UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS-DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

RAFAEL BENJAMIN ARAÚJO DIAS

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DO RELÓGIO POR
GLUTAMATO NA RETINA DE *Gallus gallus***

Modulation of clock genes expression by glutamate in the retina of
Gallus gallus

São Paulo

2014

RAFAEL BENJAMIN ARAÚJO DIAS

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DO RELÓGIO POR
GLUTAMATO NA RETINA DE *Gallus gallus***

Modulation of clock genes expression by glutamate in the retina of
Gallus gallus

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

Orientador(a): Prof^a Dr^a Ana Maria de Lauro
Castrucci

São Paulo
2014

Dias, Rafael Benjamin Araújo

Modulação da expressão dos genes do relógio por glutamato na retina de *gallusgallus* / Rafael Benjamin Araújo Dias ; orientadora Ana Maria de Lauro Castrucci. -- São Paulo, 2014.

78f.

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

1. Expressão dos genes de relógio. 2. Células de retina de *gallusgallus*.
3. Sistema glutamatérgico. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

Nome: Dias, Rafael Benjamin Araújo Dias

Título: Modulação da expressão dos genes do relógio por glutamato na retina de *Gallus gallus*.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr(a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci

Orientadora

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

À minha família sem a qual
nenhum passo dado ao longo
desta longa trajetória teria sido
possível

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e companhia ao longo desse caminho.

Aos Meus pais, Pedro e Rita, que representam o meu porto-seguro. Abriram mão de seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus e souberam entender que esse período de distância era necessário para o meu crescimento e amadurecimento e me ensinaram a importância e o valor do conhecimento.

À Minha irmã, Ana Flávia, que acompanhou de perto toda minha trajetória educacional sempre disposta a me ouvir e me aconselhar nos momentos fáceis e difíceis de minha vida.

À Minha irmã, Natália, pela paciência em ouvir minhas queixas e dúvidas e ser tão complacente e condescendente nas minhas interpelações.

À Minha família paulistana. Conceitualmente, um conjunto de pessoas reunidas ao acaso em um “nicho” comum e interligados por uma relação que miscigena, muitas vezes, amor e ódio. A escolha dessa família, muitas vezes, se encontra repousada na escuridão do desconhecido e principalmente na esperança de um duradouro bem-estar coletivo. No meu caso confesso que só tenho a agradecer a essa loteria esportiva familiar. Personalizadamente, cada um, ou melhor, cada “uma” vivenciou comigo cada passo desse e de vários caminhos. Com quem eu pude rir as maiores alegrias e que choraram comigo as maiores dores: Ana Clara sempre disposta a ajudar e me mostrar o quanto sou capaz mesmo quando nem mesmo eu acreditava. Danielle com quem pude contar sempre com uma palavra no momento em que tudo parecia perdido. Patrícia que com sua doçura e meiguice pude dividir várias insatisfações e sempre me mostrava que esse não era um “privilegio” só meu.

À Minha grande amiga Maria Nathalia pra quem o universo das palavras limita o real significado desse agradecimento. Esteve e está presente comigo literalmente em todos os momentos. Que ouviu minhas reclamações, que me acalentou nos momentos de desespero, que enxugou minhas lágrimas quando elas insistiam em rolar. Mostrou-me que eu podia o que eu quisesse e que me encoraja a prosseguir.

À Professora Dr^a Ana Mara de Lauro Castrucci pela orientação, pela oportunidade e confiança.

À professora e amiga Maristela Poletini pelas infindáveis conversas e aconselhamentos nos momentos de dúvida e insegurança.

Aos amigos do laboratório: Jennifer Caroline de Sousa , Thiago Verbena, Nathana Mezzalira, Leonardo Henrique e Bruno César por toda a ajuda e trabalho em conjunto que possibilitaram chegar ao fim dessa jornada.

Ao Técnico Marcio Patto por toda a assistência técnica prestada.

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, no qual este trabalho foi desenvolvido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa, sem a qual este projeto não poderia ter sido desenvolvido.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1- INTRODUÇÃO	14
1.1 – O TEMPO E A HISTÓRIA.....	14
1.2 – BASES MOLECULARES DOS RELÓGIOS BIOLÓGICOS	15
1.3 - LUZ E OS CICLOS CLARO/ESCURO.....	15
1.4 - FOTOTRANSDUÇÃO.....	18
1.5 - RECEPTORES DE GLUTAMATO.....	21
1.5.1 - RECEPTORES IONOTRÓPICOS.....	22
1.5.2 - RECEPTORES METABOTRÓPICOS.....	26
1.6 - SINALIZAÇÃO DA INFORMAÇÃO FÓTICA NO NÚCLEO SUPRAQUÍASMÁTICO.....	27
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1 - MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS	31
2.2 - PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	32
Protocolo A – Um pulso de glutamato por 12 horas em escuro constante.....	32
Protocolo B - Três pulsos de glutamato por 6 horas em escuro constante.....	32
Protocolo C - Três pulsos de glutamato por 12 horas em escuro constante.....	33
2.3 - EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL, RT-PCR.....	34
2.4- PCR QUANTITATIVO.....	35
2.5 - ANÁLISE DOS RESULTADOS	37
3 - RESULTADOS.....	39

3.1 - QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE RNAM DO GENE <i>CLOCK</i> EM CÉLULAS SUBMETIDAS A TROCAS DE MEIO E PULSOS DE GLUTAMATO.....	39
3.2 - QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE RNAM DO GENE <i>PER2</i> EM CÉLULAS SUBMETIDAS A TROCAS DE MEIO E PULSOS DE GLUTAMATO..	45
3.3 - QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE RNAM DO GENE <i>BMAL1</i> EM CÉLULAS SUBMETIDAS A TROCAS DE MEIO E PULSOS DE GLUTAMATO..	51
3.4 - COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS COM DUAS TROCAS DE MEIO DE 12H X SEIS TROCAS DE MEIO POR 6H X SEIS TROCAS DE MEIO POR 12H.....	57
3.5 - COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS COM UM PULSO DE GLUTAMATO DE 12H X TRÊS PULSOS DE GLUTAMATO POR 6H X TRÊS PULSOS DE GLUTAMATO POR 12H.....	58
4 - DISCUSSÃO.....	63
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos primers e probes para os ensaios de PCR quantitativo.....36

Tabela 2: Efeito das trocas de meio.....56

Tabela 3: Efeito dos pulsos de glutamato.....57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos receptores ionotrópicos de glutamato.....	22
Figura 2 – Esquema do mecanismo de transdução em neurônios do núcleo supraquiasmático.....	29
Figura 3 - Esquema do protocolo experimental A.....	31
Figura 4 - Esquema do protocolo experimental B.....	32
Figura 5 - Esquema do protocolo experimental C.....	33
Figura 6 - PCR quantitativo do gene <i>Clock</i> duas trocas de meio por 12h x 1 pulso de glutamato por 12h.....	39
Figura 7 - PCR quantitativo do gene <i>Clock</i> seis trocas de meio por 6h x 3 pulsos de glutamato por 6h.....	41
Figura 8 - PCR quantitativo do gene <i>Clock</i> seis trocas de meio por 12h x 3 pulsos de glutamato por 12h.....	43
Figura 9 - PCR quantitativo do gene <i>Per2</i> duas trocas de meio por 12h x 1 pulso de glutamato por 12h.....	45
Figura 10 - PCR quantitativo do gene <i>Per2</i> seis trocas de meio por 6h x 3 pulsos de glutamato por 6h.....	47
Figura 11 - PCR quantitativo do gene <i>Per2</i> seis trocas de meio por 12h x 3 pulsos de glutamato por 12h.....	49
Figura 12 - PCR quantitativo do gene <i>Bmal1</i> duas trocas de meio por 12h x 1 pulso de glutamato por 12h.....	51
Figura 13 - PCR quantitativo do gene <i>Bmal1</i> seis trocas de meio por 6h x 3 pulsos de glutamato por 6h.....	53
Figura 14 - PCR quantitativo do gene <i>Bmal1</i> seis trocas de meio por 12h x 3 pulsos de glutamato por 12h.....	55
Figura 15 – Painel de comparação entre os protocolos de duas trocas de meio de 12h e de seis trocas de meio por 12h para <i>Clock</i> , <i>Per2</i> e <i>Bmal1</i>	58
Figura 16 – Painel de comparação entre os protocolos de tratamento com um pulso de glutamato e com três pulsos de glutamato por 12h para <i>Clock</i> , <i>Per2</i> e <i>Bmal1</i>	60

RESUMO

A evolução da vida na terra foi possível graças ao desenvolvimento de mecanismos temporais precisos capazes de ajustar processos fisiológicos que ocorriam no interior do organismo com os ciclos ambientais, promovendo assim, ganhos na capacidade adaptativa e comportamental desses indivíduos. A retina exerce função de suma importância nesse processo através da percepção da informação fótica que possibilita o ajuste dos ritmos circadianos. Nesse tecido, o glutamato apresenta um importante papel tanto na transmissão da informação fótica direcionada ao processo de formação de imagem quanto nos ajustes dos relógios biológicos. O objetivo desse trabalho foi avaliar como o glutamato, aplicado por períodos diferentes (6 e 12h), é capaz de modular a expressão dos genes de relógio na retina de *Gallus gallus*. Através de diferentes protocolos que envolveram a administração de glutamato na concentração de 100µM por 6 e 12 horas e em diferentes repetições (1 e 3 pulsos) avaliou-se através de PCR quantitativo a expressão dos genes *Clock*, *Per2* e *Bmal1*. Os diferentes genes de relógio na retina de *Gallus gallus* apresentam diferentes respostas frente às trocas de meio e frente ao tratamento com o glutamato. O gene *Clock* responde com ativação da transcrição para ambos os tratamentos, de forma dependente da repetição dos estímulos. Já para o gene *Per2* o tratamento com glutamato impõe uma oscilação de expressão com um ritmo ultradiano, enquanto que as trocas de meio não determinam alterações na transcrição. A expressão do gene *Bmal1* não é afetada nem por trocas de meio, nem por glutamato. Novos estudos devem ser fomentados no sentido de se elucidar as vias pelas quais o glutamato leva ao perfil de oscilação observado e qual o mecanismo pelo qual a repetição de trocas de meio atua como sinalizador para o estabelecimento da sincronização celular.

ABSTRACT

The evolution of life on earth was possible thanks to the development of precise temporal mechanisms to adjust physiological processes to environmental cycles, thus promoting gains in the individual adaptive and behavioral ability. The retina plays a very important role of paramount importance in this process through the perception of photic information that allows the adjustment of circadian rhythms. In this tissue, glutamate functions in the transmission of photic information directed to both image formation and biological clock entrainment. The aim of this study was to evaluate how glutamate, applied for different periods (6 and 12h), is able to modulate the expression of the clock genes in the retina of *Gallus gallus*. Using different protocols involving the administration of 100 μ M glutamate for 6 and 12 hours and with different repetitions (1 and 3 pulses) the expression of *Clock*, *Per2* and *Bmal1* genes was evaluated by quantitative PCR. *Clock* gene responds with activation of transcription to both treatments depending on the repetition of the stimulus. As for *Per2* gene, glutamate treatment imposes an oscillation with an ultradian expression rhythm, whereas medium changes do not affect its transcription. The expression of *Bmal1* gene is not affected by either medium changes or glutamate. Further studies should be encouraged in order to elucidate the pathways by which glutamate leads to observed oscillation profile, and which mechanism triggered by the repetition of medium changes acts as signal to establish cell synchronization.

1- INTRODUÇÃO

1.1 – O TEMPO E A HISTÓRIA

Organismos vivos podem ser analogamente comparados ao vasto arsenal de uma biblioteca composta por bilhões de volumes, cujo autor é a seleção natural. Todos escritos na linguagem universal de sequências de nucleotídeos e todos galgando o mesmo objetivo: a reprodução que, quando alcançada, assegura que os volumes continuem a ser impressos (PITTENDRIGH, 1993). Nesse contexto, o tempo se apresenta como uma importante peça concernente ao que sentimos ocorrer entre um instante e outro principalmente no tocante ao aparecimento desses indivíduos.

O tempo costuma aparecer quando se observam organismos vivos e as relações espaciais nas quais estão inseridos, contudo, o tempo nunca passa de um cenário inerte onde a matéria viva se modifica. Faria sentido então pensar em um tempo que fosse intrínseco aos organismos vivos? Em outras palavras, um tempo “biológico”? A comprovação da existência desse tempo ficou clara com a observação de eventos naturais que se repetiam periodicamente dentro de um mesmo intervalo de tempo, como por exemplo, as flutuações na secreção urinária de sódio e potássio em mamíferos (MENNA-BARRETO, 2003). Além disso, eventos ambientais de recorrência regular funcionariam para esses organismos como forma de marcação do tempo que, consequentemente, garantiria sua sobrevivência.

Sendo assim, a evolução da vida na terra foi possível graças ao desenvolvimento de mecanismos temporais precisos capazes de ajustar processos fisiológicos que ocorriam no interior do organismo com os ciclos ambientais, promovendo assim, ganhos na capacidade adaptativa e comportamental desses indivíduos (KLEIN *et al.*, 1991). Esse ajuste de processos fisiológicos com os ciclos ambientais foi denominado *entrainment* e representou uma adaptação dos organismos possibilitando-os ocupar seu nicho temporal no momento mais favorável (PITTENDRIGH, 1993). Eventos ambientais que obedecem a uma periodicidade de ocorrência, como dias, marés, meses e anos fornecem uma ordem aos organismos que se torna previsível em consequência de sua recorrência.

1.2 – BASES MOLECULARES DOS RELÓGIOS BIOLÓGICOS

Análises de mutações espontâneas e/ou induzidas em *Drosophila melanogaster* comprovaram que o mecanismo molecular dos ritmos circadianos está contido no DNA codificado por “genes de relógio” como, por exemplo, *Clock* e *Cycle* (*Clk*) em *Drosophila* e o complexo *Wcc* (*White Collar-1*, *White Collar-2*) em *Neurospora*. Esses elementos atuam através de uma alça positiva e induzem a expressão de proteínas que, por sua vez, bloqueiam a expressão delas próprias (DUNLAP *et al.*, 2004; HASTINGS *et al.*, 2008). As proteínas que formam os complexos das alças negativas, PERIOD (PER) e TIMELESS em *Drosophila* e FREQUENCY (FRQ) em *Neurospora* inibem a atividade dos elementos positivos (HASTINGS *et al.*, 2008).

Em mamíferos, foi constatada a existência de genes homólogos aos encontrados em *Drosophila melanogaster*. Essa maquinaria de funcionamento de alças de regulação de transcrição e tradução pôde ser observada em neurônios do núcleo supraquiasmático (NSQ), o qual foi considerado como relógio central de mamíferos (HASTINGS *et al.*, 2008).

No início da década de 90 houve uma intensa busca com relação ao entendimento sobre o mecanismo molecular de funcionamento da oscilação circadiana. Experimentos que induziam mutações em camundongos resultavam em indivíduos com alterações na duração de seu período endógeno e na perda de sua ritmicidade circadiana. Observou-se, portanto, que as mutações atingiam um único gene e que este, em mamíferos, poderia ser o responsável por regular o comportamento circadiano de atividade e repouso. Este gene foi denominado *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*). Posteriormente, outros estudos abordando genes de relógio surgiram e novos genes foram descobertos e caracterizados (TAKAHASHI, 1994).

Em 1996, os genes *Cryptochrome1* e *Cryptochrome2* (*Cry1* e *Cry2*), receptores de luz azul em plantas, foram clonados no genoma humano. Em 1997, Tei e colaboradores demonstraram a presença da família de *Period* (*Per1*, *Per2* e *Per3*) em camundongos e em humanos. Nessa mesma época foi descoberta a existência do gene *Bmal1* (*Brain and Muscle Arnt-Like protein 1*) e sua importante parceria com o gene *Clock* (IKEDA & NOMURA, 1997).

