UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

Jennifer Caroline de Sousa

Efeitos de glicocorticoide sobre a expressão de genes de relógio nas células
ZEM-2S de *Danio rerio*

Glucocorticoid effects on clock gene expression in *Danio rerio* ZEM-2S cells

São Paulo

2015

Jennifer Caroline de Sousa

Efeitos de glicocorticoide sobre a expressão de genes de relógio nas células
ZEM-2S de *Danio rerio*

Glucocorticoid effects on clock gene expression in *Danio rerio* ZEM-2S cells

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

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

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA
PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS / USP

Sousa, Jennifer Caroline de.

Efeitos de glicocorticoide sobre a expressão de genes de relógio nas células ZEM-2S de *Danio rerio* / Jennifer Caroline de Sousa; orientadora Ana Maria de Lauro Castrucci. -- São Paulo, 2015.

86 f.

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

1. *Danio rerio*. 2. ZEM-2S. 3. Genes de relógio. 4. Glicocorticoide. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II. Título.

Nome: SOUSA, Jennifer Caroline de

Título: Efeitos de glicocorticoide sobre a expressão de genes de relógio nas células ZEM-2S de *Danio rerio*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do 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: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci
Orientadora

À Maria.

Agradecimentos

“[...] a verdade é que basta estar vivo para saber – de maneira consciente ou inconsciente – que o amor transcende qualquer ciência. Ele nasce, cresce e se multiplica, ocupando espaços maiores ou menores, mas sempre edificados com o que há de mais nobre no espírito e no coração do ser humano” (G. C., 2005. *Pedagogia do amor*. p. 18).

Agradeço aos meus pais, Maria e Adilson, pelo amor incondicional e por apoiar minha escolha pela Biologia e alimentar com orientações, afeto, carinho e coragem todo trajeto que percorri até aqui. E, às minhas irmãs, Andréa e Amanda, por me permitir o segundo contato com o amor, o amor fraterno.

Aos antigos amigos, Caio, Carlos, Mariana, Marina e Thiago, que me apresentaram a amizade mais do que como um sentimento e criaram uma ligação tão rara que nos tornaram irmãos de alma. Moram em meus pensamentos e no meu coração para sempre!

Às amigadas em consolidação, especialmente ao Djalma, pelas inúmeras caronas da USP para casa em noites que pareciam infindáveis, cansativas, carregadas de livros, artigos, *notebook* e preocupação. Seus ouvidos para escutar todo meu lamento e desespero e suas palavras de carinho e estímulo para não desistir no meio do caminho foram confortantes e essenciais. Obrigada!

À Maria Denise Cabrera, uma pessoa querida que, especialmente durante o período em que realizei este mestrado, foi-me apresentada em um momento crucial e complicado da minha vida pessoal e me ajudou a perceber e a superar alguns desafios que precisavam ser ultrapassados para que eu conseguisse chegar à conclusão de mais essa etapa com sucesso.

Aos companheiros de jornada no laboratório, Nathália, Nathana, Rodrigo, Assis, Bruno, Rafael, Leonardo, Danielle e Márcio, por dividir as frustrações da pós-graduação, pelas ajudas indispensáveis na prática experimental e no conhecimento teórico e por tornar o nosso dia-a-dia mais suave e risonho entre bandejões, aniversários e comemorações a cada bolsa, projeto e defesa aprovados. À Nathalia, expressei especialmente meu carinho e admiração, pois além de ser uma companheira em todos os sentidos que os outros do laboratório também se fizeram, tornou-se com o tempo uma amiga mais próxima que, com seu entusiasmo pela vida acadêmica, conseguiu me animar, sobretudo, nos últimos dias dessa escrita árdua da dissertação.

À Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci, que confiou a mim, mesmo em um primeiro momento à distância quando apenas conheci seu laboratório por intermédio da Profa. Dra. Maria Aparecida Visconti, um projeto de Iniciação Científica e mostrou sua visão sobre o que é Ciência, o que é ser cientista e, com primazia e autoridade, expôs na fala e na prática a importância da ética na vida acadêmica que, tão logo pude perceber, parecem ficar marginalizados em nossa formação. Gratidão eterna a você!

A todos os meus mestres na graduação, particularmente, à Profa. Dra. Yur Tedesco, por me indicar ao laboratório da Profa. Ana e, à Profa. Dra. Olga Martins Mimura, por compartilhar seu conhecimento em Fisiologia Animal Comparada com prazer e entusiasmo nas medidas em que precisava para ingressar nessa área.

À Profa. Dra. Maristela Poletini, pela disposição, pela amizade, pelo conhecimento e pela parceria pessoal e intelectual mesmo em uma distância imposta com sua ida merecida para a UFMG e, ao Prof. Dr. Luiz Menna-Barreto, que me mergulhou no mundo da Cronobiologia e demonstrou que professores e alunos não precisavam estabelecer uma relação vertical para que o respeito entre ambos, a autoridade do professor e o conhecimento construído em conjunto acontecessem.

Ao Instituto de Biociências e à Universidade de São Paulo como um todo, pela oportunidade de realizar o sonho de entrar em um das melhores universidades públicas do país e pelo tempo bom que me proporcionou ao oferecer um mundo novo de conhecimentos, experiências e amizades.

Agradeço, por fim, ao imprescindível apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de Mestrado concedida (processo 2011/04048-2), vinculada aos dois últimos projetos temáticos também subvencionados pela instituição (processos 2006/03381-1 e 2012/50214-4), e às agências de fomento à pesquisa nos âmbitos federais, CNPq e CAPES, por demais subsídios.

“It is what it is - and whatever
Time is still the infinite jest [...]
The hours tick away, the cells tick away...
(Rush, *The Garden*)

Sobre o dolorido esforço de escrever:

“Mas que vos dar de novo e de imprevisto?
Digo... e retorço as pobres mãos cansadas:
‘Eu sei chorar... Eu sei sofrer... Só isto!’”

(Excerto do poema X. A rua dos cataventos. Mario Quintana)

Resumo

SOUSA, J. C. Efeitos de glicocorticoide sobre a expressão de genes de relógio nas células ZEM-2S de *Danio rerio*. 2015. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O estudo da expressão circadiana de genes de relógio tem sugerido hormônios como potenciais agentes sincronizadores. A regulação da ritmicidade de relógios periféricos é, aparentemente, mais um dentre os diferentes efeitos fisiológicos atribuídos aos glicocorticoides (GCs), que se constituem como candidatos a *zeitgeber* dado ao fato de que seus níveis circulantes apresentam padrões diários robustos e são uma das principais eferências do relógio central em mamíferos. Entretanto, em outros vertebrados, o papel dessa classe hormonal em relação a este aspecto ainda é pouco explorado e se a regulação é direta ou indireta, quais suas consequências e de que maneira ela ocorre são indagações a serem respondidas. Empregando a técnica do PCR quantitativo, avaliamos o perfil de expressão dos genes da alça negativa do núcleo da maquinaria molecular do relógio, *per1b* e *cry1b*, em células ZEM-2S do teleósteo *Danio rerio* expostas ao regime fotoperiódico 12:12 CE ou mantidas em escuro constante (EE) e mantidas em EE, mas condicionadas a trocas diárias de meio de cultura ou a pulsos diários de dexametasona a 10^{-7} M (DEXA), agonista sintético de glicocorticoide. Em 12:12 CE, ambos os genes apresentaram variação temporal, com picos de expressão observados na fase clara do ciclo. Em EE, *per1b* mostrou um perfil oscilatório de amplitude atenuada, enquanto para *cry1b*, não foi detectada oscilação ao longo das 24 h. Trocas de meio em EE alteraram significativamente o padrão de expressão de *per1b* e *cry1b*, no entanto, os pulsos diários de DEXA promoveram uma oscilação temporal muito mais pronunciada para *per1b*, modulando positiva ou negativamente sua expressão nos diferentes pontos temporais. O emprego do antagonista RU 486 na concentração de 10^{-5} M aboliu o pico de expressão detectado no ZT 16, porém, na concentração de 10^{-6} M, a expressão gênica foi aumentada em cerca de 3 vezes comparado ao tratamento apenas com DEXA. O gene *cry1b*, por sua vez, não se apresentou suscetível aos pulsos diários de DEXA. Estes resultados permitem confirmar as células ZEM-2S como modelo de relógios periféricos em cultura dada a fotossensibilidade intrínseca das mesmas, reafirmando o papel do ciclo CE como principal agente sincronizador. Os glicocorticoides certamente exercem modulação de *per1b* por meio da via genômica direta, sem, no entanto excluir uma possível ação via receptor de membrana,

tendo em vista a atividade agonista de RU 486, podendo se constituir em um dos fatores que regulam o complexo funcionamento da maquinaria molecular do relógio biológico de *zebrafish*.

