-133.
- Carlson, L.L., Weaver, D.R. & Reppert, S.M. 1989. Melatonin signal transduction in hamster brain: inhibition of adenylyl cyclase by a pertussis toxin-sensitive G-protein. **Endocrinology**, **125**: 2670-2676.
- Carr, A.J.F. & Whitmore, D. 2005. Imaging of single light-responsive clock reveals fluctuating free-running periods. **Nature Cell Biol.**, **7**: 319-321.
- Ceriani, M.F.; Darlington, T.K.; Staknis, D.; Mas, P.; Petti, A.A.; Weitz, C.J. & Kay, S.A. 1999. Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. **Science**, **285**: 553-556.
- Cermakian, N., Pando, M.P., Thompson, C.L., Pinchak, A.B., Selby, C.P., Gutierrez, L., Ewlls, D.E., Cahill, G.M., Sancar, A. & Sassone-Corsi, P. 2002. Light induction of a vertebrate clock gene involves signaling through blue-light receptors and MAP kinases. **Curr. Biol.**, **12**: 844-848.
- Chaurasia, S.S., Rollag, M.D., Jiang, G., Hayes, W.P., Haque, R., Natesan, A., Zatz, M., Tosini, G., Liu, C., Korf, H.W., Iuvone, P.M. & Provencio, I. 2005. Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (OPN4): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types. **J. Neurochem.**, **92**: 158-170.
- Cipolla Neto, J. & Afeche, S. C. 1999. Glândula pineal. In: Aires, M.M. (Coord.). **Fisiologia**.

Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan: 805-811.

- Collin, J.P., Voisin, P., Falcón, J., Faure, J.P., Brisson, P. & Defaye, J.R. 1989. Pineal transducers in the course of evolution: molecular organization, rhythmic metabolic activity and role. **Arch. Histol. Cytol.**, **52**: 441-449.
- Contin, M.A., Verra, D.M. & Guido, M.E. 2006. An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells. **FASEB J.**, **20**: 2648-2650.
- Costa, A., Castanon-Cervantes, O., Menaker, M., Piccione, G. & Caola, G. 2005. Daily rhythm of lactate dehydrogenase in the rat (*Rattus norvegicus*) carrying a *Per1*-luciferase transgene: assessment on serum and liver. **Vet. Res. Commun.**, **29** suppl. 2: 183-186
- Davidson, A.J., London, B., Block G.D. & Menaker, M. 2005. Cardiovascular tissues contain independent circadian clocks. **Clin. Exp. Hypertens.**, **27**: 307-311.
- Deulnay, F., Thisse, C., Marchand, O., Laudet, V. & Thisse, B. 2000. An inherited functional circadian clock in Zebrafish embryos. **Science**, **289**: 297-300.
- Dinet, V., Ansari, N., Torres-Farfan, C. & Korf, H.W. 2007. Clock gene expression in the retina of melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. **J. Pineal Res.**, **42**: 83–91
- Doolen, S., Krause, D.N., Dubocovich, M.L. & Duckles, S.P. 1998. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, **345**: 67–69.
- Drivenes, O., Soviknes, A.M., Ebbesson, L.O., Fjose, A., Seo, H.C. & Helvik, J.V. 2003. Isolation and characterization of two teleost melanopsin genes and their differential expression within the inner retina and brain. **J. Comp. Neurol.**, **456**: 84-93.
- Dubocovich, M.L., Masana, M.I., Iacob, S. & Sauri, D.M. 1997. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, **355**: 365–375.
- Dubocovich, M.L., Yun, K., Al-Ghoul, W.M., Benloucif, S. & Masana, M.I. 1998. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. **FASEB J.**, **12**: 1211–1220.
- Dunlap, J.C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. **Cell**, **96**: 271-290.
- Emery, P., So, W.V., Kaneko, M., Hall, J.C. & Rosbash, M. 1998. CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting

- and photosensitivity. **Cell**, **95**: 669-79.
- Erlich, S.S. & Apuzzo, M.L.J. 1985. The pineal gland: anatomy, physiology and clinical significance. **J. Neurosurg.**, **63**: 321-341.
- Fernald, R.D. 2004. Evolving eyes. **Int. J. Dev. Biol.**, **48**: 701-705.
- Filipek, S., Teller, D.C., Palczewski, K. & Stenkamp, R. 2003. The crystallographic model of rhodopsin and its use in studies of other G protein-coupled receptors. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, **32**: 375-397.
- Freedman, M.S., Lucas, R.J., Soni, B., von Schantz, M., Munoz, M., David-Gray, Z. & Foster, R. 1999. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone ocular photoreceptors. **Science**, **284**: 502-504.
- Gall, C. von, Duffield, G., Hastings, M., Kopp, M.D.A., Dehghani, F., Korf, H.W. & Stehle, J.H. 1998. CREB in the mouse SCN: a molecular integrator coding the phase adjusting stimuli of light, glutamate, PACAP and melatonin for clockwork access. **J. Neurosci.**, **18**: 10389–10397.
- Gall, C. von, Weaver, D.R., Kock, M., Korf, H.W. & Stehle, J.H. 2000. Melatonin limits transcriptional impact of phosphoCREB in the mouse SCN via the Mel1a receptor. **Neuroreport**, **11**: 1803–1807.
- Garger, A.V., Richard, E.A. & Lisman, J.E. 2004. The excitation cascade of *Limulus* ventral photoreceptors: guanylate cyclase as the link between InsP₃-mediated Ca²⁺ release and the opening of cGMP-gated channels. **BMC Neuroscience**, **5**: 7.
- Gehring, W.J. 2001. The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. **Zoology (Jena)**, **104**: 171-183.
- Gerdin, M.J., Masana, M.I. & Dubocovich, M.L. 2004. Melatonin-mediated regulation of human MT1 melatonin receptors expressed in mammalian cells. **Biochem. Pharmacol.**, **67**: 2023–2030.
- Gerdin, M.J., Masana, M.I., Ren, D., Miller, R.J. & Dubocovich, M.L. 2003. Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **304**: 931–939.
- Gilad, E., Wong, H.R., Zingarelli, B., Virág, L., O'Connor, M., Salzman, A. & Szabó, C. 1998. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophage: role of inhibition of NFkappaB activation. **FASEB J.**, **12**: 685-6893.
- Gillette, M.U. 1996. Regulation of entrainment pathways by the suprachiasmatic circadian clock: sensitivities to second messengers. *In*: Buijs, R., Romjin, H., Pennartz, C. &