Todos esses genes apresentam características comuns que os qualificam no grupo dos chamados “genes de relógio” como o fato de oscilarem de forma rítmica em

neurônios do NSQ e codificarem proteínas que apresentam domínio PAS (*Per-Arnt-Sim*) responsável por permitir a dimerização proteína-proteína.

Ao serem transcritas e traduzidas, as proteínas PER e CRY formam dímeros e são translocadas ao núcleo. A proteína PER mantém-se em constante vaivém entre o núcleo e o citoplasma. Após sofrer hiperfosforilação pela ação da caseína quinase Iε (CKIε), 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*. Ao mesmo tempo, *Per2* contribui para a transcrição rítmica de *Bmal1* que forma, junto com *Clock*, a alça de transcrição positiva que é expressa na fase oposta de *Per* e *Cry* (ALBRECHT & EICHELE, 2003).

A proteína CLOCK dimeriza-se com a proteína BMAL formando o heterodímero CLOCK:BMAL1. Esse complexo tem a capacidade de se ligar ao DNA e age como fator de transcrição dos genes *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* e *Cry2*, resultando por sua vez, em altos níveis desses transcritos. Esta é a alça positiva de regulação. No citoplasma, as proteínas PER e CRY formam novo heterodímero, PER:CRY, o qual atinge níveis consideráveis no citoplasma translocando-se em direção ao núcleo onde interage com o DNA levando à inibição da transcrição dos genes *Clock* e *Bmal1* através da ligação em domínios específicos da região promotora desses genes, o bHLH (*basic-helix-loop-helix*) (SHERAM *et al.*, 1999) e ação do complexo CLOCK:BMAL1. Esta é a alça negativa da maquinaria. Quando o complexo repressor PER:CRY é degradado, o complexo CLOCK:BMAL1 é liberado para ativar um novo ciclo de transcrição. Essa alça autoregulatória dura aproximadamente 24h (LOWREY *et al.*, 2000).

A expressão rítmica dos genes de relógio no NSQ é considerada o mecanismo chave na geração dos ritmos biológicos em mamíferos. Adicionalmente, tem sido demonstrado que esse mecanismo é amplamente distribuído em órgãos e tecidos e que cada célula do corpo é capaz de expressar essa maquinaria, podendo, portanto, ser considerada como um relógio periférico (BALSALOBRE *et al.*, 1998; WHITMORE *et al.*, 2000).

1.3 – LUZ E OS CICLOS CLARO/ESCURO

Dentre as diversas pistas fornecidas pelo ambiente para “arrastar” os ritmos biológicos, os ciclos claro-escuro são tidos como os principais agentes sincronizadores

ou “Zeitgebers” (HASTINGS & BOULOUS, 1991). O aparecimento da luz como importante forma de ordenação tempo-espacial é refutado pela teoria da “Fuga da luz” que defende que a capacidade de perceber a luz estava indiretamente ligada à capacidade de perceber altas temperaturas, por sua vez, nocivas para a estabilidade de enzimas e determinante para os processos metabólicos. Como as altas temperaturas coincidiam com as fases mais claras do dia, “fugir” da luz seria uma forma eficiente de preservação da homeostase térmica (PITTENDRIGH, 1993).

A luz tem excelentes propriedades direcionais e a maior velocidade de deslocamento conhecida, sendo, portanto, muito fiel para retratar mudanças no ambiente, especialmente mudanças rápidas. Nesse contexto, foram selecionadas nos diferentes organismos ao longo da escala filogenética, estruturas que possibilitavam a esses organismos a percepção da informação fótica proveniente do ambiente.

Dois terços dos filos animais têm órgãos sensíveis à luz. Olhos, com formação de imagem existem em 6 dos 33 filos existentes de metazoários, os quais representam 96% das espécies conhecidas atualmente, o que leva à sugestão de que os olhos tiveram importante participação ao longo do processo evolutivo (FERNALD, 2008).

Os Cnidários foram os primeiros organismos a apresentarem um órgão multicelular de percepção luminosa denominado ocelo. Esses fotodetectores apresentam um simples *eyespot* (uma pequena área contendo pigmento sensível à luz), lentes e caracteristicamente um olho do tipo câmera com córnea, cristalino e retina. Nesses indivíduos a luz era extremamente importante na determinação de alguns comportamentos incluindo migração vertical, respostas rápidas a mudanças na intensidade da luz e também na reprodução (MARTIN, 2002).

A partir de então, a próxima sofisticação em termos de fotorrecepção aparece nos artrópodes que já vão apresentar olhos compostos constituídos por um número variável de unidades funcionais denominados omatídeos que possibilitam a formação de imagem. Os omatídeos são formados por um dendrito central, rodeado por 6 a 12 células retinulares as quais enviam uma densa profusão de microvilos ao dendrito central formando o rabdômero. A formação de imagem nesse tipo de olho dá-se pela composição das diversas partes do campo visual captadas pelos diversos omatídeos, formando um mosaico (CRONIN, 2007).

Seguindo pela escala filogenética, algumas espécies de peixes apresentam células fotossensíveis ao longo de toda a superfície corporal diretamente responsivas à luz, como é o caso do *Danio rerio*. Também os anfíbios apresentam células que

percebem a luz e estão envolvidas em guiar eventos de mudança de coloração (fisiológica e morfológica), muito características nesse grupo. Já o grupo das aves apresenta múltiplos componentes, dentre esses a glândula pineal, que ritmicamente secreta melatonina; a retina e uma estrutura homóloga ao NSQ de mamífero a qual é composta de duas porções, uma medial (mNSQ) e uma visual (vNSQ). Estudos recentes têm mostrado que ambas as regiões recebem projeções das células ganglionares da retina o que comprova uma forte similaridade com o NSQ de mamíferos. Baseados nesses dados, foi proposto um modelo que aponta ambas as regiões (mNSQ e vNSQ) como osciladores hipotalâmicos em aves (CASSONE & WESTNEAT, 2012).

Nos mamíferos, os detectores visuais estão reunidos em um mesmo local abrigados por uma câmara com entrada de luz controlada e intermediada por uma lente, em um arranjo que permite a projeção de uma imagem invertida na retina. Neste grupo, o único meio de entrada da informação fóptica ocorre através da retina, uma vez que os mamíferos perderam, ao longo do processo evolutivo, seus fotorreceptores extra-retinianos. Uma possível explicação para a ocorrência dessa perda está relacionada com sua história evolutiva. Todos os mamíferos são derivados de um ancestral noturno insetívoro ou onívoro. A teoria da passagem dos mamíferos pelo *nocturnal bottleneck* sugere que muitos ancestrais de mamíferos foram forçados a adotar um comportamento noturno em resposta à dominância dos *archeossauros* na fase diurna. Fotorreceptores extra-retinianos seriam adequados para monitorar mudanças em condições diurnas de iluminação, mas não teriam sido suficientemente sensíveis para discriminar mudanças na fase de crepúsculo, principalmente para esses mamíferos primitivos que passavam o dia escondidos sob o chão e emergiam posteriormente para suas atividades na fase do crepúsculo. Fotorreceptores extra-retinianos teriam estado presentes em mamíferos ancestrais que apresentavam comportamento diurno, contudo foram perdidos quando as pressões seletivas fizeram com que ganhassem o “reino noturno” (FOSTER *et al.*, 2010). Entretanto, estudos recentes têm mostrado uma perspectiva diferente. Quando se expõe a pele de mamíferos a baixas intensidades de radiação ultra-violeta, um comprimento de onda que se encontra na faixa do não-visível, mas próxima do azul, ocorre um aumento de pigmentação da pele em função de um aumento na síntese de melanina. Contudo, o mecanismo pelo qual esse comprimento de onda é percebido na pele ainda continuava pouco esclarecido. Estudos recentes em melanócitos humanos, todavia, têm demonstrado que a luz ultravioleta desencadeia uma via de transdução acoplada a um receptor de proteína G, o fotopigmento rodopsina. Essa via de transdução

leva, posteriormente, a ativação de um receptor de potencial transiente A1 (TRPA1) que gera um aumento do fluxo de cálcio intracelular e consequentemente um rápido aumento nos conteúdos de melanina que exercem ação protetora contra os danos da radiação UV. Tais estudos demonstram em última instância, a existência de fotorreceptores extra-retinianos em mamíferos, que claramente não estão relacionados a mecanismos de formação de imagem, contudo, exercem importantes papéis em evitar a ocorrência de quadros neoplásicos em tecidos de revestimento (BELLONO & OANCEA, 2013).

1.4 – FOTOTRANSDUÇÃO

A retina exerce um papel de suma importância na percepção da informação fótica, sendo ainda um tecido onde se observa a ocorrência de uma ampla gama de processos que obedecem a padrões rítmicos como, por exemplo, sensibilidade visual, destruição do segmento externo dos cones e fagocitose pelo epitélio pigmentar retiniano (RPE) (LAVAIL, 1976), expressão de genes, biossíntese e secreção de hormônios (HEIDI & MENAKER, 1980), dentre outros.

A formação morfológica dos tecidos nervosos de vertebrados que darão origem à retina se inicia com o correto posicionamento do tubo neural primitivo ao longo de seu eixo rosto-caudal. Posteriormente à sua formação, o tubo neural se divide em três vesículas cerebrais (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo). Da região posterior do prosencéfalo evoluem as estruturas que formarão o globo ocular, já o tecto óptico forma-se a partir da porção dorsal do mesencéfalo. As vesículas ópticas sofrem uma invaginação formando os cálices ópticos. A parte interna dessa estrutura forma a retina, enquanto que a porção externa forma o epitélio pigmentado (HAMBURGER & HAMILTON, 1951).

O tecido é dividido em três camadas compostas por diferentes subtipos de células: cones e bastonetes (camada nuclear externa), células horizontais, bipolares, e amácrinas (camada nuclear interna), além de ganglionares (camada de células ganglionares) (KOLB, 1994; BOYCOTT & WÄSSLE, 1999). Na camada nuclear interna encontram-se presentes, ainda, as células de Müller (glia de Müller), extremamente importantes na manutenção da arquitetura celular da retina bem como de processos fisiológicos envolvidos na manutenção da homeostase desse tecido, como o tamponamento de potássio, sequestro e inativação de glutamato (NEWMAN, 2004) e,

mais recentemente descrito, a regeneração de neurônios (FISCHER & REH, 2003; FISCHER, 2005; FISCHER & BONGINI, 2010). As células amácrinas junto com as células horizontais participam da modulação horizontal da informação fótica, através da liberação do ácido γ -amino-butírico (GABA). Tais células vão refinar o fluxo de informação através da inativação das sinapses excitatórias glutamatérgicas por projeções gabaérgicas laterais (YAZULLA, 1983).

Os fotorreceptores de vertebrados têm a capacidade de responder a estímulos luminosos, em virtude da presença de pigmentos visuais chamados opsinas, que estão inseridos nos discos que compõem a bicamada de fosfolipídios dessas células, onde ocorrem as interações moleculares da fototransdução (YARFITZ & HURLEY, 1994).

Opsinas consistem uma família de proteínas estrutural e funcionalmente semelhantes capazes de responder à luz em função da presença de um cromóforo associado à porção protéica (FINDLAY & PAPPIN, 1986). As diferentes proteínas fotorreceptoras até então descritas na literatura podem ser classificadas em um número limitado de famílias, baseadas na estrutura química do cromóforo envolvido. Sendo as famílias mais importantes: as rodopsinas; os fitocromos; as xantopsinas; os criptocromos; as fototropinas e as proteínas BLUF. A premissa de ativação fotoquímica dessas proteínas fotorreceptoras baseia-se em uma mudança na configuração de seus cromóforos, o que leva nas primeiras três famílias (rodopsinas, fitocromos e xantopsinas) à isomerização do cromóforo. Contudo, recentemente foram descobertas outras alterações fotoquímicas desencadeadas pelo estímulo do fóton, como a formação de um substrato transiente, a aduto-cistenil nos domínios LOV das fototropinas. Essa alteração nos domínios acaba por iniciar a formação de uma cascata de sinalização para comunicar o processo de absorção de fótons para outros componentes da via de transdução de sinal (VAN DER HORST & HELLINGWERF, 2004).

O mecanismo de fototransdução nos vertebrados inicia-se no segmento externo dos fotorreceptores e é repassado aos outros neurônios que compõem a rede neuronal retiniana, via transmissão sináptica. Nas esférulas dos bastonetes e pedículos dos cones podem ser encontradas sinapses em fita (*ribbon*), representadas por dois dendritos centrais de células bipolares e dois processos laterais de células horizontais (EULER & WÄSLLE, 1995). A absorção do fóton de luz pela molécula de rodopsina nos discos de membrana dos bastonetes culmina na hiperpolarização da membrana. Esses dois eventos são ligados por uma elegante e sofisticada maquinaria de sinalização bioquímica (POLANS *et al.*, 1996).

A molécula de rodopsina ativa duas proteínas principais participantes da cascata de GMPc: a transducina (proteína G) e a fosfodiesterase de GMPc. Em seu estado ativado, a subunidade da transducina ligada ao GTP é mais solúvel, e interage brevemente com a fosfodiesterase ligada a membrana do disco (KUHN, 1978). As duas proteínas regulatórias (rodopsina quinase e arrestina) são solúveis, mas têm que se ligar e interagir com a rodopsina. A porção carboxi-terminal da rodopsina (lado citoplasmático) é rica em resíduos de treonina e serina. Na fotoestimulação esses resíduos são expostos e se tornam sítios de fosforilação para a ação da rodopsina quinase (KUHN, 1984).

Quando a luz atinge a rodopsina, esta causa alterações na estrutura tridimensional da molécula o que faz com que ocorra a diminuição da afinidade do GDP pela subunidade α do complexo α -GDP $\beta\gamma$ que é então liberado e trocado por GTP. A ligação do GTP faz com que todo o complexo perca a afinidade pela rodopsina, bem como a subunidade α perca a afinidade pelas subunidades $\beta\gamma$ que, por sua vez, são instantaneamente liberadas no citoplasma. A rodopsina está então livre para a ligação de outra transducina até ser inibida pela ação combinada da rodopsina quinase e da arrestina. É a isomerização do cromóforo na região transmembrânica que direciona a formação do sítio da transducina na superfície citoplasmática (PFISTER *et al.*, 1985).

No escuro, uma corrente de fluxo constante mantém os canais catiônicos abertos (“corrente de escuro”), despolarizando as células fotorreceptoras e levando a liberação de neurotransmissores como o glutamato em terminais sinápticos de neurônios de segunda ordem (YAU, 1994). Quando ocorre a estimulação por luz, as moléculas de rodopsina passam para sua forma ativa, levando à ativação de uma fosfodiesterase que hidroliza o GMPc levando ao fechamento dos canais catiônicos que dependem de GMPc. Esse fechamento leva à interrupção da “corrente de escuro” e faz com que a membrana das células fotorreceptoras se hiperpolarize, cessando dessa forma a liberação do glutamato nos terminais sinápticos (MILLER & KORENBROT, 1993).

O glutamato é o principal neurotransmissor do sistema nervoso central de vertebrados (OZAWA *et al.*, 1998). Esse neurotransmissor é sintetizado a partir da glicose, uma vez que o mesmo não atravessa a barreira hemato-encefálica. A síntese do glutamato acontece pela trans-aminação do α -cetoglutarato do ciclo de Krebs, ou ainda, pela conversão da glutamina, originada das células da glia, em glutamato pela enzima glutaminase (CONN & PINN, 1997).