Palavras-chave: *Danio rerio*. ZEM-2S. Genes de relógio. Glicocorticoide.

Abstract

SOUSA, J. C. Glucocorticoid effects on clock gene expression in *Danio rerio* ZEM-2S cells. 2015. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Studies on the circadian expression of clock genes have suggested hormones as potential synchronizing agents. Regulation of rhythmicity of peripheral clocks is among the various physiological effects of glucocorticoids (GCs), which are candidate to *zeitgeber*, since their circulating levels present robust daily patterns and are one of the major outputs of the mammalian central pacemaker. However, in other vertebrates, such a feature has yet to be clarified as well as if the hormonal regulation is direct or indirect, what are its mechanisms and consequences. Applying qPCR technique, we evaluated the gene expression profile of *per1b* and *cry1b*, negative feedback loop members of the molecular machinery of biological clock, in ZEM-2S cells of the teleost *Danio rerio*. The cells were exposed to photoperiod regimen of 12:12 LD; kept in constant darkness (DD); kept in DD but subject to medium changes or treated with daily pulses of 10^{-7} M dexamethasone (10^{-7} M DEXA), a glucocorticoid synthetic analogue. In 12:12 LD, both genes presented temporal variation, with peaks of expression in the light phase. In DD, *per1b* showed an oscillatory profile with attenuated amplitude, whereas *cry1b* did not oscillate throughout 24 h. DEXA-free medium changes in constant DD conditions altered significantly *per1b* and *cry1b* expression profiles. Nevertheless, DEXA daily pulses promoted a temporal oscillation much more pronounced for *per1b*, modulating positively or negatively its expression at different time points, whereas *cry1b* was not susceptible to the hormone. RU 486 at 10^{-5} M abolished the peak of expression of *per1b* previously observed at ZT 16. On the other hand, RU 486 at 10^{-6} M increased the gene expression around 3-fold in comparison to just DEXA treatment. These results confirm ZEM-2S cells as a model of peripheral clocks in culture due to their intrinsic photosensitivity, emphasizing the light/dark cycle as a major synchronizing agent. The glucocorticoid modulates *per1b* expression, probably through a direct genomic pathway, without excluding however its possible action through membrane receptors, since RU 486 exerted agonistic activity. Glucocorticoids could, therefore, be one of the factors that regulate the complex molecular machinery of *zebrafish* biological clock.

Key-words: *Danio rerio*. ZEM-2S. Clock genes. Glucocorticoid.

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo atual do mecanismo molecular do relógio circadiano de <i>Danio rerio</i> (<i>zebrafish</i>) (Vatine <i>et al.</i> , 2011).....	20
Figura 2. Mecanismo hipotético da modulação circadiana da maquinaria molecular do relógio por glicocorticoides (GCs) (Dickmeis, 2009).....	26
Figura 3. Protocolo de ciclo claro/escuro (12:12 CE).....	31
Figura 4. Protocolo de escuro constante (EE).....	32
Figura 5. Expressão temporal de <i>per1b</i> em EE e em 12:12 CE sem trocas de meio.....	39
Figura 6. Expressão temporal de <i>cry1b</i> em EE e em 12:12 CE sem trocas de meio.....	40
Figura 7. Expressão temporal de <i>per1b</i> em EE sem e com trocas de meio diárias.....	41
Figura 8. Expressão temporal de <i>cry1b</i> em EE sem e com trocas de meio diárias.....	42
Figura 9. Expressão temporal de <i>per1b</i> em EE com trocas de meio e em EE com pulsos diários de dexametasona (DEXA 10^{-7} M).....	43
Figura 10. Expressão temporal de <i>cry1b</i> em EE com trocas de meio e em EE com pulsos diários de dexametasona (DEXA 10^{-7} M).....	44
Figura 11. Efeito de RU 486 10^{-5} M e 10^{-6} M sobre a expressão de <i>per1b</i> induzida por DEXA 10^{-7} M.....	46

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A ritmicidade biológica e a adaptação temporal dos organismos.....	1
1.2. Estrutura e organização do sistema circadiano	6
1.2.1. Fotorrecepção circadiana	6
1.2.2. Osciladores centrais e suas eferências.....	9
1.2.3. Osciladores periféricos	11
1.3. Mecanismos moleculares da ritmicidade biológica	13
1.3.1. Mecanismos moleculares do relógio biológico de mamíferos	13
1.3.2. O modelo de zebrafish para o estudo do relógio biológico de vertebrados	16
1.4. Os glicocorticoides	21
1.5. Regulação hormonal dos relógios biológicos: a ação dos glicocorticoides sobre os osciladores periféricos	25
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Cultura de células ZEM-2S.....	29
3.2. Protocolo de montagem dos experimentos	29
3.3. Experimentos em ciclo claro/escuro (12:12 CE)	30
3.4. Experimentos em escuro constante (EE) com pulsos diários de dexametasona (DEXA).	31
3.5. Experimentos com antagonista mifepristone (RU 486).....	32
3.6. Extração de RNA total, RT-PCR e PCR quantitativo	33
3.7. Análise estatística	36
4. RESULTADOS.....	38

4.1. Expressão temporal dos genes de relógio <i>per1b</i> e <i>cry1b</i> em células ZEM-2S submetidas a escuro constante (EE) e a ciclos claro/escuro (12:12 CE)	38
4.2. Expressão temporal dos genes de relógio <i>per1b</i> e <i>cry1b</i> em células ZEM-2S submetidas a trocas de meio em EE	40
4.3. Expressão temporal dos genes de relógio <i>per1b</i> e <i>cry1b</i> em células ZEM-2S submetidas a pulsos diários de dexametasona 10^{-7} M (DEXA 10^{-7} M).....	42
4.4. Ensaio com antagonista mifepristone (RU 486 10^{-5} M e RU 486 10^{-6} M)	45
5. DISCUSSÃO.....	47
5.1. O ciclo claro/escuro e o modelo de relógio periférico das células ZEM-2S	47
5.2. As trocas de meio como potenciais <i>zeitgebers</i> para culturas celulares.....	51
5.3. Efeitos de glicocorticoide sobre a maquinaria molecular do relógio das células ZEM-2S.....	53
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ritmicidade biológica e a adaptação temporal dos organismos

Provavelmente, se nos perguntássemos sobre o que há em comum entre fenômenos como o dia e a noite, as estações do ano, as marés e as fases da Lua, uma das respostas traria ideias acerca da repetitividade desses eventos na natureza dentro de uma determinada faixa de tempo. Tal constatação é feita desde a antiguidade pelo homem que, em paralelo, passou também a observar que parte dos processos naturais apresentados pela matéria viva se expressava de modo cíclico (Rotenberg *et al.*, 2003).

Entender o tempo como uma determinante na organização da vida trazia uma nova perspectiva, que somava às dimensões espaciais da vida as dimensões temporais (Menna-Barreto, 2003). Por exemplo, a manutenção da homeostasia na ocorrência de atividades no meio interno do organismo seria resultado tanto da integração coordenada entre as vias anatômicas e fisiológicas quanto também da sequência temporal com que essa interação se repete (Marques *et al.*, 2003).

Apesar da temporalidade como característica inerente à vida não ser uma ideia nova, somente no século XX, o conceito de tempo biológico foi proposto por um ramo do conhecimento que se consolidava na época, a Cronobiologia, a qual se ocupa, em linhas gerais, da compreensão da organização temporal da vida (Menna-Barreto, 2003).

Pensar na existência de um tempo biológico em meio às efervescentes ideias evolucionistas de Darwin enquanto a Cronobiologia se estabelecia, inevitavelmente, norteou discussões acerca do surgimento e a ubiquidade da ritmicidade biológica, pois seu alto grau de conservação e universalidade é atestado em toda a pluralidade de formas de vida (Menna-Barreto, 2003; Sharma, 2003).

Na década de 60, o cronobiólogo Collin Pittendrigh foi o primeiro a considerar que a origem do tempo biológico teria como referência os eventos externos de recorrência regular, como o dia e a noite, pois estes teriam sido capazes ao longo do tempo de sujeitar os organismos primitivos à ação da seleção natural. Assim, aqueles que eram dotados de um sistema de temporização interno estariam mais preparados e capacitados a enfrentar mudanças ambientais já previstas, ajustando-se tão logo às condições que viriam a seguir (Marques, 2003).