- Mirmiran, M. (eds.). **Hypothalamic Integration of Circadian Rhythms, Progress in Brain Research**, Amsterdam: Elsevier, vol. 111: 119–130.
- Gillette, M.U., Medanic, M., McArthur, A.J., Liu, C., Ding, J.M., Faiman, L.E., Weber, E.T., Tchong, T.K. & Gallman, E.A. 1995. Intrinsic neuronal rhythms in the suprachiasmatic nuclei and their adjustment. **Ciba Found. Symp.**, **183**: 134-144.
- Gillette, M.U. & McArthur, A.J. 1996. Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. **Behav. Brain Res.**, **73(1-2)**:135-139.
- Glossop, N.R., Lyons, L.C. & Hardin, P.E. 1999. Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. **Science**, **286**: 768-771.
- Hall, J. & Rosbash, M., 1988. Mutations and molecular mechanisms of biological rhythms. **Annu. Ver. Neurosci.**, **11**: 373-393.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M. & Yau, K.W. 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. **Science**, **295**: 1065-1070.
- Hill, C.A., Fox, A.N., Pitts, R.J., Kent, L.B., Tan, P.L., Chrystal, M.A., Cravchik, A., Collins, F.H., Robertson, H.M. & Zwiebel, L.J. 2002. G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. **Science**, **298**: 176-178.
- Hunt, A.E., Al-Ghoul, W.M., Gillette, M.U. & Dubocovich, M.L. 2001. Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. **Am. J. Physiol.**, **280**: C110–C118.
- Isoldi, M.C., Rollag, M.D., Castrucci, A.M. & Provencio, I. 2005. Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **102**: 1217-1221.
- Jiang, M., Pandey, S. & Fong, H.K. 1993. An opsin homologue in the retina and pigment epithelium. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **34**: 3669-3678.
- King, D.P. & Takahashi, J.S. 2000. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. **Annu. Rev. Neurosci.**, **23**: 713-742.
- Kobayashi, Y., Ishikawa, T., Hirayama, J., Daiyasu, H., Kanai, S., Toh, H., Fukuda, I., Tsujimura, T., Terada, N. & Kamei, Y. 2000. Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. **Genes Cells**, **5**: 725-38.
- Kopp, M., Meissl, H. & Korf, H.W. 1997. 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.
- Koyanagi, M., Kawano, E., Kinugawa, Y., Oishi, T., Shichida, Y., Tamotsu, S. & Terakita, A. 2004. Bistable UV pigment in the lamprey pineal. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **101**: 6687-6691.
- Kumbalasiri, T., Rollag, M.D., Isoldi, M., Castrucci, A.M.L. & Provencio, I. 2006. Melanopsin triggers the release of internal calcium stores in response to light. **Photochem. Photobiol.**, **83**: 273-279.
- Kusakabe, T., Kusakabe, R., Kawakami, I., Satou, Y., Satoh, N. & Tsuda, M. 2001. Ci-opsin1, a vertebrate-type opsin gene, expressed in the larval ocellus of the ascidian *Ciona intestinalis*. **FEBS Lett.**, **506**: 69-72. Erratum in: *FEBS Lett* 2001, 508, 162.
- Lima, L.H.R.G., Scarparo, A.C., Isoldi, M.C., Visconti, M.A., and Castrucci, A.M.L., 2006. Melanopsin in chicken melanocytes and retina. **Biological Rhythm Res.**, **37**: 393-404.
- Liu, C., Weaver, D.R., Jin, X., Shearman, L.P., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K. & Reppert, S.M. 1997. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. **Neuron**, **19**: 91–102.
- Lopes, P.F., Marques, N. Pinto, E. & Colepicolo, P. 2003. Organização celular e molecular dos ritmos biológicos *In*: Marques, N. & Menna-Barreto, L.S. (eds.) **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. São Paulo: EDUSP: 223-245.
- Loros, J.J. & Dunlap, J.C. 2001. Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*. **Annu. Rev. Physiol.**, **63**: 757-794.
- Lucas, R.J., Freedman, M.S., Munoz, M., Garcia-Fernandez, J.M. & Foster, R.G. 1999. Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone ocular photoreceptors **Science**, **284**: 505-507.
- MacKenzie, R.S., Melan, M.A., Passey, D.K. & Witt-Enderby, P.A. 2002. Dual coupling of MT1 and MT2 melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation after melatonin exposure. **Biochem. Pharmacol.**, **63**: 587–595.
- Marques, M.D., Golombek, D. & Moreno, C. 1999. Adaptação Temporal. *In*: Marques, N. & Menna-Barreto, L.S. (eds.) **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. São Paulo: EDUSP: 45-84.
- Max, M., McKinnon, P.J., Seidenman, K.J., Barrett, R.K., Applebury, M.L., Takahashi, J.S. & Margolskee, R.F. 1995. Pineal opsin: a nonvisual opsin expressed in chick pineal. **Science**, **267**: 1502-1506.

- McArthur, A.J., Gillette, M.U. & Prosser, R.A. 1991. Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock *in vitro*. **Brain Res.**, **565**: 158–161.
- McArthur, A.J., Hunt, A.E. & Gillette, M.U. 1997. Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. **Endocrinology**, **138**: 627–634.
- McNamara, P., Seo, S.P., Rudic, R.D., Sehgal, A., Chakravarti, D. & Fitzgerald, G.A. 2001. Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. **Cell**, **105**: 877–889.
- McNulty, S., Ross, A.W., Barrett, P., Hastings, M.H. & Morgan, P.J. 1994. Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine *pars tuberalis*. **J. Neuroendocrinol.**, **6**: 523–532.
- Moore, R.Y., Speth, J.C. & Card, J.P. 1995. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of ganglion cells. **J. Comp. Neurol.**, **352**: 351–366.
- Moore, R.Y. & Klein, D.C. 1974. Visual pathways and the central neural control of rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. **Brain Res.**, **71**: 17–33.
- Morgan, P.J., Barrett, P., Hazlerigg, D., Milligan, G., Lawson, W., MacLean, A. & Davidson, G. 1995. Melatonin receptors couple through a cholera toxin-sensitive mechanism to inhibit cyclic AMP in the ovine pituitary. **J. Neuroendocrinol.**, **7**: 361–369.
- Morgan, P.J., Lawson, W., Davidson, G. & Howell, H.E. 1989. Melatonin inhibits cyclic AMP in cultured ovine *pars tuberalis* cells. **J. Mol. Endocrinol.**, **5**: R3–R8.
- Moutsaki, P., Whitmore, D., Bellingham, J., Sakamoto, K., David-Gray, Z.K. & Foster, R.G. 2003. Teleost multiple tissue (tmt) opsin: a candidate photopigment regulating the peripheral clocks of zebrafish. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, **112**: 135–145.
- Nakagawa, M., Iwasa, T., Kikkawa, S., Tsuda, M. & Ebrey, T.G. 1999. How vertebrate and invertebrate visual pigments differ in their mechanism of photoactivation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **96**: 6189–6192.
- Nelson, R.J. & Zucker, I. 1981. Photoperiodic control of reproduction in olfactory-bulbectomized rats. **Neuroendocrinology**, **32**: 266–271.
- Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon, F., Fauchere, J.L., Delagrangue, P., Canet, E. & Boutin, J.A. 2000. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. **J. Biol. Chem.**, **275**: 31311–31317.
- Okamura, H., Yamaguchi, S. & Yagita, K. 2002. Molecular machinery of the mammalian circadian clock. **Cell Tissue Res.**, **309**: 47–56.
- Okano, T., Yoshizawa, T. & Fukada, Y. 1994. Biogenesis of blowfly photoreceptor