1.5 - RECEPTORES DE GLUTAMATO

O glutamato exerce sua função através de receptores específicos denominados receptores de glutamato (GluR). Receptores de glutamato são encontrados por todo o cérebro de mamíferos, onde compõem a maioria dos sistemas de transmissão excitatória no sistema nervoso. Os mais bem conhecidos e estudados receptores de glutamato são os que formam canais iônicos através da membrana, denominados receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) (HOLLMANN & HEINEMANN, 1994). Estudos apontam que disfunções nessa família de receptores estão intimamente relacionadas a muitas desordens neurológicas e psiquiátricas como Alzheimer, Parkinson e esquizofrenia. Os receptores ionotrópicos de glutamato são canais permeáveis a íons que medeiam a transmissão rápida da informação na maioria das sinapses neuronais (WOLLMUTH & SOBOLEVSKY, 2004). O receptor nativo em todas essas famílias é um tetrâmero (homodimérico ou heterodimérico), provavelmente composto de mais de um tipo de subunidade (Figura 1). Esses receptores são classificados em três subtipos baseados em suas propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas, a saber: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolepropionic acid (AMPA); N-methyl-D-aspartate (NMDA) e Kainate (KA) (SUGIYAMA *et al.*, 1987). A similaridade nas sequências de aminoácidos e, em muitos casos, a similaridade na estrutura de éxons e íntrons, sugerem uma origem evolutiva comum para todos os genes de receptores ionotrópicos de glutamato (DINGLELINE *et al.*, 1999).

Figura 1 – A: Topologia dos receptores ionotrópicos de glutamato. Domínio amino-terminal extracelular (ATD); estrutura do domínio de ligação (*Venus flytrap*) ao glutamato. O domínio extracelular ligado a M1 interage com uma alça extracelular conectado M2 e M3 formando dois elementos globulares do domínio *Venus flytrap*. B: Modelo dimérico do receptor ionotrópico de glutamato. C: Modelo hipotético de ligação de inibidores alostéricos tais como zinco (Zn^{+2}) no domínio amino-terminal.

1.5.1 – RECEPTORES IONOTRÓPICOS

1.5.1.1 - RECEPTORES NMDA

Receptores ionotrópicos do tipo N-methyl-D-aspartate (NMDA) desempenham um importante papel em mecanismos de plasticidade neuronal e excitotoxicidade. Seu envolvimento nesses processos reflete algumas propriedades intrínsecas desse receptor

como bloqueio sensível a voltagem por Mg^{+2} proveniente do meio extracelular, uma alta sensibilidade a Ca^{+2} e uma cinética de ativação e desativação, que depende da ligação prévia de um co-agonista, a glicina (CULL-CANDY *et al.*, 2001).

Uma ampla gama de subunidades que formam essa classe de receptores vem sendo descoberta: subunidade NR1, ubiquamente expressa; quatro distintas subunidades NR2 (A, B, C e D) e duas subunidades NR3. Estudos de hibridização *in situ* têm mostrado que o RNAm das subunidades do receptor NMDA são diferentemente distribuídas ao longo do sistema nervoso central e que seu padrão de expressão muda ao longo do desenvolvimento (MORLYOSHI, 1991; MONYER, 1994; AKAZAWA, 1994; DAS, 1998).

A ativação inapropriada de receptores NMDA parece estar envolvida numa série de patologias no SNC. O excessivo influxo de Ca^{+2} , proveniente de uma ativação prolongada dos receptores NMDA, é direcionado à mitocôndria gerando uma despolarização na membrana dessa organela e a abertura de canais MPT (*mitochondrial permeability transition*) que, em última instância, levará à liberação de citocromo c ou ativação da cascata das caspases, ambos eventos que culminarão na apoptose celular, levando à morte neuronal (KROEMER *et al.*, 1998).

O bloqueio de receptores NMDA por antagonistas específicos em modelos animais mostra um paralelismo com quadros patológicos, que resultam em hiperatividade de sistemas dopaminérgicos e a consequentes mudanças de comportamento característicos da esquizofrenia (ROWLEY, 2001).

Estruturalmente os receptores NMDA apresentam um longo domínio N-terminal extracelular, três segmentos transmembrânicos e um domínio C-terminal intracelular que apresenta tamanho variável dependendo do tipo de subunidade que forma o tetrâmero do receptor. Essa porção C-terminal regula a interação do receptor com uma série de proteínas citosólicas que controlam tráfego e distribuição dos receptores NMDA ao longo da membrana plasmática. Diversos resíduos de serina e treonina presentes nas subunidades que formam os receptores NMDA têm sido identificados como sítios de fosforilação para uma série de proteína-quinases, incluindo PKA, PKB, CaMKII, CdK5 e CKII. As fosforilações nesses resíduos podem controlar propriedades do receptor alterando eventos sinápticos importantes, principalmente em mecanismos de plasticidade sináptica (LEE, 2006).

Existem amplas evidências de que a função dos receptores NMDA é regulada por uma variedade de proteína-quinases. Estudos apontam que a ativação de PKC

potencializa as correntes geradas pela ativação do receptor ocasionado pelo aumento da taxa de abertura do canal, bem como pelo aumento na expressão do receptor na superfície da membrana (*upregulation*) (CHEN & HUANG, 1992).

Receptores NMDA também participam de importantes processos no sistema nervoso central relacionados a mecanismos de aprendizagem e memória. Fenômenos de LTP (*long term potentiation*) caracterizados por aumentos na atividade de transmissão sináptica que ocorrem principalmente no hipocampo são amplamente estudados por aqueles que se propõem a entender os mecanismos por trás dos fenômenos de aprendizagem e memória. A despolarização da membrana associada à ligação do aminoácido glutamato faz com que os receptores NMDA passem do estado “fechado” para o “aberto” levando assim ao influxo do íon Ca^{+2} . Uma vez dentro da célula, o cálcio ativa quinases dependentes como a CaMKII e outras enzimas específicas como a adenilil-ciclase que converte o ATP em AMPc levando à ativação de sua quinase específica, a PKA, que por sua vez fosforila os receptores AMPA fazendo com que se abram levando à entrada de mais íons Na^{+} e a sustentação da corrente de despolarização. A manutenção desse processo ficou por muito tempo sem ser entendida até que se descobriu que a CaMKII levava a ativação de uma óxido nítrico sintase que conduzia à produção de NO, um neurotransmissor gasoso que se difunde para fora da célula e estimula o neurônio pré-sináptico na manutenção do mecanismo de LTP (COLLINGRIDGE, 1987).

1.5.1.2 - RECEPTORES AMPA

Transmissões sinápticas excitatórias rápidas no sistema nervoso central são predominantemente mediadas por receptores de glutamato do subtipo AMPA. Esse subtipo de receptor apresenta propriedades funcionais distintas em diferentes circuitos neuronais bem como em diferentes subtipos celulares pertencentes ao mesmo circuito, sendo expresso predominantemente em neurônios do hipocampo e interneurônios neocorticais e em outras regiões como nas circuitarias formadoras do sistema auditivo, em células gliais de Bergmann, dentre outras. (WANG *et al.*, 2001; MONYER *et al.*, 1995).

Estudos mostram que, nas espinhas dendríticas, estruturas originadas de projeções da membrana plasmática com o intuito de aumentar a superfície de recepção em dendritos de neurônios piramidais CA1 do hipocampo, esses receptores servem

preferencialmente como sítios de sinapses excitatórias, mediadas em sua grande maioria por uma elevada concentração de receptores AMPA (cerca de 150 por espinha). Estes estudos ainda apontam que a distribuição dos receptores AMPA funcionais está intimamente relacionada com a geometria das espinhas que, por sua vez, interferem diretamente em ganhos cognitivos e de memória (MASANORI *et al.*, 2001).

Camundongos mutantes epiléticos denominados Stargazer apresentam falta de expressão de receptores AMPA funcionais em células granulares cerebelares. A Stargazina é uma proteína que interage tanto com receptores AMPA quanto com proteínas que apresentam domínio PDZ (PSD95, DlgA e zo-1), um domínio estrutural de cerca de 80-90 aminoácidos que auxilia na ancoragem de proteínas transmembrânicas ao citoesqueleto e organiza complexos de sinalização. Essa interação é de extrema importância para o direcionamento de receptores funcionais à superfície de membrana da célula bem como para o posicionamento dos receptores AMPA nas sinapses. A proteína stargazina mutante não apresenta o domínio de ligação a proteínas PDZ o que prejudica de maneira importante as sinapses envolvendo receptores AMPA e acarreta os quadros epiléticos observados nesse modelo de estudo (CHEN *et al.*, 2000).

Através de estudos de clonagem molecular foram identificadas quatro subunidades formadoras do tetrâmero de subunidades que compõem os receptores AMPA, sendo elas: GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4. A grande maioria dos arranjos de subunidades que formam essa classe de receptores apresenta em sua formação a subunidade GluR2, o que torna esses canais impermeáveis a Ca^{+2} . Há relatos da existência de receptores AMPA no citoplasma de neurônios do hipocampo e tem sido visto que mudanças rápidas na expressão desses receptores na membrana estão intimamente ligadas a mecanismos de LTP (ISAAC *et al.*, 1995; LIAO *et al.*, 1995).

Receptores AMPA também exercem um importante papel na retina, onde são expressos, juntamente com receptores Cainato, nas células bipolares. Sinais provenientes dos cones são enviados para células bipolares de centro ON e células bipolares de centro OFF. A hiperpolarização ocasionada pela ativação das células bipolares de centro OFF é mediada pela ativação de receptores de glutamato AMPA/Cainato, enquanto que os sinais provenientes dos cones e direcionados às células bipolares de centro ON que culminarão em um mecanismo de despolarização, são mediados por receptores metabotrópicos (mGluR6). A integração da informação proveniente das células bipolares ON e OFF permitirá que a retina segregue a informação fótica em um componente temporal. Essa diferenciação temporal no envio

da informação pelas células bipolares (ON e OFF) será de extrema importância na resposta das células ganglionares que codificarão esse componente temporal de envio das informações em salvas de potenciais de ação que serão posteriormente interpretados em centros visuais corticais específicos destinados à formação de imagem (DE VRIES, 2000).

1.5.1.3- RECEPTORES CAINATO

Receptores Cainato fazem parte, juntamente com NMDA e AMPA, da família de receptores ionotrópicos de glutamato que regulam a transmissão sináptica em neurônios pré e pós- sinápticos. Como as outras classes de receptores é um tetrâmero formado pelas subunidades GluK1, GluK2, GluK3, GluK4 e GluR5 e KA1 e KA2 (JANET & HOUSLEY, 2013).

Estudos com ênfase na participação de receptores de glutamato em neuropatologias têm demonstrado a expressão de receptores tipo Cainato em astrócitos presentes na região CA1 do hipocampo, após um evento epilético. Experimentos de imunohistoquímica mostram uma clara co-localização das subunidades que compõem o receptor entre 1 até cerca de 8 semanas após a ocorrência do evento epilético, evidenciando uma importante participação dessa família de receptores na fisiopatologia dessa doença (WILCOX *et al.*, 2013).

Nesse contexto uma série de compostos que agem como antagonistas específicos dessa família de receptores têm emergido como fortes candidatos ao tratamento de várias patologias que acometem tanto o sistema nervoso quanto o organismo de maneira sistêmica.

1.5.2 – RECEPTORES METABOTRÓPICOS

Além dos receptores que formam canais iônicos na membrana da célula, surgiram evidências, por volta dos anos 80, da existência de receptores de glutamato diretamente associados a um sistema de segundos mensageiros via ativação de proteína G. Desde então, tem se tornado claro que o glutamato também ativa uma extensa família de receptores denominados receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) que, por

sua vez, estão acoplados a um sistema de efetores através de proteínas ligadas a GTP (SLADECZEK *et al.*, 1985).

Receptores metabotrópicos são divididos em três grandes famílias baseadas na homologia de suas sequências de aminoácidos, seletividade pelo ligante bem como das vias de sinalização evocadas frente à sua ativação.

Grupo I de receptores metabotrópicos é composto pelos subtipo mGluR1 e mGluR5 que apresentam como característica intrínseca a ligação a proteína Gq, cuja ativação leva ao aumento da hidrólise de fosfoinositídeos de membrana que culminarão na liberação de Ca^{+2} de estoques intracelulares, bem como da produção de diacil glicerol (DAG) e consequente ativação de proteína-quinases específicas. Já o grupo II é composto pelos subtipos mGluR2 e mGluR3 e o grupo III, por mGluR4, 6, 7 e 8, associados a proteína Gi/o que, quando ativada, leva à inibição da enzima adenilil-ciclase e a diminuição nos níveis de AMPc (CONN & JONATHAN, 2012).

Dentre os subtipos de receptores metabotrópicos, um que merece maior atenção é o subtipo mGluR6, que apresenta um importante papel no processamento da informação fótica na retina enviando sinais provenientes dos cones e direcionados às células bipolares de centro ON que culminarão em um mecanismo de despolarização (DE VRIES, 2000).

1.6 – SINALIZAÇÃO DA INFORMAÇÃO FÓTICA NO NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

Dentre o conjunto das células ganglionares da retina de mamíferos foi descoberta a existência de uma subpopulação especial, as chamadas células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs). Essas células foram inicialmente identificadas e caracterizadas morfológica e fisiologicamente na retina de camundongos (PROVENCIO *et al.*, 2000; BERSON *et al.*, 2002). Atualmente se sugere a existência de cinco diferentes tipos de ipRGCs (M1, M2, M3, M4 e M5) baseadas na morfologia dendrítica e nas projeções axonais (MATYNIA *et al.*, 2011). Uma característica intrínseca dessa população de células é a existência de um fotopigmento chamado melanopsina, presente na membrana plasmática de toda a célula, inclusive dos dendritos e dos axônios. O conjunto dos axônios dessas células melanopsina-positivas forma o trato retino-hipotalâmico que comunica a retina com o oscilador central, o NSQ (MATYNIA *et al.*, 2011).

A capacidade de resposta da melanopsina é função da presença de um cromóforo derivado da vitamina A, o 11-cis-retinal que, quando estimulado por um fóton de luz, se isomeriza em all-trans-retinal, o que acarreta mudanças conformacionais na porção protéica do fotopigmento liberando o sítio de ligação para a proteína G que levará a ativação de vias de sinalização específicas. Estudos comprovam que a ativação da melanopsina leva a uma via de sinalização que se assemelha às vias evocadas pelas cascatas de fototransdução em fotorreceptores rabdoméricos de invertebrados, a qual envolve ativação de Gq que leva ao estímulo de fosfolipase C (PLC β) que, por sua vez leva a um aumento na hidrólise de fosfoinositídeos de membrana, conduzindo em última instância ao aumento dos níveis de Ca⁺² intracelular graças a abertura de canais TRP (*transient receptor potencial*). Esse aumento nos níveis intracelulares de cálcio possibilita a liberação de vesículas de glutamato e PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating peptide*) na fenda sináptica nos neurônios do NSQ (MONTELL, 1999; HARDIE, 2001; HARDIE & RAGHU, 2001).

Os neurônios do NSQ integram e processam a informação fóptica direcionada aos ajustes no sistema circadiano, principalmente por receptores ionotrópicos de glutamato (GOLOMBECK *et al.*, 2000). Uma gama de evidências sugere que receptores NMDA exercem um papel de extrema importância na transdução do sinal direcionado a esses ajustes. O glutamato, através desses receptores, induz um aumento nos níveis de Ca⁺² intracelular. Esse aumento gera a ativação de uma série de enzimas no NSQ, incluindo proteína quinase II dependente de Ca⁺²/calmodulina (CaMKII), e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (AGOSTINO *et al.*, 2004). O NO é capaz de ativar uma forma mais solúvel de guanilil ciclase que, por sua vez, induz mudanças circadianas nos níveis de GMPc e na proteína quinase dependente de GMPc (PKG II) (Figura 3), indicando assim que essas variáveis estão sob controle dos genes de relógio (FERREYRA & GOLOMBECK, 2001). Em outros trabalhos, Oster e colaboradores (2003) demonstraram que, em camundongos, uma degeneração no gene responsável por codificar PKG II levava a um *resetting* anormal dos relógios circadianos, acompanhado por uma considerável redução na expressão de *mPer2* e um aumento na expressão de *mPer1*.

Recentemente foram apresentadas evidências que sugerem a participação do glutamato em vias eferentes do NSQ (Figura 2) e elegem esse neurotransmissor como a molécula sinalizadora dos neurônios desse núcleo. Apesar de os mecanismos de recaptação de glutamato não obedecerem a um padrão rítmico nas células da glia, sabe-

se que existe uma modulação desse processo, pelas enzimas responsáveis pela conversão do glutamato em glutamina, que estão sob controle dos genes de relógio.