Conjecturando sobre os valores adaptativos atrelados ao estabelecimento de um sistema de temporização, propôs-se que eles seriam de duas ordens, uma relacionada à harmonização

entre os tempos interno e externo ao organismo, de forma que o ser vivo conseguisse expressar determinadas funções e comportamentos nos estados ambientais que lhe fossem mais favoráveis (valor adaptativo extrínseco), e outra ligada à coordenação dos processos metabólicos internos (valor adaptativo intrínseco) (Marques *et al.*, 2003; Sharma, 2003).

Em analogia ao instrumento que utilizamos para medir o tempo, cunhou-se o termo “relógio biológico”, conceitualmente referido ao mecanismo oscilatório interno ao organismo capaz de regular o padrão temporal cíclico das variáveis fisiológicas e comportamentais, isto é, de ensejar a manifestação de fenômenos biológicos dentro de uma variação de tempo regular (Marques *et al.*, 2003).

No contexto cronobiológico, o termo “ritmo” refere-se à expressão repetitiva dos eventos biológicos com período definido e, ao avaliá-los, nota-se que expressam diferentes estados durante o período ao qual estão circunscritos. Cada estado desse processo rítmico é denominado de “fase”. Como exemplos, no ritmo de atividade fala-se “fase de repouso” e “fase de atividade”; no ciclo de um dia, “fase clara” e “fase escura” e no ciclo de temperatura, “fase quente” e “fase fria” (Marques *et al.*, 2003; Menna-Barreto, 2005).

Sobre o aparecimento da ritmicidade biológica, alguns trabalhos apresentam pistas de que procariontes já possuiriam mecanismos de temporização (Mitsu *et al.*, 1986; Mori *et al.*, 1996; Kondo & Ishiura, 1999; Dvornyk *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006), evidenciando o quão ela é antiga na história evolutiva dos seres vivos.

Contudo, os primeiros registros formais de ritmos biológicos se deram com estudos em vegetais. O astrônomo francês Jean-Jacques d’Ortous de Mairan, em 1729, observou que uma espécie de planta do gênero *Mimosa* apresentava movimentos foliares periódicos em direção ao Sol, mesmo quando mantida em local isolado de ciclos claro/escuro ambientais (Rotenberg *et al.*, 2003; Menna-Barreto, 2005). Essa observação evidenciava uma primeira característica dos ritmos, a sua natureza endógena. A partir desse ponto se liquidava uma possível interpretação de que os seres vivos reagiam passivamente à temporalidade ambiental, apresentando, portanto, mecanismos internos capazes de torná-los ativos na produção e manutenção da ritmicidade independentemente da presença de uma pista temporal externa (Peirson *et al.*, 2009).

Ainda esse experimento possibilitou a identificação de uma segunda característica, a persistência em condições constantes. Como descrito, a permanência de um ritmo de abertura e fechamento das folhas corroborava a crença no caráter endógeno da ritmicidade e demonstrava que esta se sustentava ao longo do tempo mesmo não mais sob a influência de um ciclo claro/escuro, porém expressando período próprio, ligeiramente diferente daquele

exibido quando sob a imposição de um ciclo ambiental, fenômeno este que posteriormente foi designado como ritmo em livre-curso (Marques *et al.*, 2003).

Somente no século seguinte, A. de Candolle mostrou que o movimento foliar da espécie *Mimosa pudica* tinha um período que variava entre 22 e 23 horas quando permanecia em condições constantes. Então, propôs que na natureza, frente a um ciclo claro/escuro (dia/noite), o ritmo era “forçado” a apresentar uma periodicidade mais próxima ao intervalo de um dia, isto é, de 24 horas. Surge então o conceito de ritmo circadiano (do grego, *circa*, próximo; *diem*, dia) e o estabelecimento de uma terceira característica dos ritmos biológicos, a sincronização aos ciclos ambientais (Rotenberg *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2003).

Embora se tenha colocado que uma das propriedades dos ritmos seja a sua persistência em livre-curso, ser o organismo capaz de se alinhar temporalmente a determinado ciclo ambiental condiz fidedignamente à concepção já apresentada de que teria sido vantajoso aos seres vivos em sua trajetória evolutiva, a antecipação e a otimização de seus processos fisiológicos e comportamentais em meio à predição de variações cíclicas do ambiente, o que só teria sido possível graças à suscetibilidade ao processo de sincronização (Marques *et al.*, 2003; Von Schantz *et al.*, 2006).

A sincronização, por sua vez, passou a ser compreendida a partir de experimentos com pulsos de luz sobre plantas fototrópicas que, quando administrados ao final da fase clara ou da fase escura do dia, promoviam alterações no ritmo de movimento foliar, desencadeando um aumento ou diminuição de seu período, como se o dia para a planta tivesse se alongado ou encurtado, respectivamente. Esses resultados foram utilizados para conceber a ideia de que o processo da sincronização ocorreria por um mecanismo de arrastamento, o qual seria capaz de impedir que o organismo expressasse um ritmo em livre-curso e passasse a compatibilizar seu período endógeno ao período apresentado pela pista temporal externa (Rotenberg *et al.*, 2003).

Entretanto, atualmente se sabe que esse ajuste promovido pelo arraste dos ritmos biológicos acontece dentro do que se denomina de limite de arrastamento. Isto é, o período da oscilação endógena pode ser sincronizado aos ciclos ambientais dentro de determinada faixa de tempo. Por exemplo, no caso dos ritmos orientados pelo ciclo claro/escuro, sendo o comprimento do dia de, aproximadamente, 24 h, o limite de arrastamento que se observa compreende um intervalo de 20 a 28 h. Quando o período dos fatores cíclicos se encontra fora dos limites de sensibilidade, o ritmo endógeno deixa de ser arrastado e entra em livre-curso (Rotenberg *et al.*, 2003).

A sincronização do sistema de temporização conta ainda com o que o físico e biólogo comportamental alemão Jürgen Aschoff denominou de mascaramento. Atualmente, esse mecanismo é interpretado como um fenômeno importante dentro do contexto da adaptação temporal, conferindo plasticidade ao organismo, uma vez que lhe permite responder diretamente a estímulos ambientais sem que esse estímulo seja um ciclo, sem que essa resposta tenha caráter antecipatório e que altere permanentemente o período do ritmo, como acontece no arrastamento (Marques & Waterhouse, 1994; Marques *et al.*, 2003).

As investigações que se pautam na distinção entre os mecanismos de arrastamento e mascaramento têm demonstrado que tais fenômenos podem ser interdependentes e um mesmo fator cíclico atuar como agente arrastador e mascarador, tendo sido essa sinergia interpretada como uma forma de refinamento e aceleração do processo de sincronização do organismo ao ambiente (Marques *et al.*, 2003).

Todavia, há de se ressaltar que o significado da sincronização se traduz apenas aos ritmos que possuem correlatos ambientais e não àqueles que estão desvinculados de uma temporalidade externa, que se manifestam em períodos que variam entre segundos ou frações de segundos, como disparos neuronais, liberação de alguns hormônios, batimentos cardíacos, movimentos respiratórios e batimentos de flagelos de espermatozoides, ou ritmos que oscilam com periodicidades mensais ou anuais, como ciclos reprodutivos. Acredita-se que essas oscilações dissociadas de fatores cíclicos externos expressem o que hoje se designa como ritmos de economia interna (Marques *et al.*, 2003; Araújo & Marques, 2003).

No entanto, apesar da ciência dessa diversidade de ritmos e suas frequências, os estudos recaíram principalmente sobre aqueles atrelados a ciclos ambientais. A nítida influência da alternância entre o dia e a noite sobre os ritmos da maioria das espécies propiciou que o ciclo claro/escuro fosse a pista temporal mais investigada. Então, além dos ritmos manifestados com um período ao redor de 24 h, circadianos, foram descritos ritmos abaixo de 20 h ou acima de 28 h, ultradiano e infradiano, respectivamente, em referência à terminologia aplicada às oscilações de frequência na área da Física (Marques *et al.*, 2003).

Diante do consenso de que o ambiente forneceria pistas temporais aos organismos e estes estariam sujeitos a elas por meio da sincronização, em 1960, Aschoff cunhou o termo *zeitgeber*, um neologismo alemão cujo significado é “doador de tempo”. Também traduzido como agente sincronizador ou agente do arrastamento, esse conceito refere-se a quaisquer fatores bióticos e abióticos cíclicos que podem promover a sincronização, abrangendo, além de ciclos gerados pelo movimento rotacional e translacional da Terra, como o dia e a noite e as estações do ano, e do ciclo das marés promovido pela atração gravitacional da Lua, ciclos

não geofísicos como variações de temperatura corpórea (Lahiri *et al.*, 2005; Vatine *et al.*, 2011), de disponibilidade de alimento (Damiola *et al.*, 2000; Le Mihn *et al.*, 2001; Stokkan *et al.*, 2001), ciclos sociais (Menna-Barreto & Wey, 2007), variações físico-químicas (pH, salinidade, umidade) (Morgan, 1991), relações inter e intraespecíficas, entre outros.