- membranes is regulated by 11-cis-retinal. **Nature**, **372**: 94-97.
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D.C., Pires, S.S., Rollag, M.D., Castrucci, A.M., Pletcher, M.T., Sato, T.K., Wiltshire, T., Andahazy, M., Kay, S.A., Van Gelder, R.N. & Hogenesch, J.B. 2003. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. **Science**, **301**: 525-527.
- Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I. & Kay, S.A. 2002. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. **Science**, **298**: 2213-2216.
- Pando, M.P., Pinchak, A.B., Cermakian, N. & Sassone-Corsi, P. 2001. A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **98**: 10178-10183.
- Paulsen, R. & Schwemer, J. 1983. Biogenesis of blowfly photoreceptor membranes is regulated by 11-cis-retinal. **Eur. J. Biochem.**, **137**: 609-614.
- Petit, L., Lacroix, I., Coppet, P., Strosberg, A.D. & Jockers, R. 1999. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. **Biochem. Pharmacol.**, **58**: 633-639.
- Pickard, G.E., Smeraski, C.A., Tomlinson, C.C., Banfield, B.W., Kaufman, J., Wilcox, C.L., Enquist, L.W. & Sollars, P.J. 2002. Intravitreal injection of attenuated pseudorabies virus PRV Bartha results in infection of the hamster suprachiasmatic nucleus only by retrograde transsynaptic transport via autonomic circuits. **J. Neurosci.**, **2**: 2701-2710.
- Poon, A.M., Liu, Z., Pang, C.S., Brown, G.M. & Pang, S.F. 1994. Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. **Biol. Signals**, **3**: 107-117.
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W.J., Hayes, W.P. & Rollag, M.D. 1998. Melanopsin: an opsin in melanophores, brain and eye. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**: 340-345.
- Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, E.F. & Rollag, M.D. 2000. A novel human opsin in the inner retina. **J. Neurosci.**, **20**: 600-605.
- Provencio, I., Rollag, M.D. & Castrucci, A.M. 2002. Photoreceptive net in the mammalian retina. **Nature**, **415**: 493.
- Qiu, X., Kumbalasiri, T., Carlson, S.M., Wong, K.Y., Krishna, V., Provencio, I. & Berson, D.M. 2005. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin **Nature**, **433**: 745-749.
- Reiter, R.J., 1991. Pineal melatonin: cell biology of its physiological entrainment by melatonin. **Science**, **219**: 1089-1091.
- Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slangenhuot, S.A. & Gusella, J.F.