Figura 2: Esquema do mecanismo de transdução da informação fóptica em neurônios do núcleo supraquiasmático. Glutamato ativa receptores NMDA levando a um aumento nos níveis de cálcio intracelular e desencadeando ativação de diversas vias de sinalização que em última instância fosforilam o fator de transcrição CREB levando a expressão de *Per1* e *Per2*. Fonte: Golombek, 2011.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS

Ovos galados de galinhas da linhagem Leghorn foram obtidos de um fornecedor local. A retina foi isolada após o oitavo dia embrionário, em solução fisiológica livre de cálcio e magnésio (CMF), tamponada com fosfato, a partir de ovos embrionados incubados previamente em atmosfera umidificada, a 37°C, sob regime fotoperiódico de 12 horas de luz (~450 lux) e 12 horas de escuro. Após a adição de Triplex® (Life Technologies, EUA) as preparações foram incubadas a 37°C por 30 minutos de onde o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 10 mL de meio DMEM (HyClone, EUA) complementado com 1% antibiótico (10.000 U/mL penicilina, 10.000 ug/mL estreptomicina, 25 µg/mL anfotericina) (Life Technologies, EUA), além de 1% de soro fetal bovino, retinaldeído all-trans (Sigma, EUA) 10^{-7} M, e inibidor de recaptação de adenosina- NBTI (Nitrobenzil-6-tioinosina) (Sigma, EUA) na concentração 5.10^{-6} M. Neste meio procedeu-se a dissociação mecânica da retina feita em duas etapas: uma primeira etapa em que se utilizou uma pipeta de 10 mL (20 aspirações) e em seguida uma segunda etapa com uma pipeta de 1 mL (60 a 65 aspirações) objetivando reduzir a agressão às células. O dissociado foi então transferido para um frasco contendo um volume maior de meio para que as células pudessem ser contadas. Após serem contadas as células foram semeadas em garrafas de 25 cm², previamente tratadas com poli-D-lisina (Sigma, EUA), numa densidade de 5.10^6 células por garrafa. Em seguida foram transferidas para estufa a 40°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ em escuro constante por no mínimo 2 dias antes de se iniciarem os tratamentos.

Todos os procedimentos de manutenção das células e dos protocolos experimentais descritos a seguir foram realizados sob luz vermelha de baixa intensidade (~5 lux), proveniente de um iluminador Konex com lâmpada vermelha de 7 W (Sadokin, Brasil) com filtro Safe-Light GBX-2 (Kodak, Brasil)

2.2 - PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Protocolo A – Um pulso de glutamato por 12 horas em escuro constante

Objetivou-se a princípio avaliar se um pulso de 12h de glutamato na concentração de 100 μ M era capaz de modular e/ou sincronizar o ritmo de expressão dos genes de relógio em células de retina de *Gallus gallus*. As células foram mantidas em escuro constante por quatro dias e, no início do quinto dia (ZT0, 9:00h), foram submetidas a troca de meio contendo glutamato na concentração de 100 μ M, o qual foi removido 12 horas após. Em paralelo, as células controle receberam duas trocas de meio sem adição de glutamato. A partir das 9h (ZT0) do sexto dia o RNA total foi extraído a cada 3 horas por um período de 24h (ZT0 ao ZT21), de acordo com o esquema da Figura 3.

Figura 3 - Esquema do protocolo experimental A. A dissecação e dispersão das retinas ocorreram no oitavo dia embrionário às 9:00h (ZT0) quando as células foram, então, colocadas sob condição de escuro constante, representado pela barra preta. O tratamento com glutamato (100 μ M) foi realizado no quinto dia (ZT0, 9:00h) por 12h. Como controle, culturas receberam duas trocas de meio sem adição de glutamato (ZT0 e ZT12). No sexto dia (ZT0, 9:00h) procedeu-se a extração de RNA total a cada 3h por um período de 24h.

Protocolo B - Três pulsos de glutamato por 6 horas em escuro constante

Objetivou-se avaliar posteriormente se três pulsos de 6h de glutamato seriam mais efetivos na modulação e/ou sincronização da expressão dos genes de relógio. As

células de retina em cultura foram mantidas em escuro constante por dois dias. No início do terceiro, quarto e quinto dia (ZT0, 9:00h de cada dia) as células foram submetidas a trocas de meio contendo glutamato na concentração de 100 μ M, que foi removido 6h após. As células do grupo controle receberam 6 trocas de meio sem glutamato. No início do sexto dia (ZT0 9:00h) o RNA total foi extraído a cada 4 horas por um período de 24h (ZT0 ao ZT20), de acordo com o esquema da Figura 4.

Figura 4 - Esquema do protocolo experimental B. A dissecação e dispersão das retinas ocorreram no oitavo dia embrionário às 9:00 h (ZT0) quando as células foram, então, colocadas sob condição de escuro constante (DD), representado pela barra preta. O tratamento com glutamato (100 μ M) foi realizado a partir do ZT0 do terceiro até o quinto dia por 6h em cada dia. Como controle, culturas receberam 6 trocas de meio (ZT0 e ZT6 de cada dia). No sexto dia (ZT0, 9:00h), procedeu-se a extração de RNA total a cada 4h por um período de 24h.

Protocolo C - Três pulsos de glutamato por 12 horas em escuro constante

Objetivou-se avaliar posteriormente se três pulsos de 12h de glutamato seriam capazes de impor uma modulação e/ou sincronização da expressão dos genes de relógio. As células de retina em cultura foram mantidas em escuro constante por dois dias. No início do terceiro, quarto e quinto dia (ZT0, 9:00h de cada dia) as células foram submetidas a trocas de meio contendo glutamato na concentração de 100 μ M, que foi removido 12h após. As células do grupo controle sofreram 6 trocas de meio sem glutamato. No início do sexto dia (ZT0 9:00h) o RNA total foi extraído a cada 3 horas por um período de 24h (ZT0 ao ZT21), de acordo com o esquema da Figura 5.

Figura 5 - Esquema do protocolo experimental C. A dissecação e dispersão das retinas ocorreram no oitavo dia embrionário às 9:00 h (ZT0) quando as células foram, então, colocadas sob condição de escuro constante (DD), representado pela barra preta. O tratamento com glutamato (100 µM) foi realizado a partir do ZT0 do terceiro até o quinto dia por 12h em cada dia. Como controle, culturas receberam 6 trocas de meio sem adição de glutamato. No sexto dia (ZT0, 9:00h), procedeu-se a extração de RNA total a cada 3h por um período de 24h.

2.3 - EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL, RT-PCR

Após o descarte do meio, foi adicionado 1 mL de Tri-Reagent-LS (Sigma, EUA) diretamente sobre as células. O lisado celular foi então coletado em *ependorf* e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação das proteínas nucleares. Ao lisado celular foram adicionados 200µL de BCP (1-bromo-3-cloropropano, Sigma, EUA), seguido de agitação vigorosa por 15 segundos e descanso de 10 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C, separou-se a fase superior que contém RNA (500µL) da fase de proteína e DNA que foram descartados. O RNA foi precipitado com a adição de 650µL de isopropanol (Sigma, USA), por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 35 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido, o RNA lavado com 1,3mL de etanol 75% (2x), evaporado em temperatura ambiente e ressuspendido em 20µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (H₂O DEPC, Ambion Inc., EUA). Para remoção de eventual contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase (kit turboDNA-freeTM, Life Technologies, EUA). Adicionou-se a cada amostra, 10% do volume do 10x Turbo DNase Buffer, 1µL de Turbo DNase, seguindo-se incubação de 30 minutos, a 37°C. Logo após, foram acrescentados 3µL ou

10% do volume do reagente de inativação da DNase, seguindo-se incubação de 2 minutos em temperatura ambiente, período durante o qual as amostras foram agitadas por 2 a 3 vezes. Após centrifugação a 10.000 x g por 2 minutos, o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo *epENDORF* e mantido em recipiente com gelo até a leitura da concentração.

A concentração de RNA foi determinada por leitura da absorbância a 260 nm em espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific, USA) e RT-PCR foi realizado com 1 µg de RNA total, utilizando 1 µL de oligonucleotídeos randômicos (50 µg/µL) e 1 µL de dNTPs 10 mM (Gibco, EUA), em reação com volume final de 13 µL ajustado com H₂O-DEPC. As amostras foram aquecidas por 5 minutos a 65° C e a seguir transferidas para cuba com gelo, adicionando-se 4 µL de tampão para PCR (5x), 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de inibidor de ribonuclease (40 U/µL) e 1 µL da enzima *Superscript III* (200 U/µL, Invitrogen, EUA), para um volume final de 20 µL. 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 interrompida por incubação a 70° C por 15 minutos. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subsequentes de PCR quantitativo.

2.4 - PCR QUANTITATIVO

As reações de PCR quantitativo foram feitas através de dois protocolos distintos. As reações de PCR para o protocolo multiplex foram feitas com um par de *primers* e uma sonda contendo fluoróforo, específicos para *Per2* e *Clock* (Tabela I, desenhados pelo programa Primer Express, LifeTechnologies, EUA e sintetizados pela IDT, EUA). Para *Bmal1* foram usados pares de *primers* específicos (Tabela 1, também desenhados pelo programa Primer Express e sintetizados pela IDT), e a amplificação verificada pela incorporação do fluoróforo *SYBR Green*.

Para os ensaios de PCR quantitativo multiplex de *Per2* e *Clock* de *Gallus gallus* foram preparadas soluções contendo os *primers* nas concentrações de 300 nM para genes de relógio e 50 nM para RNA 18S, sondas nas concentrações de 200 nM para genes de relógio e 50 nM para RNA 18S, Platinum qPCR Supermix 2X (BioRad ou Life Technologies, EUA) suplementado para 400 µM de dNTPS, 6 mM de MgCl₂ e 0,1 U/µL de Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies, Brasil), e H₂O para volume final de 29 µL/poço. Essa solução foi alíquotada (cada alíquota suficiente para 3,5 poços) em tubos, e o cDNA de cada amostra adicionado a um tubo. As soluções já com

cDNA foram então distribuídas em triplicatas nos poços da placa de experimento. Controles negativos foram incluídos rotineiramente, feitos sem cDNA.

Nos ensaios para *Bmal1*, foram preparadas soluções contendo os *primers*, *iQ*TM *SYBR*[®] *Green Supermix 2X* (Bio-Rad Laboratories, EUA) ou *SYBR*[®] *GreenER*TM *qPCR SuperMix for iCycler*[®] 2x (Life Technologies, EUA) e H₂O DNaseRNase-free (Life Technologies, EUA), obtendo-se uma concentração final de 300nM para os *primers* de *Bmal1* e 50nM para os *primers* do RNA 18S, em soluções independentes. Cada solução foi alíquotada (48µL, sendo cada alíquota suficiente para 2 poços) em tubos *ependorf* e o cDNA de cada amostra foi adicionado de acordo com o gene analisado: 2µL/alíquota para *Bmal1*, 0,5µL/alíquota para RNA 18S. As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa experimental (23µL/poço), com duplicatas específicas para cada gene de interesse. Controles negativos feitos sem cDNA foram incluídos rotineiramente.

O fluoróforo *SYBR Green* intercala-se ao DNA durante sua amplificação, promovendo um aumento da fluorescência (NATH *et al.*, 2000). O *SYBR Green* intercala-se a qualquer fita de DNA que está sendo amplificada, não sendo específico. Para determinar se houve amplificação de produtos inespecíficos, são obtidas *melting curves*. Durante essa fase, a temperatura é aumentada em 0,5°C a intervalos de tempo determinados e a fluorescência dos poços obtida em cada fase. As curvas ideais mostram apenas um pico de queda de fluorescência em cada poço, numa temperatura que coincide com a *melting temperature* do produto esperado (quando o produto se dissocia). Quando há produtos inespecíficos, eles formam outro(s) pico(s) de fluorescência em diferentes temperaturas, sendo esses poços imediatamente excluídos da análise.

Todos os ensaios para multiplex foram realizados em um termociclador iQ5 (BioRad), nas seguintes condições: 7 minutos a 95° C seguido por 45 ciclos de 30 segundos a 95° C e 30 segundos a 60° C. Os ensaios com *Syber Green* foram realizados em um termociclador iCycler (BioRad) nas seguintes condições: 2 minutos a 50°C, 8:30 minutos a 95°C, seguido por 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C e 80 ciclos iniciando a 55°C, com aumento gradativo de 0,5°C por ciclo.

Tabela 1. Sequências dos primers e probes para os ensaios de PCR quantitativo

RNA 18S	<p>Forward: 5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3'</p> <p>Backward: 5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3'</p> <p>Probe: 5'-/TexasRed/TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC/BlackHole/2/-3'</p>
<p><i>Per2</i></p> <p><i>Gallus gallus</i></p> <p>NM_204262.1</p>	<p>Forward: 5'-AGC AAA TGC AGA AAC TAC AAC CA -3'</p> <p>Backward: 5'- CAA CAG TCT TTG GCA GTC CAC CTT-3'</p> <p>Probe: 5'-/56-FAM/AGC TTA TGA AGT CAT CAT GGA CCA GC/3BHQ_1/-3'</p>
<p><i>Bmal1</i></p> <p><i>Gallus gallus</i></p> <p>AF205219.1</p>	<p>Forward: 5'-CTG TGA CAG AGG GAA GAT ACT GT-3'</p> <p>Backward: 5'- TGG CAA TGT CTT TCG GAT GAA GG-3'</p>
<p><i>Clock</i></p> <p><i>Gallus gallus</i></p> <p>NM_204174.2</p>	<p>Forward: 5'- ACC CGC AAC AGT TCC TAC AGA-3'</p> <p>Backward: 5'- GA AAG CAG CAG AGA GGA TAA GC-3'</p> <p>Probe: 5'-/5HEX/ATC CAG GTT ACT TCA CGG GAA TCA G/3BHQ_2/-3'</p>

2.5 - ANÁLISE DOS RESULTADOS

Análise dos dados foi feita pela comparação entre os C_T s controle e experimentais, obtidos 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), é encontrado o ΔC_T que é a diferença entre esse valor para o gene de interesse e para o RNA 18S. A seguir, os valores encontrados para os poços controle foram subtraídos daqueles dos poços experimentais, obtendo-se o $\Delta \Delta C_T$. Colocando-se esse valor como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta \Delta C_T}$) obteve-se quanto o gene está expresso após o tratamento em relação a menor expressão do gene no controle. Para determinar os níveis de significância das possíveis diferenças entre os ZTs, os dados logarítmicos foram comparados por análise de variância *one way* (ANOVA), seguida por Tukey através do programa *Prism* versão 5 (GraphPad Software Inc., EUA). E para determinar os níveis de significância das possíveis diferenças entre grupos tratados com 1 pulso ou 3 pulsos de 12h de glutamato, e seus respectivos controles (2 ou 6 trocas de meio), os dados logarítmicos foram comparados por ANOVA *two-way*, seguida de Bonferroni, também pelo programa *Prism* versão 5. Para comparar a expressão média ao longo de 24 horas dos grupos tratados com 1 ou 3

pulsos de 12 h ou 3 pulsos de 6 h de glutamato e seus respectivos controles (2 trocas de meio com intervalo de 12 h, 6 trocas de meio com intervalos de 6 ou 12h), foi utilizada ANOVA *one way*, seguida de Tukey. Em todas as análises, a diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

3 - RESULTADOS

3.1 - QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE RNAM DO GENE *CLOCK* EM CÉLULAS SUBMETIDAS A TROCAS DE MEIO E PULSOS DE GLUTAMATO

3.1.1 - Duas trocas de meio por 12h x um pulso de glutamato por 12h

O perfil de expressão do gene *Clock* não apresentou nenhuma variação temporal após duas trocas de meio por um período de 12 horas sobre a cultura de células de retina de *Gallus gallus* mantidas em escuro constante por quatro dias. Essa constatação foi comprovada tanto visualmente quanto pelo teste estatístico ANOVA *one way*, (Figura 6A).