Todavia, a concepção de *zeitgeber* está intimamente relacionada à sensibilidade e à tomada de um fator cíclico como pista temporal pela espécie, podendo, dessa forma, um mesmo fator ser considerado ou não como agente sincronizador. O ciclo claro/escuro ambiental, por exemplo, muito provavelmente constitui-se como tal aos seres vivos que possuem algum tipo de fotopigmento e estão diretamente expostos a essa variação de luminosidade. Por outro lado, o mesmo não seria relevante como marcação temporal aos organismos que estejam isolados à percepção do dia e da noite, tanto por habitarem ambientes extremos ou inóspitos ou por não apresentarem algum tipo de fotossensibilidade (Marques *et al.*, 2003; Menna-Barreto & Díez-Nogueira, 2012).

Além da importância de um ciclo como agente sincronizador depender das características da espécie, observa-se que, via de regra, os ritmos de uma mesma espécie podem ser arrastados por *zeitgebers* diferentes, ordenados hierarquicamente ou que atuam concomitantemente (Marques *et al.*, 2003). Morgan (1991) descreve que, no ambiente estuarino, as espécies estão expostas a uma gama maior de pistas ambientais de diferentes periodicidades quando comparadas às espécies habitantes do meio terrestre. Assim sendo, em meio a um ambiente diversamente oscilante, para que se possa organizar temporalmente, deve haver prevalência de um *zeitgeber* sobre outro, a qual se define pela estrutura do sistema de temporização apresentado pela espécie.

Por fim, a quarta e última característica apontada à ritmicidade biológica é a compensação à temperatura. Frente às variações de temperatura, as reações bioquímicas no organismo, sabidamente, aceleram ou diminuem sua velocidade. Tal situação difere para os ritmos biológicos, pois estes, em sua maioria, apresentam compensação à temperatura, de maneira que, apenas modificações sutis no período endógeno são geralmente detectadas quando o organismo é submetido a amplas variações de temperatura. Salienta-se, contudo, que as amplitudes dos ritmos podem ser significativamente alteradas com mudança de temperatura, mas, em um sentido lógico, a baixa suscetibilidade à temperatura no tocante ao processo bioquímico de geração dos padrões rítmicos poderia mitigar riscos ao funcionamento adequado do relógio (Marques *et al.*, 2003).

Em suma, a ritmicidade biológica constitui-se como uma característica fundamental da matéria viva e sua manifestação concorda com a concepção de um processo de adaptação

temporal ao qual os organismos teriam sido submetidos desde a sua origem, o que faz do tempo um fator decisivo na dinâmica da vida. Essa teoria se confirma pela observável harmonização entre as fases dos ritmos das espécies e as dos ciclos ambientais, ou então, unicamente pela expressão de processos biológicos dentro de um padrão rítmico intrínseco ao próprio organismo. Quando condicionados à ritmicidade de algum fator do ambiente externo, os ritmos são sincronizados através do arrastamento, fenômeno este que é desencadeado apenas quando a pista temporal é relevante e, por isso, perceptível pela espécie em questão.

1.2. Estrutura e organização do sistema circadiano

1.2.1. Fotorrecepção circadiana

Como abordado anteriormente, diferentes fenômenos naturais cíclicos podem assumir o papel de *zeitgebers*, caso seja identificada uma relação temporal entre estes e os ritmos biológicos dos organismos. Entretanto, uma variedade de sinais temporais externos está presente simultaneamente na natureza e, dessa forma, pareceria razoável que se estabelecesse algum tipo de hierarquia entre eles. Esta concepção desencadeou a ideia de que os *zeitgebers* poderiam apresentar maior ou menor expressividade em relação à força com que se impõem sobre os ritmos.

Neste contexto, a alternância entre a claridade e a escuridão no ambiente natural foi e ainda é considerada como *zeitgeber* dominante à maioria das espécies, pois a vida, desde seus primórdios, fora acompanhada e condicionada a este ciclo, o qual certamente se tornou para ela uma referência temporal externa altamente relevante, estável e confiável (Menna-Barreto & Díez-Nogueira, 2012).

Associada a este fator, provavelmente, a facilidade de se observar e relatar fenômenos biológicos atrelados ao dia e a noite teria guiado o foco das investigações cronobiológicas para os ritmos circadianos. Assim, consequentemente, apesar de se conceber a ocorrência de *zeitgebers* alternativos ao ciclo claro/escuro, os estudos sobre a estrutura e organização do sistema de temporização dos seres vivos recaíram massivamente sobre os mecanismos subjacentes à percepção, integração e ajuste do organismo frente às variações de luminosidade do ambiente (Marques *et al.*, 2003).

A começar, portanto, da recepção da informação fótica, com o uso de modelos de mamíferos, o conhecimento anterior de que a fotorrecepção nesses vertebrados se restringia

aos olhos tornou a retina a estrutura-alvo dos estudos sobre a fotorrecepção circadiana (Peirson *et al.*, 2009).

Em linhas gerais, a fototransdução na retina tem como primeira etapa a conversão da energia luminosa em alteração no potencial de membrana de fotorreceptores, os cones e bastonetes, dispostos na superfície mais externa da retina, junto ao epitélio pigmentar (Hamassaki & Ventura, 2012). A fotossensibilidade dessas células fotorreceptoras é dada pela presença de proteínas de membrana membros de uma superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCRs, na sigla em inglês), as opsinas. Nos cones e bastonetes são encontradas opsinas de cones e rodopsinas, respectivamente, pertencentes ao grupo das opsinas visuais, as quais se associam ao cromóforo derivado da vitamina A (retinaldeído) na forma 11-*cis*-retinal para desempenharem a função como fotopigmentos (Terakita, 2005).

Em meados da década de 70, já havia relatos da existência, em vertebrados não-mamíferos, de fotorreceptores extra-retinianos, os quais especulava-se estarem ligados aos ritmos circadianos de atividade locomotora (Underwood & Menaker, 1976) e aos de reprodução sazonal (Foster *et al.*, 1985).

Porém, os primeiros trabalhos cujo objetivo central era a afirmação de quais seriam essas moléculas fotorreceptoras consideraram que fotorreceptores retinianos clássicos exerceriam também o papel de fotorreceptores para o sistema circadiano. No entanto, utilizando camundongos congenitamente cegos, Foster e colaboradores (1991) observaram que esses animais continuavam apresentando respostas circadianas. Subsequentemente, outros trabalhos (Czeisler *et al.*, 1995; Freedman *et al.*, 1999) passaram a alimentar a ideia que fotorreceptores de outra natureza seriam responsáveis pela percepção do estímulo luminoso associado ao ajuste dos relógios biológicos.

De posse do conhecimento de que a fotossensibilidade de melanóforos tegumentares de *Xenopus laevis* era reversivelmente ativada por retinaldeído e tinha um espectro de ação característico de fotopigmentos semelhantes a opsinas, Provencio e colaboradores (1998) caracterizaram o fotopigmento responsável por desencadear a migração de grânulos de melanina nessas células. Identificaram uma nova opsina, nomeada de melanopsina, cuja expressão de RNAm também foi encontrada nesse mesmo animal em regiões hipotalâmicas detentoras de fotorreceptores e na íris, estrutura fotossensível em anfíbios.

A partir daí, a presença de melanopsina foi detectada na retina de humanos bem como na de todos os vertebrados estudados até o momento (Provencio *et al.*, 2000; Dearworth *et al.*, 2011), sendo que em mamíferos, elas estariam regionalizadas em subpopulações de células ganglionares (Provencio *et al.*, 2002). Em répteis, esse fotopigmento se encontra em regiões

cerebrais mais discretas e no olho parietal, além dos olhos laterais (Frigato *et al.*, 2006), em aves, nas células ganglionares e horizontais (Lima *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2014) e em todos os tipos celulares retinianos do teleósteo *Danio rerio*, o qual possuiria, portanto, a retina globalmente fotossensível (Davies *et al.*, 2011).