- 1995b. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**: 8734-8738.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R. & Ebisawa, T. 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. **Neuron**, **13**: 1177–1185.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R. & Godson, C. 1996. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends Pharmacol.**, **17**: 100-102.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Cassone, V.M., Godson, C. & Kolakowski, L.F. Jr. 1995a. Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. **Neuron**, **15**: 1003–1015.
- Roka, F., Brydon, L., Waldhoer, M., Strosberg, A.D., Freissmuth, M., Jockers, R. & Nanoff, C. 1999. Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. **Mol. Pharmacol.**, **56**: 1014–1024.
- Schwemer, J. & Langer, H. 1982. Insect visual pigments. **Methods Enzymol.**, **81**: 182-190.
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Reppert, S.M. & Weaver, D.R. 1999. Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. **Neuroscience**, **89**: 387-97.
- Shin, J., Richard, E.A. & Lisman, J.E. 1993. Ca^{2+} is an obligatory intermediate in the excitation cascade of limulus photoreceptors. **Neuron**, **11**: 845-855.
- Sollars, P.J., Smeraski, C.A., Kaufman, J.D., Ogilvie, M.D., Provencio, I. & Pickard, G.E. 2003. Melanopsin and non-melanopsin expressing retinal ganglion cells innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus. **Vis. Neurosci.**, **20**: 601-610.
- Soni, B.G. & Foster, R.G. 1997. A novel and ancient vertebrate opsin. **FEBS Lett.**, **406**: 279-283.
- Stanewsky, R. 2002. Clock mechanisms in *Drosophila*. **Cell Tissue Res.**, **309**: 11-26.
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S.A., Rosbash, M. & Hall, J.C. 1998. The Cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. **Cell**, **95**: 681-92.
- Sun, H., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. & Nathans, J. 1997. Peropsin, a novel visual pigment-like protein located in the apical microvilli of the retinal pigment epithelium. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 9893-9398.
- Takahashi, J.S. 1995. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. **Rev. Neurosci.**, **18**: 531-553.

- Tam, C.W., Mo, C.W., Yao, K.-M. & Stephen, Y.W. 2007. 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.
- Taniguchi, Y., Hisatomi, O., Yoshida, M. & Tokunaga, F. 2001. Pinopsin expressed in the retinal photoreceptors of a diurnal gecko. **FEBS Lett.**, **496**: 69-74.
- Tartelin, E.E., Bellingham, J., Hankins, M.W., Foster, R.G. & Lucas, R.J. 2003. Neuropsin (Opn5): a novel opsin identified in mammalian neural tissue. **FEBS Lett.**, **554**: 410-416.
- Terazono, H., Mutoh, T., Yamaguchi, S., Kobayashi, M., Akiyama, M., Udo, R., Ohdo, S., Okamura, H. & Shibata, S. 2003. Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **100**: 6795-800.
- Tu, D.C., Zhang, D., Demas, J., Slutsky, E.B., Provencio, I., Holy, T.E. & Van Gelder, R.N. 2005. Physiologic diversity and development of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. **Neuron**, **48**: 987-989.
- Vanecek, J. 1998. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol. Rev.**, **78**: 687–721.
- Vanecek, J. & Vollrath, L. 1989. Melatonin inhibits cyclic AMP and cyclic GMP accumulation in the rat pituitary. **Brain Res.**, **505**: 157–159.
- White, B.H., Sekuda, R.D. & Rollag, M.D. 1987. Pertussis toxin blocks melatonin-induced pigment aggregation in dermal melanophores. **J. Comp. Physiol. [B]**, **157**: 153–157.
- Whitmore, D., Foulkes, N.S., Strahle, U. & Sassone-corsi, P. 1998. Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. **Nature Neurosci.**, **1**: 701-707.
- Whitmore, D.; Foulkes, N.S. & Sassone-Corsi, P. 2000. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. **Nature**, **408**: 81-91.
- Wright, M.L., Cuthbert, K.L., Donohue, M.J., Solano, S.D. & Proctor, K.L. 2000. Direct influence of melatonin on the thyroid and comparison with prolactin. **J. Exp. Zool.**, **12**: 625-631.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M. & Tei, H. 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. **Science**, **288**: 682-85.
- Yau, K.W. & Baylor, D.A. 1989. Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. **Annu. Rev. Neurosci.**, **12**: 289-237.
- Yokoyama, S. & Zhang, H. 1997. Cloning and characterization of the pineal gland-specific opsin gene of marine lamprey (*Petromyzon marinus*). **Gene**, **202**: 89-93.

- Yong, M.W. & Kay, S.A. 2001. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. **Nature Rev. Genet.**, **2**: 702-15.
- Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepka, S.M., Hong, H.-K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M. & Takahashi, J.S. 2004. Period2::Luciferase real time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **101**: 5339-5346.
- Zhuang, M., Wang, Y., Steenhard, B.M. & Besharse, J.C. 2000. Differential regulation of two period genes in the *Xenopus* eye. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, **82**: 52-64.