Análise do RNAm do gene *Clock* mostrou variação temporal após a administração de 1 pulso de glutamato 100 μ M por um período de 12h. É possível evidenciar um aumento gradativo na expressão do referido gene ao longo dos ZTs, podendo-se observar um aumento pronunciado no ZT15 que foi estatisticamente diferente do ZT0 e ZT3 pela análise de ANOVA *one way* (Figura 6B).

O tratamento das células com um pulso de glutamato altera de maneira significativa a expressão do gene *Clock* quando comparado ao grupo controle (duas trocas de meio). É possível observar um aumento na transcrição nos ZTs 12 e 15 em resposta ao tratamento com o glutamato, quando comparados aos seus respectivos controles. Ainda é importante destacar que a expressão de *Clock* antes arritmica, passa a apresentar uma oscilação após o tratamento com glutamato. Essa alteração imposta pelo tratamento é comprovada estatisticamente pela análise de ANOVA *two-way* (Figura 6C).

Clock

(A) 2 trocas de meio por 12h

(B) 1 pulso de Glutamato 100 μ M por 12h

(C) 1 pulso de Glutamato 100 μ M por 12h

Figura 6 - PCR quantitativo para análise da expressão do gene *Clock* em células de retina de *Gallus gallus* (E8). As células permaneceram em escuro constante (representado pela barra preta) por quatro dias. No ZT0 (9:00 h) do quinto dia, as células receberam uma troca de meio contendo glutamato na concentração 100 μ M e, 12 horas após a aplicação dessa primeira troca de meio (21:00 h – ZT12), as células receberam nova troca de meio para retirada do glutamato. Em paralelo, foram mantidos controles que receberam apenas duas trocas de meio. No ZT0 (9:00 h) do sexto dia, o RNA foi extraído a cada 3h por um período de 24 horas. (A) grupo controle que recebeu duas trocas de meio com intervalo de 12h; (B) grupo tratado que recebeu um pulso de glutamato por 12h; (C) comparação entre os grupos controle e tratado. Valores são a média de expressão do gene *Clock*, normalizada por RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão nas células controle submetidas a duas trocas de meio. Letras representam diferenças significativas por ANOVA *one way*. (*) indica diferença estatística do tratamento em relação ao respectivo controle por ANOVA two-way.

3.1.2 - Seis trocas de meio por 6h x três pulsos de glutamato por 6h

Avaliou-se posteriormente a expressão do gene *Clock*, frente à aplicação de seis trocas de meio por um período de seis horas. O que se observa é que o aumento do número de trocas de meio foi capaz de impor sobre as células uma variação temporal na expressão do gene *Clock*, que não havia sido observada anteriormente nos grupos onde houve apenas duas trocas de meio por 12h. Essa oscilação foi comprovada estatisticamente por ANOVA *one way* evidenciando diferença entre os ZTs 0 e 4 com relação ao ZT8, ponto de menor expressão (Figura 7A). Desse ponto, pode-se observar aumentos gradativos até o ZT20.

Já nos grupos tratados com três pulsos de glutamato por 6h, não foi observado nenhuma variação ao longo dos ZTs analisados. Esses dados são comprovados estatisticamente por ANOVA *one way* (Figura 7B).

O gráfico de comparação entre as duas condições mostra que essa população de células responde às trocas de meio, levando a uma oscilação na expressão do gene *Clock*, contudo, que essas células não sofrem nenhuma interferência do glutamato. ANOVA *two way* não indicou nenhuma diferença estatística entre as duas condições experimentais (Figura 7C).

Clock

(A) 6 trocas de meio por 6h

(B) 3 pulsos de Glutamato 100 μ M por 6h

(C) 3 pulsos de Glutamato 100 μ M por 6h

Figura 7 - PCR quantitativo para análise da expressão do gene *Clock* em células de retina de *Gallus gallus* (E8). As células permaneceram em escuro constante (representado pela barra preta) por quatro dias. No ZT0 (9:00 h) do terceiro, quarto e quinto dia, as células receberam uma troca de meio contendo glutamato na concentração 100µM e, 6 horas após a aplicação dessa primeira troca de meio (21:00 h – ZT12), as células receberam nova troca de meio para retirada do glutamato. Em paralelo, foram mantidos controles que receberam apenas seis trocas de meio. No ZT0 (9:00 h) do sexto dia, o RNA foi extraído a cada 4h por um período de 24 horas. (A) grupo controle que recebeu seis trocas de meio com intervalos de 6h; (B) grupo tratado que recebeu três pulsos de glutamato por 6h; (C) comparação entre os grupos controle e tratado. Valores são a média de expressão do gene *Clock*, normalizada por RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão nas células controle submetidas a seis trocas de meio. Letras representam diferenças significativas por ANOVA *one way*.

3.1.3 - Seis trocas de meio por 12h x três pulsos de glutamato por 12h

De maneira semelhante ao que vimos na expressão do gene *Clock* nas células submetidas a seis trocas de meio com intervalos de 6h, quando as células receberam as mesmas seis trocas de meio agora com intervalos de 12h, também foi possível observar-se uma oscilação em termos de expressão do gene *Clock*. Essa oscilação também foi comprovada estatisticamente por ANOVA *one way* (Figura 9A). Contudo, é possível constatar ainda que as 6 trocas de 12h aumentaram de maneira considerável a amplitude de expressão do gene, cerca de 300 vezes (Figura 8A) quando comparado tanto a uma troca de meio de 12h quanto a três trocas de meio por 6h.

Similarmente ao que aconteceu com a resposta do gene *Clock* a três pulsos de glutamato por 6h, os três pulsos de glutamato de 12h fizeram com que a oscilação previamente observada fosse perdida, e houvesse uma grande diminuição da amplitude de expressão do gene (Figura 8B). Esses dados foram comprovados estatisticamente por ANOVA *one way*.

A comparação entre as duas condições experimentais possibilita observar que a resposta de oscilação na expressão desses gene é devida às sucessivas trocas de meio a qual as células foram submetidas e ainda que o glutamato faz com que essa oscilação seja perdida. É possível se observar a influência do tratamento nos ZTs 0, 3, 6, 9 e 21 quando comparados a seus respectivos controles, por ANOVA *two-way* (Figura 8C).

Clock

(A) 6 trocas de meio por 12h

(B) 3 pulsos de Glutamato 100 μ M por 12h

(C) 3 pulsos de Glutamato 100 μ M por 12h

Figura 8 - PCR quantitativo para análise da expressão do gene *Clock* em células de retina de *Gallus gallus* (E8). As células permaneceram em escuro constante (representado pela barra preta) por quatro dias. No ZT0 (9:00 h) do terceiro, quarto e quinto dia, as células receberam uma troca de meio contendo glutamato na concentração de 100 μ M e, 12 horas após a aplicação dessa primeira troca de meio (21:00 h – ZT12), as células receberam nova troca de meio para retirada do glutamato. Em paralelo, foram mantidos controles que receberam apenas seis trocas de meio. No ZT0 (9:00 h) do sexto dia, o RNA foi extraído a cada 3h por um período de 24 horas. (A) grupo controle que recebeu seis trocas de meio com intervalos de 12h; (B) grupo tratado que recebeu três pulsos de glutamato por 12h; (C) comparação entre os grupos controle e tratado. Valores são a média de expressão do gene *Clock*, normalizada por RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão nas células controle submetidas a duas trocas de meio. Letras representam diferenças significativas por ANOVA *one way*. (*) indica diferença estatística do tratamento em relação ao controle por ANOVA *two way*.

3.2 - QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE RNAM DO GENE *PER2* EM CÉLULAS SUBMETIDAS A TROCAS DE MEIO E PULSOS DE GLUTAMATO

3.2.1 - Duas trocas de meio x um pulso de glutamato por 12h

A expressão do gene *Per2* frente à administração de duas trocas de meio das culturas celulares com intervalos de 12h não apresentou nenhuma variação temporal, de maneira semelhante ao que foi observado para o gene *Clock*, para o mesmo protocolo. Essa constatação foi comprovada estatisticamente por ANOVA *one way* (Figura 9A).

O tratamento com um pulso de glutamato foi capaz de impor sobre a expressão do gene *Per2* uma variação temporal que, pelo perfil do gráfico, parece obedecer um ritmo ultradiano de expressão. Essa variação foi comprovada estatisticamente por ANOVA *one way* (Figura 9B). O tratamento promoveu, ainda, um pronunciado aumento na amplitude de expressão do gene de cerca de 10 vezes, quando comparado ao seu respectivo controle.

A Figura 9C mostra a comparação entre os dois grupos, e possibilita observar a resposta de expressão do gene *Per2* frente ao tratamento com o glutamato. É possível confirmar ainda as interferências do tratamento por ANOVA *two-way*.

Per2

(A) 2 trocas de meio por 12h

(B) 1 pulso de Glutamato 100 μ M por 12h

(C) 1 pulso de Glutamato 100 μ M por 12h

Figura 9 - PCR quantitativo para análise da expressão do gene *Per2* em células de retina de *Gallus gallus* (E8). As células permaneceram em escuro constante (representado pela barra preta) por quatro dias. No ZT0 (9:00 h) do quinto dia, as células receberam uma troca de meio contendo glutamato na concentração 100 μ M e, 12 horas após a aplicação dessa primeira troca de meio (21:00 h – ZT12), as células receberam nova troca de meio para retirada do glutamato. Em paralelo, foram mantidos controles que receberam apenas duas trocas de meio. No ZT0 (9:00 h) do sexto dia, o RNA foi extraído a cada 3h por um período de 24 horas. (A) grupo controle que recebeu duas trocas de meio com intervalo de 12h; (B) grupo tratado que recebeu um pulso de glutamato por 12h; (C) comparação entre os grupos controle e tratado. Valores são a média de expressão do gene *Per2*, normalizada por RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão nas células controle submetidas a duas trocas de meio. Letras representam diferenças significativas por ANOVA *one way*. (*) indica diferença estatística do tratamento em relação ao respectivo controle por ANOVA *two way*.

3.2.2 – Seis trocas de meio por 6h x três pulsos de glutamato por 6h

Diferentemente do observado para o gene *Clock* nesse mesmo desenho experimental, a expressão do gene *Per2*, quando as células foram submetidas a seis trocas de meio por 6h, não sofreu nenhuma oscilação que pudesse ser detectada visualmente ou mesmo por ANOVA *one way* (Figura 10A).

De maneira semelhante ao grupo controle, o tratamento com três pulsos de glutamato por 6h também não apresentou qualquer efeito sobre a expressão temporal do gene *Per2*, dado comprovado estatisticamente por ANOVA *one way* (Figura 10B).

A comparação entre o grupo controle e tratado nesse protocolo experimental, evidenciou uma diferença estatística por influência do tratamento com glutamato (ANOVA *two way*) somente no ZT4 quando comparado ao seu respectivo controle (Figura 10C).

Per2

(A) 6 trocas de meio por 6h

(B) 3 pulsos de Glutamato 100 μ M por 6h

(C) 3 pulsos de Glutamato 100 μ M por 6h

Figura 10 - PCR quantitativo para análise da expressão do gene *Per2* em células de retina de *Gallus gallus* (E8). As células permaneceram em escuro constante (representado pela barra preta) por quatro dias. No ZT0 (9:00 h) do terceiro, quarto e quinto dia, as células receberam uma troca de meio contendo glutamato na concentração 100µM e, 6 horas após a aplicação dessa primeira troca de meio (21:00 h – ZT12), as células receberam nova troca de meio para retirada do glutamato. Em paralelo, foram mantidos controles que receberam apenas seis trocas de meio. No ZT0 (9:00 h) do sexto dia, o RNA foi extraído a cada 4h por um período de 24 horas. (A) grupo controle que recebeu seis trocas de meio com intervalos de 6h; (B) grupo tratado que recebeu três pulsos de glutamato por 6h; (C) comparação entre os grupos controle e tratado. Valores são a média de expressão do gene *Per2*, normalizada por RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão nas células controle submetidas a seis trocas de meio. (*) indica diferença estatística do tratamento em relação ao respectivo controle por ANOVA *two-way*.

3.2.3- Seis trocas de meio por 12h x três pulsos de glutamato por 12h

Células que receberam seis trocas de meio por 12h, diferentemente do que se observou nas seis trocas de meio por 6h, apresentaram uma variação temporal na expressão do gene *Per2* atestada por ANOVA *one way*, conforme visto na Figura 11A.

O tratamento com três pulsos de glutamato parece não afetar a expressão de *Per2*, quando comparado com seu respectivo controle, diferentemente do que ocorre para o gene *Clock* que perdeu sua oscilação temporal imposta pela trocas de meio após o tratamento com glutamato (Figura 11B).

A comparação entre as duas condições na Figura 11C possibilita observar que no grupo tratado com glutamato houve um pico de expressão do gene *Per2* no ZT15 que anteriormente ocorria no ZT12, pontos onde é possível observar influência do tratamento com glutamato em relação ao respectivo controle, constatadas por ANOVA *two-way*.

Per2

(A) 6 trocas de meio por 12h

(B) 3 pulsos de Glutamato 100 μ M por 12h

(C) 3 pulsos de Glutamato 100 μ M por 12h

Figura 11 - PCR quantitativo para análise da expressão do gene *Per2* em células de retina de *Gallus gallus* (E8). As células permaneceram em escuro constante (representado pela barra preta) por quatro dias. No ZT0 (9:00 h) do terceiro, quarto e quinto dia, as células receberam uma troca de meio contendo glutamato na concentração de 100 μ M e, 12 horas após a aplicação dessa primeira troca de meio (21:00 h – ZT12), as células receberam nova troca de meio para retirada do glutamato. Em paralelo, foram mantidos controles que receberam apenas seis trocas de meio. No ZT0 (9:00 h) do sexto dia, o RNA foi extraído a cada 3h por um período de 24 horas. (A) grupo controle que recebeu seis trocas de meio com intervalos de 12h; (B) grupo tratado que recebeu três pulsos de glutamato por 12h; (C) comparação entre os grupos controle e tratado. Valores são a média de expressão do gene *Per2*, normalizada por RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão nas células controle submetidas a duas trocas de meio. Letras representam diferenças significativas por ANOVA *one way*. (*) indica diferença estatística do tratamento em relação ao controle por ANOVA *two way*.

3.3 - QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE RNAM DO GENE *BMAL1* EM CÉLULAS SUBMETIDAS A TROCAS DE MEIO E PULSOS DE GLUTAMATO

3.3.1 – Duas trocas de meio por 12h x um pulso de glutamato por 12h

As células que receberam duas trocas de meio por um período de 12h apresentaram uma variação temporal na expressão do gene *Bmal1*, diferentemente ao que foi visto para os genes *Clock* e *Per2*. Essa constatação foi comprovada estatisticamente por ANOVA *one way*, ocorrendo no ZT9 a maior expressão, que diminuiu gradualmente até o ZT18, ponto de menor expressão (Figura 12A).

O glutamato aplicado em um pulso de 12h fez com que essa oscilação vista nos controles submetidos a trocas de meio se perdesse, indicando que para esse gene o glutamato apresentou um efeito inibitório da oscilação (Figura 12B).

A comparação entre as duas condições experimentais (Figura 12C) deixa evidenciado que o tratamento com o glutamato durante esse período parece ter efeito de abolir a oscilação da expressão do gene *Bmal1*, vista durante as sucessivas trocas de meio. Análise ANOVA *two-way* aponta diferenças estatísticas do tratamento em relação ao controle no ZT9.