Entretanto, a baixa homologia estrutural da melanopsina entre os diferentes vertebrados (Bellingham *et al.*, 2002) levou à descoberta de dois genes codificadores para essa opsina. Em mamíferos verificou-se a presença de apenas um deles, o qual foi denominado de *Opn4m* e, em todas as outras classes de vertebrados, além desta, a presença da *Opn4x*, assim denominada por ser ortóloga à de *Xenopus*, organismo no qual a melanopsina foi primeiramente encontrada (Bellingham *et al.*, 2006).

Apesar desse conjunto de dados ter fornecido provas de que esta ordem de fotopigmentos estaria envolvida com o arrastamento dos relógios biológicos de mamíferos, a literatura ainda mostrava inconsistência com relação à definição do fotopigmento circadiano em outras classes de vertebrados. Alguns estudos apontaram os criptocromos (Cry) como candidatos a esse papel (Miyamoto & Sancar, 1998; Thresher *et al.*, 1998; Cermakian *et al.*, 2002; Tamai *et al.*, 2007), uma vez que, na maquinaria molecular do relógio circadiano de *Drosophila*, a proteína CRY suprime a ação transcricional do heterodímero formado pelas proteínas de CLOCK e BMAL de forma dependente da luz (Kobayashi *et al.*, 2000).

Na verdade, os *Crys* medeiam uma variedade de respostas à luz nas plantas e, embora esta família esteja bastante distribuída no reino animal, é muito distinta dos *crys* das plantas e por isso foram separados evolutivamente em outro grupo.

Contudo, tem se confirmado nos vertebrados o envolvimento dos Cry no mecanismo molecular do relógio de forma independente da luz, e não como molécula fotorreceptora (Golombek & Aguilar-Roblero, 2003) e, desde o início dos anos 2000, credita-se mais veementemente à melanopsina a função como fotopigmento não-visual relacionado à fotorrecepção circadiana (Provencio *et al.*, 2000; 2002; Hattar *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2002, 2003).

Frente à descoberta da melanopsina, as investigações prosseguiram para desvendar a trajetória que o sinal luminoso traduzido percorria para então alcançar a região responsável pela integração dessa aferência e pela consequente geração dos padrões rítmicos a serem exportados para todo o organismo.

Em 1974, Moore e Klein haviam proposto que a informação luminosa para o arraste dos ritmos de produção de melatonina alcançava o relógio central via uma projeção retino-hipotalâmica. Porém, somente em 2002, Berson e colaboradores confirmaram esse trajeto por

meio de injeção retrógrada de microesferas fluorescentes do hipotálamo para células ganglionares da retina de ratos, demonstrando que esse era o agrupamento celular intrinsecamente fotossensível responsável pela transdução do sinal para o oscilador central, o núcleo supraquiasmático (NSQ).

Entretanto, com a notável centralização dos elementos fotorreceptivos no grupo dos mamíferos (Buijs *et al.*, 2003), o que se estabelecia até o momento era a descrição do processo de fotorrecepção circadiana exclusivamente nesses vertebrados, pois anfíbios, répteis e aves possuem outras vias de entrada do sinal luminoso, por exemplo, a glândula pineal mais superficial, olho parietal, fotorreceptores em regiões encefálicas mais profundas e até outros órgãos mais periféricos também sensíveis à luz (Golombek & Aguilar-Roblero, 2003). Isso demonstra que, na verdade, em vertebrados não-mamíferos, trata-se de um sistema multifotorreceptor (Underwood & Menaker, 1976; Tosini *et al.*, 2001), sugerindo a diversidade e a complexidade da organização do sistema circadiano.

1.2.2. Osciladores centrais e suas eferências

Muito anterior às investigações sobre a melanopsina e o trajeto da aferência da luz para o organismo, a busca pela determinação da estrutura responsável por controlar e regular os ritmos biológicos se iniciou em 1972, quando Stephan e Zucker provocaram lesões eletrolíticas bilaterais na região do núcleo supraquiasmático (NSQ) de ratos e observaram a eliminação da ritmicidade circadiana no comportamento de ingestão de água e de atividade locomotora.

A sugestão de que o NSQ seria o marca-passo central só se confirmou, entretanto, com o trabalho de Ralph e colaboradores (1990), que consistiu no transplante do NSQ de um *hamster* selvagem para um que apresentava um período circadiano curto, o qual passou a manifestar o período do doador. Além disso, pequenos enxertos neurais provenientes dessa região restauraram os ritmos circadianos de animais arrítmicos nos quais se havia realizado a ablação do NSQ.

A caracterização do oscilador central em outros vertebrados, todavia, demonstrou que, assim como no caso da pluralidade de órgãos fotorreceptivos, também o marca-passo central não seria uma única estrutura, mas sim o que se denominou de “Eixo Circadiano dos Vertebrados”, composto pela retina, pela glândula pineal e por um conjunto de neurônios hipotalâmicos osciladores que têm sido considerados como os precursores dos neurônios que compõem o NSQ. Interessantemente, nota-se haver entre essas estruturas uma contribuição

diferencial para a regulação dos ritmos biológicos, isto é, uma hierarquização entre os osciladores conforme a espécie, podendo um oscilador apresentar um papel de maior relevância em relação aos outros na manutenção da ritmicidade, ou então, ao invés da hierarquia, um sinergismo funcional entre os mesmos (Gaston & Menaker, 1968; Zimmerman & Menaker, 1979; Tosini *et al.*, 2001; Bartell *et al.*, 2004; Golombek & Aguilar-Roblero, 2003; Moore & Whitmore, 2014).

É curioso notar que, enquanto em mamíferos, o oscilador central é localizado no interior do sistema nervoso central e é uma unidade distinta da estrutura responsável pelo processo de fotorrecepção, em peixes, anfíbios e répteis, assim como em moluscos e crustáceos, identificam-se osciladores circadianos oculares que assumem o papel tanto de fotorreceptores quanto de osciladores, sinalizando uma tendência à interiorização dos osciladores e uma especialização dos componentes constituintes do sistema circadiano no curso da história evolutiva (Golombek & Aguilar-Roblero, 2003).

Investigações acerca do funcionamento dos marca-passos centrais de peixes, répteis e aves relatam principalmente a perda da ritmicidade no padrão de atividade locomotora e na produção de melatonina quando uma ou mais estruturas do eixo circadiano são lesionadas, ao passo que, em mamíferos, observa-se que a lesão do NSQ elimina ou altera, além dos mencionados, ritmos de comportamento alimentar, de temperatura corporal, de atividade sexual, de sono e de secreção de hormônios hipofisários (Golombek & Aguilar-Roblero, 2003).

A consolidação do NSQ como o marca-passo central, contudo, foi seguida de experimentos que passaram a demonstrar que lesões nessa região não abolem a ritmicidade de todos os processos biológicos cíclicos, o que levantou a ideia da existência de múltiplos osciladores, os quais estariam contidos em outros núcleos cerebrais e seriam suscetíveis a outros *zeitgebers* diferentes do ciclo claro/escuro, como a disponibilidade de alimento (para revisão ler Vansteensel *et al.*, 2008; Blum *et al.*, 2012).

Para regular, no entanto, esses ritmos fisiológicos e comportamentais, é imprescindível que haja a projeção de eferências desses osciladores centrais para o corpo. No caso do NSQ de mamíferos, elas se voltam fundamentalmente para neurônios neurosecretores e autonômicos do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), para estruturas hipotalâmicas entre NSQ e PVN, como a região subPVN, o núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) e a área medial pré-óptica e para duas áreas extra-hipotalâmicas, núcleo geniculado lateral (LGN) e núcleo paraventricular do tálamo (PVT) (Buijs *et al.*, 2003).

Atentando-se especialmente ao sistema endócrino, dado o recorte do presente trabalho, apresentar uma prospecção direcionada ao PVN significa prover um sinal circadiano para coordenar a produção e a liberação rítmica de hormônios pelo eixo hipotálamo-hipófise-glândula-alvo, os quais, por sua vez, alcançam o organismo carregando a informação temporal para a sincronização de todos os órgãos e tecidos (Golombek & Aguilar-Roblero, 2003).

Dentre as propriedades fundamentais que permitem o relógio central gerar ritmos em intervalos próximos de 24 h está a presença de um repertório gênico específico, cujos processos de transcrição e tradução são operados dentro de alças de retroalimentação positiva e negativa, mantendo uma dinâmica entre gene-proteína-gene (Buijs *et al.*, 2003), como discutido em maiores detalhes a seguir.