Bmal1

(A) 2 trocas de meio por 12h

(B) 1 pulso de Glutamato 100 μ M por 12h

(C) 1 pulso de Glutamato 100 μ M por 12h

Figura 12 - PCR quantitativo para análise da expressão do gene *Bmal1* em células de retina de *Gallus gallus* (E8). As células permaneceram em escuro constante (representado pela barra preta) por quatro dias. No ZT0 (9:00 h) do quinto dia, as células receberam uma troca de meio contendo glutamato na concentração 100 μ M e, 12 horas após a aplicação dessa primeira troca de meio (21:00 h – ZT12), as células receberam nova troca de meio para retirada do glutamato. Em paralelo, foram mantidos controles que receberam apenas duas trocas de meio. No ZT0 (9:00 h) do sexto dia, o RNA foi extraído a cada 3h por um período de 24 horas. (A) grupo controle que recebeu duas trocas de meio com intervalo de 12h; (B) grupo tratado que recebeu um pulso de glutamato por 12h; (C) comparação entre os grupos controle e tratado. Valores são a média de expressão do gene *Bmal1*, normalizada por RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão nas células controle submetidas a duas trocas de meio. Letras representam diferenças significativas por ANOVA *one way*. (*) indica diferença estatística do tratamento em relação ao respectivo controle por ANOVA *two way*.

3.3.2 – Seis trocas de meio por 6h x três pulsos de glutamato por 6h

Nos grupos de células que receberam seis trocas de meio por 6h, não foi possível observar nenhuma variação em termos de expressão do gene *Bmal1*, ao longo das 24 horas analisadas. Essa resposta foi comprovada estatisticamente por ANOVA *one way* (Figura 13A).

De maneira semelhante, a expressão do gene *Bmal1* nas células tratadas com três pulsos de glutamato de 6h, se manteve inalterada, indicando que nem as trocas do meio nem o glutamato favoreceram a oscilação temporal da expressão desse gene (Figura 13B).

Na Figura 13C os dois protocolos experimentais concomitantemente agrupados permitem observar a ausência de influência na resposta de expressão desse gene, tanto das trocas de meio quanto dos pulsos de glutamato.

Bmal1

(A) 6 trocas de meio por 6h

(B) 3 pulsos de Glutamato 100 μ M por 6h

(C) 3 pulsos de Glutamato 100 μ M por 6h

Figura 13 - PCR quantitativo para análise da expressão do gene *Clock* em células de retina de *Gallus gallus* (E8). As células permaneceram em escuro constante (representado pela barra preta) por quatro dias. No ZT0 (9:00 h) do terceiro, quarto e quinto dia, as células receberam uma troca de meio contendo glutamato na concentração 100µM e, 6 horas após a aplicação dessa primeira troca de meio (21:00 h – ZT12), as células receberam nova troca de meio para retirada do glutamato. Em paralelo, foram mantidos controles que receberam apenas seis trocas de meio. No ZT0 (9:00 h) do sexto dia, o RNA foi extraído a cada 4h por um período de 24 horas. (A) grupo controle que recebeu seis trocas de meio com intervalos de 6h; (B) grupo tratado que recebeu três pulsos de glutamato por 6h; (C) comparação entre os grupos controle e tratado. Valores são a média de expressão do gene *Clock*, normalizada por RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão nas células controle submetidas a seis trocas de meio.

3.3.3 – Seis trocas de meio por 12h x três pulsos de glutamato por 12h

Diferente do observado nos protocolos anteriores, a expressão de *Bmal1* quando as células sofreram seis trocas de meio por 12h, sofreu variações temporais de expressão que são estatisticamente corroboradas por ANOVA *one way*, com um pronunciado pico de expressão no ZT18 diferente de todos os outros ZTs (Figura 14A).

A expressão de *Bmal1* frente ao tratamento com três pulsos de glutamato por 12h não impôs grandes alterações na expressão quando comparado ao seu respectivo controle, mesmo as respostas estatísticas que foram previamente observadas por ANOVA *one way*, foram mantidas nessa condição (Figura 14B).

A comparação entre os dois grupos evidencia influência do tratamento com o glutamato, sobretudo no ZT21 comparado ao seu respectivo controle (Figura 14C).

Bmal1

(A) 6 trocas de meio por 12h

(B) 3 pulsos de Glutamato 100 μ M por 12h

(C) 3 pulsos de Glutamato 100 μ M por 12h

Figura 14 - PCR quantitativo para análise da expressão do gene *Bmal1* em células de retina de *Gallus gallus* (E8). As células permaneceram em escuro constante (representado pela barra preta) por quatro dias. No ZT0 (9:00 h) do terceiro, quarto e quinto dia, as células receberam uma troca de meio contendo glutamato na concentração de 100µM e, 12 horas após a aplicação dessa primeira troca de meio (21:00 h – ZT12), as células receberam nova troca de meio para retirada do glutamato. Em paralelo, foram mantidos controles que receberam apenas seis trocas de meio. No ZT0 (9:00 h) do sexto dia, o RNA foi extraído a cada 3h por um período de 24 horas. (A) grupo controle que recebeu seis trocas de meio com intervalos de 12h; (B) grupo tratado que recebeu três pulsos de glutamato por 12h; (C) comparação entre os grupos controle e tratado. Valores são a média de expressão do gene *Bmal1*, normalizada por RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão nas células controle submetidas a duas trocas de meio. Letras representam diferenças significativas por ANOVA *one way*. (*) indica diferença estatística do tratamento em relação ao controle por ANOVA *two way*.

3.4 - COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS COM DUAS TROCAS DE MEIO DE 12H X SEIS TROCAS DE MEIO POR 6H X SEIS TROCAS DE MEIO POR 12H

A comparação entre os grupos que sofreram duas trocas de meio por 12h e três trocas de meio por 12h, com os grupos que sofreram seis trocas de meio por 6h, foi feita através da análise estatística das médias globais de todos os ZTs de extração. ANOVA *one way* não atestou nenhuma diferença significativa para os três genes analisados entre os três grupos avaliados. No entanto, para o gene *Clock*, o valor de *p* foi de 0,035 indicando diferença entre os grupos.

Tabela 2: Efeito das trocas de meio

Comparação entre médias dos grupos com duas trocas de meio de 12h x grupos de seis trocas de meio por 6h x grupos de seis trocas de meio por 12h			
	Duas trocas de meio por 12h	Seis trocas de meio por 6h	Seis trocas de meio por 12h
<i>Clock</i>	1,38 ± 0,58*	2,17 ± 1,14*	157,45 ± 85,84*
<i>Per2</i>	1,68 ± 1,00	2,26 ± 2,18	2,35 ± 1,52
<i>Bmal1</i>	2,53 ± 1,48	3,98 ± 3,65	0,53 ± 0,51

(*) indica diferença entre seis trocas de meio por 12h em relação aos outros 2 grupos.

3.5 - COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS COM UM PULSO DE GLUTAMATO DE 12H X TRÊS PULSOS DE GLUTAMATO POR 6H X TRÊS PULSOS DE GLUTAMATO POR 12H

A comparação entre os grupos que receberam um pulso de glutamato por 12h e três pulsos de glutamato por 12h, com os grupos que sofreram três pulsos de glutamato por 6h, foi feita através da análise estatística das médias globais de todos os ZTs. ANOVA *one way* atestou diferença significativa do grupo três pulsos de glutamato por 12h em relação aos outros dois grupos para o gene *Clock*.

Tabela 3: Efeito dos pulsos de glutamato

Comparação entre grupos com um pulso de glutamato por 12h x três pulsos de glutamato por 6h x três pulsos de glutamato por 12h			
	Um pulso de glutamato por 12h	Três pulsos de glutamato por 6h	Três pulsos de glutamato por 12h
<i>Clock</i>	1,91 ± 1,14*	2,53 ± 1,96*	49,74 ± 21,48*
<i>Per2</i>	13,47 ± 9,59	1,01 ± 0,55	2,02 ± 1,69
<i>Bmal1</i>	2,18 ± 1,49	2,67 ± 2,81	0,60 ± 0,76

(*) indica diferença entre três pulsos de 12h e os outros 2 grupos.

As comparações apresentadas nas tabelas 2 e 3 são agora apresentadas graficamente, somente para os grupos que receberam duas trocas de meio x seis trocas de meio ou tratadas por um pulso ou três pulsos de glutamato, ambos por 12h (Figuras 15 e 16). É possível visualizar que os três genes avaliados respondem de maneira diferente a duas e a seis trocas de meio por 12h, sendo que para o gene *Clock* observa-se um forte aumento de amplitude de expressão em todos os pontos analisados, de cerca de 200 vezes no ZT0 após seis trocas de meio, quando comparado a duas trocas de meio (Figura 15). Adicionalmente é possível visualizar uma marcante oscilação após a administração das seis trocas de meio por 12h. Diferentemente, os genes *Per2* e *Bmal1* apresentaram apenas diferenças pontuais. *Per2* mostrou um pico de expressão no ZT12 após as seis trocas de meio (Figura 15) enquanto que para o gene *Bmal1* é possível observar uma diminuição na transcrição no ZT9 (Figura 15).

Figura 15 – PCR quantitativo para análise da expressão dos genes *Clock*, *Per2* e *Bmal1*. Painel de comparação entre os protocolos de duas trocas de meio de 12h e de seis trocas de meio de 12h em células de retina de *Gallus gallus*.

Similar ao que foi observado para as trocas de meio, a repetição do pulso de glutamato estimula a transcrição do gene *Clock* em todos os ZTs analisados (Figura 16). Para o gene *Per2*, diferente do observado nas trocas de meio, os pulsos de glutamato promovem, além de um forte aumento de amplitude de expressão, uma oscilação que apresenta um perfil bifásico (Figura 16). Já para o gene *Bmal1*, assim como nas trocas de meio, os pulsos de glutamato parecem não exercer efeito sobre sua transcrição (Figura 16).

Figura 16 – PCR quantitativo para análise da expressão dos genes *Clock*, *Per2* e *Bmal1*. Paineis de comparação entre os protocolos de tratamento com um pulso de glutamato por 12h e com três pulsos de glutamato por 12h em células de retina de *Gallus gallus*.

4 - DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra que os diferentes genes de relógio na retina de *Gallus gallus* apresentam diferentes respostas frente às trocas de meio e frente ao tratamento com o glutamato. O gene *Clock* responde com ativação da transcrição para ambos os tratamentos, de forma dependente da repetição dos estímulos. Já para o gene *Per2* o tratamento com glutamato impõe uma oscilação de expressão com um ritmo ultradiano, enquanto que as trocas de meio não determinam alterações na transcrição. Todavia, a expressão do gene *Bmal1* não é afetada consideravelmente por nenhum dos tratamentos.

Sabe-se que uma ampla gama de processos obedecem a um padrão ultradiano de ocorrência, dentre esses a secreção de leptina, hormônio liberado pelo tecido adiposo (AHMAD *et al.*, 2001).

No organismo íntegro sabe-se que os relógios periféricos estão subordinados ao relógio central (NSQ). Portanto, os estímulos e informações provenientes do ambiente são percebidas pelos organismos através de múltiplos receptores (mecanismos aferentes) que são especializados para cada tipo de estímulo. Essas informações promovem um ajuste dos eventos fisiológicos internos dos organismos para sincronização com o ambiente no nível do relógio central (oscilador). Uma vez sincronizado, o relógio central envia projeções (mecanismos eferentes) a outros órgãos do organismo (relógios periféricos) por meio de neurotransmissores conduzindo à sua sincronização. O somatório desses três componentes (mecanismos aferentes, oscilador central e mecanismos eferentes) compõe o chamado sistema circadiano (HASTINGS *et al.*, 2004).

Nesse sentido, a retina se apresenta como um excelente modelo de estudo do sistema circadiano e de relógios periféricos, uma vez que apresenta confinado no mesmo tecido, todos os três componentes do sistema circadiano. Os mecanismos aferentes são representados pelos fotorreceptores que apresentam a capacidade de perceber a informação luminosa proveniente do ambiente, um sistema de oscilação intrínseco representado pela expressão dos genes de relógio que é modulada frente à chegada do estímulo externo e ainda um sistema de eferência representado por processos que obedecem a um padrão rítmico na retina, como a expressão de genes, secreção de hormônio etc.

O que se pode observar no presente trabalho é que a expressão do gene *Clock* nessa população celular parece sofrer uma forte influência das seis trocas de meio com intervalos de 12h. Nesse grupo, é possível observar um aumento de amplitude de expressão do gene de cerca de 300 vezes, quando comparado a 2 trocas de meio com intervalos de 12h. Já em células que sofreram também seis trocas de meio, porém com um intervalo de 6h, não foi possível observar nenhuma alteração em termos de expressão do gene *Clock*. Tais resultados levam a conclusão de que não somente a repetição do estímulo de trocas de meio é importante, mas também a duração e o intervalo entre as trocas de meio são fatores que devem ser levados em consideração.

Diversos trabalhos realizados em cultura de células têm defendido que trocas de meio funcionam como uma importante pista ambiental e, por consequência, podem eventualmente agir como um poderoso fator de acoplamento entre essas células. Trabalhos com fibroblastos de mamíferos em cultura transfectados com o gene da luciferase no promotor dos genes de relógio e monitorados durante alguns dias mostram que cada célula expressa os genes de relógio e que esses genes oscilam de maneira individual em cada célula com seu próprio período e em sua própria fase. O que existe nessa condição é ausência de um acoplamento entre as células. A aplicação de trocas de meio sobre essa população de células faz com que haja um acoplamento entre as células fazendo com que elas oscilem de maneira sincronizada conduzindo a expressão dos genes de relógio para o mesmo período e a mesma fase em todas as células (TAKAHASHI *et al.*, 2004; BALSALOBRE *et al.*, 1998). O tratamento de culturas de fibroblastos de mamíferos com choque de soro comprovou que este estímulo era também capaz de impor nessas células uma expressão sincronizada dos genes de relógio (BALSALOBRE *et al.*, 2000).

A retina é um tecido composto por diferentes subtipos de células: cones e bastonetes, células horizontais, bipolares, amácrinas e ganglionares (KOLB, 1994; BOYCOTT & WÄSSLE, 1999). A dinâmica de liberação de glutamato na retina ocorre de forma constitutiva, porém originária de diferentes células. Durante a fase de escuro, os fotorreceptores se encontram despolarizados e liberando glutamato pelos seus axônios em neurônios de 2ª ordem. Quando o estímulo fótico é aplicado esses fotorreceptores sofrem processo de hiperpolarização, levando a interrupção da liberação de glutamato, o que possibilita a transmissão da informação. A transmissão da informação agora ocorrerá via liberação de glutamato pelas populações de células das outras camadas retinianas, como as amácrinas e as horizontais. Essa interrupção na

liberação de glutamato proveniente dos fotorreceptores ocorre quando os fótons de luz atingem essas células deflagrando uma via de sinalização que em última instância levará à sua hiperpolarização. Nesse momento o glutamato passa a não mais ativar os receptores metabotrópicos de glutamato do tipo 6 (mGluR6), que apresentam ação inibitória quando estimulados. Essa interrupção de uma ação inibitória conduz à liberação de glutamato pelas subseqüentes células das outras camadas retinianas. A arquitetura celular retiniana não permite que esses dois momentos de liberação de glutamato se sobreponham (NEWHOUSE, 1957). Todavia, quando as células são extraídas diretamente do tecido, dissociadas e colocadas em uma cultura mista de células, toda essa organização retiniana se perde e o glutamato passa então a comunicar indiscriminadamente todas as populações celulares que compõem a retina. Portanto, de maneira geral, na cultura de células de retina o glutamato está presente de forma constitutiva tanto na fase clara como na fase escura.

De maneira geral, os tratamentos com glutamato foram administrados sempre entre as 9:00 e 15h (tratamento de 6h) e entre 9:00 e 21:00h (tratamento de 12h), ou seja, na fase de claro subjetivo (momento em que as células estariam na fase clara caso estivessem submetidas a ciclos claro-escuro). Contudo, como as células estavam continuamente no escuro, a taxa de liberação de glutamato basal seria proveniente das correntes de escuro dos fotorreceptores. Estudos realizados com retinas dissociadas do anfíbio *Xenopus leavis* contendo apenas fotorreceptores e o epitélio retiniano pigmentar mensuraram a taxa de liberação de glutamato nos dois momentos: claro e escuro. Os resultados apontam que, durante a fase de claro, a média de liberação de vesículas de glutamato por essas células frente a um estímulo luminoso de $40\mu\text{W}/\text{cm}^2$ de intensidade por 2h foi de $0,37 \pm 0,04$ pmol/retina por minuto. Enquanto que durante as correntes de escuro, a taxa média de liberação de vesículas de glutamato foi de $0,77 \pm 0,07$ pmol/retina por minuto. Ou seja, a liberação de glutamato induzida pelo escuro nos fotorreceptores é duas vezes maior quando comparada à liberação de glutamato durante a fase clara (SCHMITZ & WITKOVSKY, 1996).