Essa investigação molecular posterior à caracterização anatômica do oscilador central, sobretudo em mamíferos, encaminhou a descoberta de osciladores autônomos em diversos órgãos periféricos do organismo, os quais são regidos pelos mesmos mecanismos moleculares presentes no NSQ (Buijs & Kalsbeek, 2001; Huang *et al.*, 2011; Leliavsky *et al.*, 2014). Estes relógios, porém, apresentam-se suscetíveis à regulação por outros fatores diferentes do ciclo claro/escuro e, quando isolados em cultura celular, diferentemente do que se observa no NSQ, não sustentam por mais que alguns ciclos a expressão rítmica dos genes vinculados à geração da ritmicidade.

Criou-se a partir desse ponto uma nova perspectiva sobre a organização e a fisiologia do sistema de temporização circadiana e, com isso, o desafio maior tornou-se desvendar a interação entre o oscilador central e os osciladores periféricos e como estes últimos contribuem na produção e manutenção dos ritmos biológicos (Hastings *et al.*, 2003; Golombek & Rosenstein, 2010).

1.2.3. Osciladores periféricos

Diante da descoberta de temporizadores periféricos e da já bem estabelecida natureza do oscilador central em mamíferos, propôs-se, inicialmente, a subordinação dos osciladores periféricos ao NSQ (Brandstaetter, 2004). Contrariamente aos estudos extensivos sobre o relógio central, ainda há uma compreensão limitada sobre os relógios periféricos (Leliavsky *et al.*, 2014).

Progressivamente, a exploração de novos modelos biológicos e a demonstração de que nesses osciladores periféricos os ritmos circadianos eram gerados de forma independente do relógio central, poderiam ser diretamente sensíveis à luz e/ou sincronizados por *zeitgebers*

diferentes do ciclo claro/escuro, atribuíram maior autonomia e participação dos relógios periféricos na produção e sustentação dos ritmos do organismo como um todo (Tamai *et al.*, 2005).

Assim, passou-se à compreensão de que a temporização circadiana contaria com um sistema multioscilar (Araújo & Marques, 2003). Aos relógios periféricos caberia o ajuste temporal das atividades do órgão, ampliando a mensagem funcional enviada pelo relógio central. Posteriormente, foi proposto que a periferia se comunicaria com as áreas diretamente controladas pelo relógio central, cimentando uma concepção mais integrativa e complementar do que hierárquica sobre a organização do sistema circadiano (Buijs & Kalsbeek, 2001).

Em paralelo à progressiva revelação das bases genéticas dos ritmos biológicos, em 1998, um grupo liderado por Ueli Schibler demonstrou, pela primeira vez, que a estimulação da cultura de fibroblastos de rato por soro induzia a expressão rítmica de genes e fatores de transcrição responsáveis pela geração dos ritmos, e que glicocorticoides (GCs), hormônios esteroides adrenais, exerciam esse mesmo papel de agentes sincronizadores sobre essa linhagem celular (Balsalobre *et al.*, 2000).

Buhr e colegas (2010) apresentaram a temperatura como um potente agente arrastador para os ritmos dos relógios periféricos, ao passo que o NSQ mostrou-se resistente a essa pista, contribuindo para reforçar a hipótese de que o marca-passo central restringiria sua sensibilidade ao ciclo claro/escuro (Buhr & Takahashi, 2013), enquanto que os osciladores periféricos seriam afetados não somente por pistas externas, mas também por fatores locais (Vansteensel *et al.*, 2008).

Todavia, talvez os dados mais intrigantes acerca da fisiologia dos relógios periféricos tenham sido obtidos a partir do emprego de *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish*. Surpreendentemente, os rins e o coração desse pequeno peixe teleósteo são diretamente fotossensíveis quando isolados em cultura, sendo sincronizados quando submetidos a ciclos claro/escuro (Whitmore *et al.*, 1998; Whitmore *et al.*, 2000). Tal fenômeno também se estende a linhagens embrionárias (Carr & Whitmore, 2005; Farhat *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2014), o que nitidamente demonstra que, primeiramente, os osciladores periféricos são dotados de fotorreceptores e, segundo, que esses relógios são independentes de um oscilador central.

O fato de que vertebrados não-mamíferos teriam fotorreceptores espalhados por todo o corpo, inevitavelmente, fomentou discussões acerca da natureza desses fotopigmentos, do papel dos osciladores centrais em organismos cujos relógios periféricos já seriam por si só responsivos à luz (Carr & Whitmore, 2005). E ainda levantou a questão sobre em que

momento do estágio do desenvolvimento a percepção luminosa para ajuste do relógio já estaria presente e, por isso, independeria da existência de um marca-passo formado como a glândula pineal (Ziv & Gothilf, 2006).

Outros trabalhos passaram a consolidar o caráter independente na manifestação dos ritmos de relógios periféricos, porém, o que se observava era que, uma vez em cultura, seus ritmos se atenuavam em poucos ciclos, enquanto que no oscilador central, eles se mantinham (Yamazaki *et al.*, 2000; Bartell *et al.*, 2004; Vansteensel *et al.*, 2008). Curiosamente, quando o NSQ tem seus neurônios dissociados em cultura, estes passam a se comportar como osciladores periféricos (Liu *et al.*, 2007). Este resultado evidenciou que, para a manutenção da ritmicidade, é necessário o acoplamento entre esses osciladores individuais, isto é, que haja uma reciprocidade entre os relógios celulares, de maneira que esta comunicação permita que todos se estabeleçam em uma mesma fase e apresentem um mesmo período endógeno (Golombek & Aguilar-Roblero, 2003).

Por fim, apesar do conhecimento sobre relógios periféricos ter tido algum avanço, as investigações conseguiram reforçar o quão o sistema circadiano é estruturalmente complexo e diversificado entre os organismos.

1.3. Mecanismos moleculares da ritmicidade biológica

1.3.1. Mecanismos moleculares do relógio biológico de mamíferos

A ubiquidade dos ritmos biológicos fora indissociavelmente acompanhada de uma segunda propriedade, a qual assinalava que a ritmicidade biológica estaria fundamentalmente codificada no genoma (Marques & Waterhouse, 1994).

De fato, a elucidação sobre a organização molecular dos ritmos biológicos se iniciou com trabalhos publicados a partir da década de 70. Apesar de se constatar baixa similaridade entre os genes e as proteínas envolvidas na geração e regulação dos ritmos em *Neurospora*, *Synechococcus*, *Drosophila* e roedores, pesquisas têm revelado que, mesmo sendo filogeneticamente distantes, esses organismos compartilham semelhanças nos mecanismos moleculares em que esses genes e proteínas-chave participam (Kondo & Ishiura, 1999; Young, 2000; Lowrey *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2009).

Konopka e Benzer (1971), submetendo drosófilas à condição de escuro constante, observaram três linhagens mutantes para padrões de ritmo circadiano de locomoção: uma com perfil arritmico e outras duas com período endógeno de 19 h e 28 h. Em 1988, Ralph e

Menaker apresentaram, pela primeira vez, resultados de padrão temporal de atividade locomotora em mamíferos e, por meio de cruzamentos sucessivos, também detectaram proles de *hamsters* com periodicidades distintas (24 h, 22 h e 20 h).

Apesar desses estudos não revelarem os genes envolvidos nos fenótipos analisados pela inexistência de técnicas biomoleculares apropriadas para isso na época, seus achados contribuíram para fundamentar a ideia de que mutações no DNA poderiam provocar anormalidades na marcação temporal biológica. A partir daí, rapidamente, as investigações moleculares acerca da ritmicidade biológica em mamíferos tiveram grande progresso, levando à descoberta tanto dos genes quanto dos mecanismos que sustentavam o funcionamento desse sistema temporizador dentro das células (para revisão ver Pereira *et al.*, 2009).

Após a caracterização das bases genéticas dos ritmos em *Drosophila*, Vitaterna e colegas (1994) foram os pioneiros na identificação de um primeiro gene, nomeado *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*), considerado essencial para a manifestação de um ritmo circadiano comportamental normal em mamíferos.

Posteriormente, um gene homólogo ao gene *Period* (*Per*) de *Drosophila* também foi identificado no NSQ de camundongos e humanos (Tei *et al.*, 1997), seguido pela descoberta de outros dois genes dessa mesma família, *Per2* e *Per3* (Takumi *et al.*, 1998a; 1998b). Embora compartilhem homologia em suas sequências, seus papéis aparentam não ser redundantes, uma vez que os perfis de expressão dos três genes no NSQ de camundongos submetidos a ciclos 12:12 CE, mostraram-se, por hibridização *in situ*, ser diferencialmente afetados (Zylka *et al.*, 1998).