Os tratamentos com glutamato na concentração de $100\mu\text{M}$ em culturas mantidas no escuro só aumentaram ainda mais a concentração do neurotransmissor na população de células que, de acordo com dados da literatura, já é caracteristicamente alta. A cultura mista de células de retina de *Gallus gallus* apresenta, além dos neurônios, células da glia, as quais estão intimamente relacionadas com mecanismos de recaptação do glutamato e a consequente inativação de sua ação no espaço extracelular. Esse

excesso de glutamato ocasionado pela alta taxa basal de glutamato liberado pelos fotorreceptores somado ao administrado pelo tratamento pode ter eventualmente desencadeado mecanismos de neuroproteção através da recaptação de glutamato pelas células da glia. Estudos têm mostrado que células em culturas são muito sensíveis a altas concentrações de glutamato e ainda que níveis de glutamato presentes na ordem de micromolar já são capazes de conduzir à morte neuronal, caso esses neurônios não apresentem mecanismos de proteção contra os efeitos excitotóxicos desse neurotransmissor.

Trabalhos anteriores apontam que células de retina de *Gallus gallus* do oitavo dia embrionário, mantidas em escuro constante e tratadas com um pulso de glutamato de 12h na concentração de 100 μ M, passam a apresentar um ritmo circadiano na expressão do gene *Clock* atestado por análises de ritmos pelo programa estatístico COSANA ($p=.04$). Esse padrão de sincronização foi visto na linhagem de galinhas *Rhode Island*, que caracteristicamente são aves pigmentadas (LIMA *et al.*, 2010).

Contudo, no presente trabalho, essa resposta de sincronização em um ritmo circadiano observada para o gene *Clock* nos trabalhos de Lima e colaboradores, não foi obtida. Utilizamos, entretanto, ovos de galinhas da linhagem *White Leghorn* que caracteristicamente são aves sem nenhum tipo de pigmentação. Essa ausência de resposta pode eventualmente ser atribuída ao fato de que trabalhamos com diferentes linhagens. Essa variação de respostas a um mesmo estímulo já foi constatada em camundongos de diferentes linhagens.

A perfeita relação entre a ausência de pigmentação existente nessa linhagem de galinhas com a perda de resposta de sincronização observada previamente, ainda permanece pouco esclarecida. Trabalhos têm demonstrado, entretanto, que mamíferos albinos apresentam déficits específicos em suas retinas bem como dos padrões de interseção de seus quiasmas ópticos, comprovando que a melanina é um componente crucial para o desenvolvimento normal do sistema visual (JEFFERY, 1997). Esses estudos vêm mostrando que a ausência de melanina durante o desenvolvimento do sistema visual, característica em indivíduos albinos, leva a um baixo desenvolvimento (*underdevelopment*) da porção central da retina, bem como gera um número reduzido de bastonetes. Esses dados são ainda corroborados pelo fato de que a introdução de um gene de tirosinase funcional, a enzima chave no processo de síntese de melanina, em camundongos e coelhos albinos, conduz a uma correção nas anormalidades de desenvolvimento da retina (JEFFERY, 1994).

A produção das células retinianas e a diferenciação das células nas camadas da retina são processos separados. Cada um desses processos ocorre em dois momentos temporais diferentes. As células ganglionares e os cones surgem em um primeiro momento e posteriormente, os bastonetes e as células bipolares aparecem em um segundo momento. A camada de células ganglionares é a primeira a dar início ao seu processo de diferenciação. Uma vez completado, as outras camadas dão início sequencialmente à suas diferenciações, sendo a camada nuclear externa a última a se diferenciar (HAYES, 1976; YOUNG, 1983; YOUNG, 1985).

A ausência das respostas de sincronização para o gene *Clock* pode ter sido gerada pelo fato de que as células que seriam responsáveis por essa resposta nas linhagens de galinhas pigmentadas podem ainda não ter atingido o seu completo estágio de diferenciação na linhagem despigmentada, em decorrência da ausência ou baixa produção de melanina e/ou não expressarem o elenco de receptores capazes de reconhecer o sinal do neurotransmissor glutamato como um possível agente de sincronização.

A distribuição e densidade das diferentes populações de células na retina variam com relação à espécie analisada. Tais diferenças na distribuição dessas células na retina implicam em diferenças na quantidade de glutamato que é liberado por cada tipo celular, em cada momento. Trabalhos apontam que do total de células que compõem as diferentes camadas retinianas, os fotorreceptores representam cerca de 5%, o que permite pensar que a taxa basal de liberação de glutamato é mais baixa quando proveniente dos fotorreceptores do que quando comparado ao que é liberado pelas células amácrinas, bipolares e ganglionares. Embora se conheça a concentração de glutamato liberada pelos fotorreceptores na fase escura como mencionado acima, não se têm dados sobre a quantidade de glutamato liberado pelas outras células que compõem as outras camadas retinianas na fase clara (KOLB, 1994).

Os trabalhos de Lima e colaboradores mostraram que a expressão do gene *Per2* em células de retina de *Gallus gallus* mantidas em escuro constante e tratadas com duas trocas de meio por 12h não sofreu uma variação de expressão que obedecesse a um padrão rítmico. Da mesma maneira, o tratamento dessas células com um pulso de glutamato por 12h não impôs nenhuma variação rítmica de expressão nesse gene. Os dados apresentados no presente trabalho apontam que as células de retina mantidas em escuro constante e que sofreram duas trocas de meio não sincronizaram a expressão do gene *Per2*, de maneira semelhante ao que foi observado nos trabalhos de Lima e

colaboradores. Contudo, quando as células foram mantidas em escuro constante e tratadas com um pulso de glutamato na concentração de 100 μ M por 12h, o gene *Per2* passou a oscilar de maneira rítmica indo de encontro com os dados apresentados pelo trabalho anterior.

Vários trabalhos têm mostrado variações rítmicas de expressão do gene *Per2* em resposta a diferentes estímulos e diferentes tratamentos, principalmente a um pulso de luz. Em neurônios do NSQ de mamíferos, o glutamato liberado pelos terminais axonais das células ganglionares ativa receptores ionotrópicos de glutamato, do tipo NMDA, que induzem um influxo de cálcio. Esse influxo de cálcio faz com que as proteínas quinases dependentes de cálcio como a PKC e a CAMKII ativem uma óxido nítrico sintase neuronal (NOSn) levando à produção de NO. Este, em última instância, levará à ativação de uma PKG produzindo GMPc que ativa fatores de transcrição levando à expressão dos genes *Per1* e *Per2* (FERREYRA & GOLOMBECK, 2001). Esses dados ressaltam a alta responsividade da família de genes *Per* frente a um estímulo luminoso, sendo este gene, elencado como o primeiro a ser expresso frente a um pulso de luz tanto em modelos *in vitro* quanto em modelos *in vivo*, conduzindo assim a um *resetting* do relógio central e posteriormente à sincronização da expressão dos outros genes de relógio que compõem sua maquinaria.

De maneira semelhante ao observado para o gene *Per* em células que compõem o relógio central (NSQ), mecanismo de expressão similar é descrito em tecidos periféricos. Em melanóforos do anfíbio *Xenopus laevis* tratados com um pulso de luz de 10 minutos, o gene *Per1* é diretamente responsivo ao estímulo luminoso, tendo seu pico de expressão 6h após a aplicação do estímulo (MORAES *et al.*, 2014). Os melanóforos de *Xenopus laevis* são células que apresentam em sua membrana plasmática o fotopigmento melanopsina, responsável por mediar a resposta a certos comprimentos de onda que ocasionarão respostas fisiológicas específicas nessas células como a dispersão de grânulos de pigmento.

O que se pode observar é que ambas as estruturas anteriormente citadas (NSQ e melanóforo de *Xenopus laevis*), onde o gene *Per* é diretamente responsivo à luz, apresentam uma íntima relação com fenômenos luminosos. Dentre todos os tecidos, a retina é o que mais está em contato com a luz e consequentemente apresenta maior responsividade, em função da ampla gama de células fotorreceptoras existentes ao longo das camadas de células que compõem a rede celular retiniana. Seria, portanto, de se esperar que o gene *Per* também tivesse um importante papel no funcionamento da

maquinaria molecular que controla os genes de relógio nesse tecido. De fato, os dados apresentados neste trabalho corroboram essa hipótese mostrando que, após a aplicação de um pulso de glutamato por 12h, considerado nesse tecido como um importante sinalizador da luz, aparece um ritmo de expressão do gene *Per2*. Esses dados sugerem que esse gene pode, eventualmente, ser o primeiro a responder à luz e/ou ao glutamato levando a um aumento de sua amplitude de expressão o que, em seguida, ativa a expressão dos outros genes que fazem parte da maquinaria de funcionamento relógio, bem como de genes controlados por genes de relógio, controlando juntos todos os fenômenos fisiológicos rítmicos nesse tecido. Assim, esse mecanismo de sincronização visto para a expressão do gene *Per2* é de extrema importância na manutenção da homeostase da retina.

Vários estudos apontam uma considerável importância do gene *Per2* na regulação do sistema circadiano e sua consequente participação na regulação de uma série de funções cerebrais, incluindo uma importante modulação do sistema glutamatérgico. Camundongos mutantes *Per2^{Brdm1}*, os quais não apresentam o domínio PAS de interação proteína-proteína, apresentam grandes alterações no funcionamento homeostático dos sistemas glutamatérgicos. Uma baixa expressão de transportadores *Eaat1* (*excitatory amino acid transporter 1*, também conhecido como *Glast* e codificado pelo gene *Slc1a3*), responsáveis pelo processo de recaptação do neurotransmissor nos astrócitos, é observada nesses animais. Como consequência, a concentração de glutamato aumenta no espaço extracelular desses indivíduos. Mais estudos comprovaram, adicionalmente, que esse evento está intimamente relacionado com o aumento da ingestão de álcool por esses animais e ainda que o tratamento com acamprosato, um fármaco que reduz drasticamente os níveis de glutamato no espaço extracelular, contorna esse quadro de ingestão alcoólica. Juntos, esses dados estabelecem um elo entre glutamato e disfunções no sistema circadiano pelo gene *Per2* (SPANAGEL *et al.*, 2005).

A ação do pulso de glutamato de 12h aumentando a expressão do gene *Per2* e impondo uma expressão ultradiana desse gene, promoveria nesse sentido, um processo de *upregulation* na expressão dos transportadores *Eaat1* que, por sua vez, levaria a um mecanismo de neuroproteção em decorrência da recaptação e inativação do glutamato no espaço extracelular.

O fraco efeito modulatório exercido pelo glutamato nessa linhagem de células de retina de embrião de galinha para o gene *Bmal1* pode ser atribuído ao fato de que em

função de pertencer à mesma alça do gene *Clock*, o gene *Bmal1* seria, posteriormente, estimulado após a sincronização do gene *Per2*.

A retina é composta por um amplo elenco de receptores de glutamato pertencentes às duas grandes famílias de receptores: ionotrópicos e metabotrópicos. Oster e colaboradores (2003) comprovaram, através de ensaios de imunohistoquímica, a existência das três classes de receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e Cainato) na retina de *Gallus gallus*. Estudos de imunohistoquímica e técnica de imagem de cálcio demonstraram também a expressão de receptores metabotrópicos de glutamato pertencentes ao grupo I (mGluR1 e mGluR5) em células de retina de *Gallus gallus*. Esses receptores atuam através da ativação de PLC na membrana levando a hidrólise de fosfolipídeos de membrana em IP₃ que se difunde pela célula liberando estoques intracelulares de cálcio, além de DAG que ativa PKC (KREIMBORG *et al.*, 2001).

A cinética de receptores ionotrópicos de glutamato do tipo não-NMDA (AMPA e Cainato) mostra que o tempo de dessensibilização desses receptores canais em respostas a 1-10 mM de glutamato se encontra em torno de 1-16 ms após a administração do mesmo. Esse intervalo de tempo está relacionado aos tipos de subunidades que compõem o tetrâmero na formação do canal. Dependendo do arranjo entre os diferentes tipos de subunidades, o receptor pode ter um maior ou menor tempo de dessensibilização. Já os receptores do tipo NMDA apresentam tempos de dessensibilização maiores girando em torno de 260-600 ms dependendo também do tipo de subunidade na composição do receptor (OZAWA *et al.*, 1998). Apesar da dose administrada em nossos experimentos (100 uM) ter sido menor do que a relatada nos experimentos acima citados, a ação do glutamato por esse período, de alguma forma, pode ter levado também a um processo de dessensibilização da resposta, possivelmente via receptores ionotrópicos.

Com relação aos receptores metabotrópicos, a literatura tem mostrado que a incubação de terminais nervosos do hipocampo com concentrações de glutamato de 1-3,5 µM leva a um processo de dessensibilização desses receptores que controlam subsequentes liberações de glutamato. Esses experimentos apontam que a incubação dos terminais axonais do hipocampo que liberam glutamato pela ativação de outro subtipo de mGluR, com um facilitador de liberação de glutamato resulta na interrupção da liberação de glutamato estimulada pelo receptor metabotrópico uma vez que esses receptores sofreram mecanismo de dessensibilização. Outros trabalhos utilizando agonistas e antagonistas do receptor mGluR6 provam que as correntes de transdução

evocadas pela estimulação desse receptor sofrem mecanismo de dessensibilização também dependente de cálcio e que o tempo necessário para a ocorrência dessa dessensibilização é de 1s (NAWY, 2004).

Estudos em terminais nervosos de neurônios corticais têm mostrado que a resposta a uma estimulação inicial com agonistas de receptores metabotrópicos de glutamato conduz a uma facilitação da liberação de glutamato por uma via de sinalização intracelular que envolve ativação de PLC, hidrólise de fosfolípidos de membranas, síntese de DAG e consequente ativação de PKC. Contudo a ativação do receptor por um período prolongado leva a um mecanismo de dessensibilização ocasionado pela interrupção na produção de IP_3 e de DAG o que, por sua vez, impede a ativação de PKC, interrompe a entrada de Ca^{+2} , resultando na interrupção da liberação de glutamato (PRIETO *et al.*, 1998).

Trabalhos que mostram a dinâmica do glutamato ao longo do sistema nervoso apontam que exposições de neurônios corticais a glutamato em concentrações variantes de 5 a 100 μ M foram capazes de produzir mudanças morfológicas nesses neurônios cerca de 90 segundos após a administração do neurotransmissor. Contudo a permanência desse tratamento por períodos acima de 5 minutos conduzia a processos de neurodegeneração (KRIEGSTEIN, 1987).

Em função de um possível processo de dessensibilização dos receptores de glutamato optou-se por diminuir o período de permanência do neurotransmissor nas culturas para um período de 6h. Aumentamos também o número de pulsos no intuito de investigar se a repetição das pistas associada a um menor tempo de exposição das células ao glutamato levaria à sincronização dos genes de relógio.

Na condição experimental onde houve administração de três pulsos de glutamato por 6h pode se observar, entretanto, que o neurotransmissor não foi capaz de impor um padrão de oscilação para nenhum dos três genes avaliados, levando a conclusão de que nessa população celular o glutamato nessa concentração não é capaz de modular a expressão dos genes de relógio.

Este trabalho traz novos *insights* a respeito da dinâmica da expressão de genes de relógio na retina de *Gallus gallus* e de como essa dinâmica sofre influência tanto de trocas de meio como do glutamato, um neurotransmissor de extrema importância nesse tecido. Contudo, novos estudos devem ser fomentados no sentido de se elucidar as vias pelas quais o glutamato leva ao perfil de oscilação observado e ainda quais receptores são responsáveis por mediar essa resposta.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINO, P.V.; FERREYRA, G.A.; MURAD, A.D.; WATANABE, Y.; GOLOMBEK, D.A. (2004) Diurnal, circadian and photic regulation of calcium/calmodulin-protein kinase II and neuronal nitric oxide synthase in the hamster suprachiasmatic nuclei. **Neurochemistry** 44, 617–625.
- AHMED, M.L.; ONG K. K. L.; WATTS, A.P.; MORRELL, D. B. (2001) Elevated leptin levels are associated with excess gains in fat mass in girls, but not boys, with type 1 diabetes: Longitudinal study during adolescence. **J. Clin. Endocrinol. & Metabol.** 86, 31188-31193.
- AKAZAWA, C.; SHIGEMOTO, R.; BESSHO, Y.; NAKANISHI, S.; MIZUNO, N. (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. **J. Comp. Neurol.** 347, 150-160.
- BALSALOBRE, A.; DAMIOLA, F.; SCHIBLER, U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. **Cell** 93, 929-937.
- 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, 2344-2347.
- BENEDITO-SILVA, A. (2003). Aspectos metodológicos da cronobiologia. In Marques N, Mena-Barreto LS (Eds). Cronobiologia: Princípios e aplicações. Sao Paulo: Edusp, pp. 297-320.
- BOYCOTT, B.; WASSLE, H. Parallel processing in the mammalian retina: the molecular substrate for visual signal processing. **Curr. Eye Res.** 25, 327-331.
- BRIAN, S.; MELDRUM, MICHAEL, A.R. (2007) Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development. **Neurotherapeutics** 4, 18–61.
- CHEN, L.; HUANG, L.Y. (1992) Protein kinase C reduces Mg^{2+} block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. **Nature** 356, 521-523.
- COLLINGRIDGE, G. (1987) The role of NMDA receptors in learning and memory. **Nature** 330, 604-605.
- CONN, P.; PINN, J. (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 37, 205-237.

- CORNELISSEN, G.; HALBERG, F.; STEBBINGS, J.; HALBERG, E.; CARANDENTE, F.; HIS, B. (1980) Chronobiometry with pocket calculators and computer systems. **Ric. Clin. Lab.** 10, 333-385.
- DAVID, K. W.; SEUNG-HEE, YOO.; ANDREW, C.; LIU, J. S.; TAKAHASHI, S.; STEVE, A. KAY. (2004) Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. **Curr. Biol.** 14, 2289–2295.
- DAS, S.; SASAKI, Y.F.; ROTHE, T.; PREMKUMAR, L.S.; TAKASU, M.; CRANDALL, J.E.; DIKKES, P.; CONNER, D.A.; RAYUDU, P.V.; CHEUNG, W. (1998) Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. **Nature** 393, 377-381.
- DE VRIES, S.H. (2000) Bipolar Cells Use Kainate and AMPA Receptors to Filter Visual Information into Separate Channels. **Neuron** 28, 847–856.
- DINGLELINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S.F. (1999) The glutamate receptor ion channel. **Pharmacol. Rev.** 51, 7-61.
- EULER, T.; WASSLE, H. (1995) Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. **J. Comp. Neurol.** 361, 461-478.
- FERREYRA, G.A.; GOLOMBEK, D.A. (2001) Rhythmicity of the cGMP-related function in the circadian system. **Am. J. Physiol.** 280, 1348–1355.
- FINDLAY, J.B.C.; PAPPIN, D.J.C. (1986) The opsin family of proteins. **Biochem. J.** 238, 625-642.
- FISCHER, A.J. (2005) Neural regeneration in the chick retina. **Prog. Retin. Eye Res.** 24, 161-182.
- FISCHER, A.J.; BONGINI, R. (2003) Turning Müller glia into neural progenitors in the retina. **Mol. Neurobiol.** 42, 199-209.
- FISCHER, A.J.; REH, T.A. (2003) Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. **Glia** 43, 70-76.
- FOSTER, R.G., DAVIES, W.L., HANKINS, M.W. (2010) Vertebrate ancient opsin and melanopsin: divergent irradiance detectors. **Photochem. Photobiol. Sci.** 9, 1444-1457.
- GOLOMBEK, D.A.; RALPH, M.R. (1994) KN-62, an inhibitor of Ca^{+2} /calmodulin kinase II, attenuates circadian responses to light. **Neuroreport** 5, 1638–1640.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H.L. (1951) A series of normal stages in the development of chick embryo. **J. Morphol.** 88, 49-92.

- HARDIE, R.C. (2001). Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. **J. Exp. Biol.** 204, 3403–3409.
- HARDIE, R.C.; RAGHU, P. (2001). Visual transduction in *Drosophila*. **Nature** 413, 186–193.
- HASTINGS, M.H.; MAYWOOD, E.S.; O'NEIL, J.S. (2008) Cellular circadian pacemaking and the role review of cytosolic rhythms. **Curr. Biol.** 18, 805-815.
- HASTINGS, J.W.; RUSAK, B.; BOUOUS, Z. (1991) Circadian rhythms: The physiology of biological timing. **Neural Integr. Physiol.** 34, 435-546.
- HAYES, B.P. (1976) The distribution of intercellular gap junctions in the developing retina and pigment epithelium of *Xenopus laevis*. **Anat. Embryol.** 150, 99–111.
- HEIDI, E. H.; MICHAEL, MENAKER (1980) Retinal rhythms in chicks: Circadian variation in melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77, 4998-5002.
- HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. (1994) Cloned glutamate receptors. **Annu. Rev. Neurosci.** 17, 31- 108.
- ISAAC, J.T.R.; NICOLL, R.A.; MALENKA, R.C. (1995). Evidence for silent synapses: implications for expression of LTP. **Neuron** 15, 427–434.
- JANET L. F.; PAUL, R. H. (2013) Agonist binding to the GluK5 subunit is sufficient for functional surface expression of heteromeric GluK2/GluK5 kainate receptors. **Cell. Mol. Neurobiol.** 7, 10571-013.
- JEFFERY, G; WILLIAMS, A. (1994) Correction of abnormal retinal pathways found with albinism by introduction of a functional tyrosinase gene in transgenic mice. **Exp. Brain Res.** 100, 47–57.
- JONATHAN, W. D.; JEFFREY, C. (2012) Therapeutic potential of targeting metabotropic glutamate receptors for Parkinson's disease. **Neurodegener. Dis. Manag.** 2, 221–232.
- KLEIN, D.C.; MOORE, R.Y.; REPPERT, S.M. (1991). Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock. **Oxford University Press**, New York.
- KOLB, H. (1994) The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 23, 10971-10979.
- KUHN, H. (1978) Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. **Biochemistry** 17, 4389-4395.

- KUHN, H. (1984) Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83,1174-1178.
- KREIMBORG, K.M.; LESTER, L.M.; MEDLER, K.F.; GLEASON, E. L. (2001) Group I metabotropic glutamate receptors are expressed in the chicken retina and by cultured retinal amacrine cells. **J. Neurochem.** 77, 452-465.
- KRIEGSTEIN, A.R.; CHOI, D.W.; MAULUCCI-GEDDE, M. (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell cultures. **J. Neurosci.** 7, 357-368.
- KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu. Rev. Physiol.** 60, 619-642.
- LAVAIL, M.M. (1976) Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting, **Science** 194, 1071-1074.
- LOWREY, P.L.; TAKAHASHI, J.S. (2004) Mammalian circadian biology: Elucidating genome-wide levels of temporal organization. **Ann. Rev. Gen. Human Gen.** 5, 407-441.
- LIAO, D.; HESSLER, N.A.; MALINOW, R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. **Nature.** 375, 400–404.
- CHEN, L.; CHETKOVICH, D.M.; PETRALIA, R.S.; SWEENEY, N.T.; KAWASAKI, Y.; WENTHOLD, R.J.; BREDET, D. S.; NICOLL, R.A. (2000) Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. **Nature** 408, 936-943.
- MARTIN, V. (2002) Photoreceptors of cnidarians. **Can. J. Zool.** 80, 1703-1722.
- MASAAKI, I.; MASAHIKO, N. (1997) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic Helix–Loop–Helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 233, 258-264.
- MASANORI, M.; GRAHAM C. R.; ELLIS-DAVIES, T.; NEMOTO, MASAMITSU, I.; HARUO, K. (2001) Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Nature Neurosci.** 4, 1086 – 1092.
- MENNA-BARRETO, L.; MARQUES, N. (2003) **CRONOBIOLOGIA - PRINCÍPIOS E APLICAÇÕES** EDITORA EDUSP.

- MONTELL, C. (1999). Visual transduction in *Drosophila*. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.** 15, 231–268.
- MONYER, H.; BURNASHEV, N.; LAURIE, D.J.; SAKMANN, B.; SEEBURG, P.H. (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron** 12, 529-540.
- MORAES, M.N.C.M.; POLETINI, M.O.; RAMOS, B.C.R; LIMA, L.H.R.G.; CASTRUCCI, A.M.L. (2014) Effect of light on expression of clock genes in *Xenopus laevis* melanophores. **Photochem. Photophysiol.**, no prelo.
- MORIYOSHI, K.; MASU, M.; ISHII, T.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N.; NAKANISHI, N. (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. **Nature** 354, 31-37.
- NATH, K.; SAROSY, J.W.; HAHN, J.; DI COMO, C.J. (2000) Effects of ethidium bromide and SYBR Green I on different polymerase chain reaction systems. **J. Biochem. Biophys. Methods** 42,15-29.
- NAWY, S.; SHEN, Y.; HEIMEL, J.A.; KAMERMANS, M. (2009) A transient receptor potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells. **J. Neurosci.** 13, 6088-6093.
- NEWHOUSE, J.P.; LUCAS, D.R. (1957) The toxic effect of sodium Lglutamate on the inner layers of the retina. **Ann. Med. Assoc. Arch. Ophthalmol.** 58, 193-201.
- NEWMAN, E.A. (2004) A dialogue between glia and neurons in the retina: Modulation of neuronal excitability. **Neuron Glia Biol.** 1, 245-252.
- NICHOLAS, W. B.; ELENA, OANCEA. (2013) UV light phototransduction depolarizes human melanocytes **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 110, 2383–2388.
- OSTER, H.; WERNER, C.; MAGNONE, M.C.; MAYSER, H.; FEIL, R.; SEELIGER, M.W.; HOFMANN, F.; ALBRECHT, U. (2003) cGMP-dependent protein kinase II modulates *mPer1* and *mPer2* gene induction and influences phase shifts of the circadian clock. **Curr. Biol.** 13, 725–733.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K.(1998) Glutamate receptors in mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.** 54, 581-618.
- PFISTER, C.; CHABRE, M.; PLOUET, J.; TUYEN, V.V.; KOZAK, Y.; FAURE, J.P.; KUHN, H. (1985) Retinal S- antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. **Science** 228, 891 -893.
- PITTENDRIGH, C.S. (1993). Temporal organization: Reflections of a Darwin clock-watcher. **Annu. Rev. Physiol.** 55, 17-54.

- POLANS, A. (1996) Turned on by Ca^{+2} : The physiology and pathology of Ca^{+2} - binding proteins in the retina. **Trends Neurosci.** 19, 547–554.
- PRIETO, J.S.; MORENO, A.R.; SISTIAGA A.; LERMA J. (1998) Switch from facilitation to inhibition of excitatory synaptic transmission by group I mGluR desensitization. **Neuron** 21, 1477–1486.
- PROVENCIO, I., ROLLAG, M.D.; CASTRUCCI, A.M.L. (2002) Discovery of a photoreceptor net in the mammalian retina. **Nature** 295, 955-957.
- ROWLEY, M.; BRISTOW, L.J.; HUTSON, P.H. (2001) Current and novel approaches to the drug treatment of schizophrenia. **J. Med. Chem.** 44, 477-501.
- SHANNAHOFF-KHALSA, D.S.; WERNTZ, D.A.; BICKFORD, R.G.; BLOOM, F.E. (1983) Alternating cerebral hemispheric activity and the lateralization of autonomic nervous function. **Human Neurobiol.** 2, 39-43.
- SCHMITZ, Y.; WITKOVSKY, P. (1996) Glutamate release by the intact light-responsive photoreceptor layer of the *Xenopus* retina. **J. Neurosci. Methods** 68, 55–60.
- SHERMAN, H.; FROY, O. (2008) Expression of human β -defensin 1 is regulated *via* c-Myc and the biological clock. **Mol. Immunol.** 45, 3163-3167.
- SLADECZEK, F.; MOMIYAMA, A.; TAKAHASHI, T. (1993) Presynaptic inhibitory action of a metabotropic glutamate receptor agonist on excitatory transmission in visual cortical neurons. **Proc. R. Soc. London B** 253, 297–303.
- SPANAGEL, R.; GURUDUTT, P.; CAROLINA, A.; TAREK, Z.; CARLES, S-S.; MARIA, C. M.; JESÚS, L.; MARTIN, D.; DAVID, H.; MICHAEL, S.; STEFAN, S.; FUMIHIKO, M.; MARK, L.; GUNTER, S.; URS, A. (2005) The clock gene *Per2* influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption **Nature Medicine** 11, 35-42.
- SOBOLEVSKY, A.I.; WOLLMUTH, L.P. (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. **Trends Neurosci.** 27, 321-328.
- STUART, C.C.; STEPHEN, B.; MARK, F. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Curr. Op. Neurobiol.** 11, 327–335.
- SUN, Z.S.U.; ALBRECHT, O.; ZHUCHENKO, J. B. (1997) A mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. **Cell** 90, 1003–1011.
- TIFFANY, M. S.; MICHAEL, T.H.D.; DENNIS, D.; ROBERT L.; SAMER H.; ANNA, M. (2011) Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: From form to function. **J. Neurosci.** 45, 16094 –16101.

- TEI, H.; OKAMURA, H.; SHIGEYOSHI, Y.; FUKUHARA, C.; OZAWA, R. (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. **Nature** 389, 512–516.
- URS, A.; GREGOR, E. (2003) The mammalian circadian clock. **Curr. Op. Gen. Devel.** 13, 271–277.
- VAN DER HORST, M.A.; HELLINGWERF, K.J. (2004) Photoreceptor proteins, “Star Actors of Modern Times”: A review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. **Acc. Chem. Res.** 37, 13–20.
- VARGAS, J.R.; TAKAHASHI, D.K.; THOMSON, K.E.; WILCOX, K.S. (2013) The expression of kainate receptor subunits in hippocampal astrocytes after experimentally induced status epilepticus. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 10, 919–932.
- VINCENT M. C.; DAVID F. W. (2012) The bird of time: Cognition and the avian biological clocks. **Frontiers Mol. Neurosci.** 5, 1–8.
- VITATERNA, M.H.; KING, D.P.; CHANG, A-M.; KORNHAUSER, J.M.; LOWREY, P.L.; MCDONALD, J.D.; DOVE, W.F.; PINTO, L.H.; TUREK, F.W.; TAKAHASHI, J.S. (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. **Science** 264, 719–725.
- YARFITZ, S.; HURLEY, B.J. (1994). Transduction mechanism of vertebrate and invertebrate photoreceptors . **J. Biochem.** 269, 14329–14332.
- 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** 404, 87–91.
- YAU, K.-W.(1994) Phototransduction mechanisms in retinal rods and cones. **Invest. Ophthalm. Vis. Sci.** 35, 9–32.
- YOUNG, E.A.; ABELSONA, J.; LIGHTMAN, S.L. (2004) Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. **Frontiers Neuroendocrinol.** 25, 69–76.
- YOUNG, R.W. (1983) The ninth Frederick H. Verhoeff lecture. The life history of retinal cells. **Trans. Am. Ophthalmol.** 81, 193–228.
- YOUNG, R.W. (1985) Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. **Dev. Brain Res.** 21, 229–239.