No mesmo ano, um gene denominado *Bmal1* (*Brain and Muscle Arnt-Like protein 1*) foi agregado como integrante do sistema de temporização de mamíferos, pois foi demonstrado que era co-expresso com o gene *Clock*. Seu produto proteico forma, juntamente com a proteína de *Clock*, um heterodímero, o qual se liga a elementos E-box contidos na região promotora dos genes *Per*, desencadeando a transcrição destes (Gekakis *et al.*, 1998).

Em sequência, Van der Horst e colaboradores (1999) demonstraram que os criptocromos (*Cry1* e *Cry2*), moléculas conhecidas como receptores de luz azul e fotoliasas em plantas e animais (Cashmore *et al.*, 1999) e responsáveis pela fotorrecepção nos relógios de *Drosophila*, eram capazes de inibir a transcrição mediada por CLOCK:BMAL1. Esta ação, porém, ocorre de modo independente da luz, o que os aloca como membros do núcleo principal da maquinaria molecular dos relógios, enfraquecendo a hipótese de que seriam os fotorreceptores circadianos também para os relógios de mamíferos.

A designação de *Clock*, *Bmal1*, *Per* e *Cry* como “genes de relógio” surgiu frente às características que estes compartilhavam. A referência para tal classificação foi a observação do perfil de expressão gênica apresentado no NSQ de mamíferos. Exceto *Clock*, todos os outros possuem perfil robusto de oscilação ao longo do dia. Mutações ou o mau funcionamento de qualquer um deles provocam prejuízos na sincronização pelo ciclo claro/escuro, gerando consequentemente fenótipos com períodos inferiores ou superiores a 24 h. Além disso, estes genes originam produtos proteicos com o domínio PAS (*Period-Arylhydrocarbon receptor-Single-minded*), que permite a dimerização entre suas proteínas. Além desse, *Clock* e *Bmal1* possuem um segundo domínio bHLH (*basic-Helix-Loop-Helix*), que os torna capazes de agirem como fatores de transcrição sobre a expressão de *Per* e *Cry*. E, por fim, os níveis proteicos desses genes são suscetíveis à ação de *zeitgebers* (Lopes *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2009).

Tendo, portanto, os componentes moleculares dos relógios sido desvendados, a relação entre os mesmos para gerar ritmos com periodicidade próxima a 24 h passou a ser estabelecida. Como mecanismo de funcionamento do relógio de mamíferos, propôs-se um sistema autorregulatório de alças de retroalimentação transcricional e pós-transcricional, positivas e negativas, entre *Clock*, *Bmal*, *Per* e *Cry*. Do lado positivo da alça, o heterodímero CLOCK:BMAL1 atua como fator de transcrição para a expressão dos genes *Per1*, *2* e *3* e *Cry1* e *2* (Gekakis *et al.*, 1998). Os produtos proteicos destes últimos formam oligômeros que, quando fosforilados pela ação de uma caseína quinase, translocam-se do citoplasma para o núcleo e reprimem a própria transcrição (Yamazaki *et al.*, 2000; Albrecht & Eichele, 2003). Recentemente foram descritos dois mecanismos distintos pelos quais essa repressão ocorre: um deles é a ligação de CRY ao CLOCK:BMAL1 (que se encontra associado ao promotor do gene-alvo), bloqueando a ação do heterodímero sem, no entanto, dissociá-lo (*blocking type repression*). Uma segunda via proposta é a ação conjunta de CRY e PER que, literalmente, dissociam CLOCK:BMAL1 do promotor (*displacement type repression*) (Ye *et al.*, 2014).

Entretanto, a estabilidade do funcionamento desta alça central é mantida por um alça secundária ou acessória. Elementos E-box também são encontrados em regiões promotoras de genes denominados genes controlados pelo relógio (*clock-controlled genes*). Dessa maneira, ao mesmo tempo em que CLOCK:BMAL1 atua na transcrição dos genes *Per* e *Cry*, também se liga à região E-box dos genes controlados pelo relógio, os membros da subfamília de receptores nucleares órfãos *Rev-erb* α/β e *Ror* α/β . As proteínas destes competem por uma mesma região no promotor de *Bmal1*, a RORE (*Retinoic acid-related Orphan receptor Response Element*) e possuem funções antagônicas, sendo REV-ERB α/β um repressor da

transcrição de *Bmal1*, enquanto ROR α/β , um indutor da transcrição (Buhr & Takahashi, 2013).

Além de prover estabilidade, os níveis proteicos de REV-ERB α/β e ROR α/β são responsáveis pelo reinício do ciclo da alça de retroalimentação principal. Como mencionado, CLOCK:BMAL1 induzem a transcrição de Rev-erb α/β e, quando em grandes quantidades, a proteína deste gene inibe tanto a transcrição de *Bmal1* quanto a ação de ROR α/β (Guillaumond *et al.*, 2005). Portanto, somente quando a proteína REV-ERB se encontra ausente, *Bmal1* é transcrito pela ação de ROR α/β , e assim pode novamente formar um complexo com CLOCK (Preitner *et al.*, 2002).

Anteriormente à elucidação das alças, Ralph e Menaker (1988) já haviam demonstrado que uma mutação *tau* em gene que codifica a caseína quinase 1 épsilon (CK1 ϵ) tornava deficitária a ação dessa enzima em fosforilar a proteína PER. Esta era provavelmente a causa do fenótipo de período endógeno encurtado que os *hamsters* apresentavam, o que foi, posteriormente, confirmado em camundongos (Lowrey *et al.*, 2000). Descobriu-se, então, que a proteína PER transitava entre o núcleo e o citoplasma e que quinases CK1 ϵ e CK δ a fosforilavam, tornando-a suscetível à ação da maquinaria proteossômica (Albrecht & Eichele, 2003). Em contrapartida, a proteína CRY no núcleo se liga a PER impedindo que este deixe o núcleo, resultando, portanto, em um equilíbrio entre a retroalimentação transcricional positiva e negativa e a movimentação, fosforilação e degradação de PER para gerar a periodicidade biológica dentro de 24 h (Albrecht & Eichele, 2003; Pereira *et al.*, 2009).

Atualmente, o corpo de conhecimento sobre a maquinaria molecular dos relógios biológicos de mamíferos tem crescido e se aprofundado, porém a generalização do funcionamento do relógio de vertebrados tem sido possível graças ao emprego de novos modelos, como o de *Danio rerio*, modelo utilizado no presente trabalho.

1.3.2. O modelo de zebrafish para o estudo do relógio biológico de vertebrados

O pequeno peixe teleósteo da família Ciprinidae, *Danio rerio*, vulgarmente conhecido como *zebrafish*, é originário da Índia e habita córregos de águas rasas e límpidas. Inicialmente utilizado como peixe ornamental, tornou-se um modelo experimental amplamente empregado em diferentes áreas de estudo em vista do baixo custo, da facilidade de manejo e da adaptação em cativeiro. E, igual ou mais importante que a questão econômica, a presença de características biológicas peculiares como a completa transparência do embrião e o seu rápido

desenvolvimento legitimou o uso dessa espécie na pesquisa em Embriologia e Neurofisiologia (Spence *et al.*, 2008).

Posteriormente, foi aplicado a estudos ecológicos e ensaios farmacológicos, porém os padrões rítmicos observáveis em atividades comportamentais (Serra *et al.*, 1999; Cahill, 2002; Dias *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), o sequenciamento completo de seu genoma e a relativa facilidade para o desenvolvimento de linhagens transgênicas fizeram do *zebrafish* um modelo extremamente interessante. Além disso, suas semelhanças, sobretudo na composição e funcionamento da maquinaria molecular dos relógios biológicos ao de mamíferos, permitiram que fosse adotado como modelo alternativo aos roedores nas investigações acerca da genética dos ritmos biológicos de vertebrados (Cahill, 2002; Vatine *et al.*, 2011).

Embora seja bem estabelecida a diurnidade desse teleósteo, cuja ritmicidade do padrão locomotor é atenuada em condições constantes (Cahill, 2002; Dias *et al.*, 2014), a preferência da espécie por ambientes iluminados ou escuros ainda é um dado controverso na literatura (Serra *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2014) e, sendo esse padrão de escolha uma característica crucial à sobrevivência do animal, tem-se suportado a ideia de que o relógio circadiano esteja envolvido na regulação desse comportamento (Wang *et al.*, 2014).

De fato, como mencionado anteriormente, foi demonstrado que linhagens embrionárias, e de rim e de coração de *zebrafish*, mantidas em cultura, são diretamente sensíveis à luz (Whitmore *et al.*, 2000; Farhat *et al.*, 2009) e que o ciclo claro/escuro é capaz de sincronizar essas populações celulares. Com esses resultados surpreendentes, deu-se início às investigações para identificação de fotorreceptores periféricos, ampliando a lista de melanopsinas encontradas nessa espécie: 3 *Opn4m* (*Opn4m-1*, *Opn4m-2* e *Opn4m-3*) e 2 *Opn4x* (*Opn4x-1* e *Opn4x-2*), diferencialmente expressas entre os subtipos celulares da retina (Davies *et al.*, 2011).

No modelo adotado neste trabalho, avaliando a expressão dos cinco genes por PCR quantitativo e tendo considerado como indicador aceitável de expressão valores alcançados até 32 C_{TS} de amplificação, apenas as *Opn4m-1* e *Opn4m-2* mostraram-se expressas em células ZEM-2S (Ramos *et al.*, 2014), sugerindo que o início da expressão das outras variantes se deu em estágios mais avançados do desenvolvimento.

A notável variedade para melanopsinas nesse peixe tem sido explicada pelo evento de duplicação do genoma ocorrida há mais de 350 milhões de anos no grupo dos teleósteos (Alsop & Vijayan, 2009), fenômeno este que teria acontecido, ao menos, duas vezes dentro da linhagem dos gnatostomados (Postlethwait *et al.*, 1998; Ohno, 1999; Wang, 2008).

Essa pluralidade gênica também é vista em relação ao repertório de genes de relógios de *zebrafish*, o qual possui cópias extras de cada componente da alça central e, apesar de similaridades serem retratadas entre o seu relógio circadiano e o de mamíferos, essa característica peculiar pode sinalizar diferenças relevantes para a reconstrução da história evolutiva do relógio biológico de vertebrados (Cahill, 2002).

Os significados da duplicação gênica, em geral, assumem duas frentes: uma apostando em uma redundância das funções desempenhadas pelo gene original, e outra, acreditando que todas as funções executadas antes por um único gene passam a ser distribuídas entre cópias mais especializadas (Vatine *et al.*, 2011).

Em *zebrafish*, são descritos 4 genes *period* (*per1a*, *per1b*, *per2* e *per3*), 6 genes *cryptochrome* (*cry1a*, *cry1b*, *cry2a*, *cry2b*, *cry3*, *cry4*), 3 genes *clock* (*clock1a*, *clock1b* e *clock2*) e 3 genes *bmal* (*bmal1a*, *bmal1b* e *bmal2*) (Kobayashi *et al.*, 2000; Cahill, 2002; Wang, 2008; Vatine *et al.*, 2011).

Quanto à expressão desses genes, transcritos de *clock* são expressos ritmicamente na glândula pineal, nos olhos, no cérebro, rim, baço e coração (Whitmore *et al.*, 1998) e, em quase todos os tecidos, o pico de RNAm é observado no início da fase escura, alcançando níveis mais baixos próximo à fase clara. Esta situação se constitui como uma primeira diferença em relação ao gene *Clock* de mamíferos, pois nestes, tal gene é constitutivamente expresso (Shearman *et al.*, 1999).

Já as variantes do gene *bmal* apresentam expressão rítmica em muitos tecidos, porém com picos, níveis de transcritos e cinética de expressão diferentes. Interessantemente, BMAL1 apresenta maior afinidade por CLOCK que BMAL2, enquanto que este último, uma vez ligado a CLOCK, torna mais potente a transativação desencadeada pelo heterodímero (Cermakian *et al.*, 2000).

Em relação aos genes *per*, Delaunay e colaboradores (2000) detectaram que o RNAm de *per3* se acumula ritmicamente em oócitos de *zebrafish* e assim persiste no sistema nervoso central e na retina do embrião. Posteriormente, Pando e colegas (2001), ao estabelecerem e caracterizarem a linhagem embrionária Z3, demonstraram que nessas células *per1a*, *per1b*, *per2* e *per3* apresentavam respostas distintas ao ciclo claro/escuro e a tratamentos com pulsos de luz. Interessantemente, Wang (2008) discriminou, por hibridização *in situ*, padrões espacial e temporalmente distintos para *per1a* e *per1b* e verificou que *per3* apresentava um pico de expressão antecipando a fase clara, semelhantemente a *per1a*. Delaunay e colegas (2003), comparando os perfis de expressão de *per2* e *per3*, evidenciaram que *per2* é constitutivamente expresso e que *per3* é o primeiro entre todos os genes *per* a oscilar no embrião e desempenha

um papel fundamental para o início do funcionamento do relógio circadiano. Por fim, estudos independentes chegaram à conclusão de que *per2* tem sua expressão diretamente induzida pela luz (Pando *et al.*, 2001; Ziv & Gothilf, 2006; Wang, 2008).

Com relação aos genes *cry*, análises filogenéticas têm mostrado que 4 dos 6 genes (*cry1a*, *cry1b*, *cry2a*, e *cry2b*) são mais similares ao *Cry1* de mamíferos, todos ritmicamente expressos no olho, no cérebro e no corpo e capazes de inibir a atividade transcricional de CLOCK:BMAL. Os transcritos de *cry1a* e *cry1b* têm pico de expressão na fase clara do ciclo, enquanto *cry2a* e *cry2b* apresentam pico mais tardio, já na fase escura. Salienta-se, contudo, que *cry1a* tem sua expressão diretamente induzida pela luz, enquanto todos os outros genes *cry* são regulados pela alça de retroalimentação do relógio. *Cry3* apresenta pico pela manhã e, embora semelhante ao *Cry1* de mamíferos, não inibe a ação do heterodímero. Foi, por isso, alocado em outra classe, juntamente com *cry4*, expresso com pico durante o dia, e considerado o mais divergente entre todos os genes *cry*, não sendo seu produto capaz de inibir CLOCK:BMAL e se assemelhando mais ao *cry* de *Drosophila* (Kobayashi *et al.*, 2000).

A responsividade direta à luz dos genes *per2* e *cry1a* tem sido relacionada à ação de TEF (*Thyrotroph Embrionic Factor*), um fator de transcrição sensível à luz pertencente à subfamília PAR (*Proline- and Acidic amino acid-Rich*) que, uma vez expresso, liga-se ao elemento D-box desses genes de relógio, desencadeando a transcrição dos mesmos (Vatine *et al.*, 2009; Gavriouchkina *et al.*, 2010; Weger *et al.*, 2011). Dessa forma, os produtos proteicos de *per2* e *cry1a* podem dirigir o funcionamento do núcleo da maquinaria molecular do relógio (Vatine *et al.*, 2011).

Este extenso conjunto de dados assinala fortemente que essa diversidade gênica que compõe o núcleo da maquinaria molecular do relógio de *zebrafish* não exprime redundância funcional, mas sim uma especialização bastante acurada, a qual é observável, principalmente, durante a ontogênese desse peixe (Vatine *et al.*, 2011).

Entretanto, mesmo diante dessa pluralidade, o funcionamento da maquinaria do relógio se manteve conservada filogeneticamente e, por isso, a descrição das alças de retroalimentação detalhada no tópico anterior se aplica quase que completamente a *zebrafish*. A figura a seguir apresenta o modelo atualmente adotado para explicar a interação entre os genes dentro das alças central e secundária que governam o relógio biológico desse teleosteo.

Figura 1. Modelo atual do mecanismo molecular do relógio circadiano de *Danio rerio* (zebrafish).

A entrada do sinal luminoso é mediada pelo fotopigmento circadiano inserido na membrana (no modelo proposto pelo autor, ainda há controvérsia sobre a natureza desse fotopigmento, porém, a literatura vem confirmando a melanopsina como a molécula que desempenha tal função). É desencadeada a expressão de TEF, que se ligará ao elemento D-box de *per2* e *cry1a*, ativando a expressão destes. PER2 e CRY1a iniciam o funcionamento da alça de retroalimentação central, composta por múltiplas cópias de *clock*, *bmal*, *per* e *cry*, o que resulta em uma regulação mais complexa desse sistema. Do lado positivo da alça, há expressão gênica de *clock* e *bmal* e produção de um heterodímero formado pelas proteínas oriundas desses genes. O complexo CLOCK:BMAL liga-se aos elementos E-box dos genes *per* e *cry* e dirige a expressão rítmica destes. Do lado negativo da alça, quando em grandes concentrações no citoplasma e dimerizados por fosforilação, o complexo PER:CRY retorna ao núcleo e reprime a própria transcrição ao interagir com CLOCK:BMAL através dos mecanismos *blocking type repression* e *displacement type repression*. Além da alça central, há a alça estabilizadora, que regula a expressão de *bmal*, induzindo-a ou reprimindo-a através dos genes controlados pelo relógio, *Ror* e *Rev-erb*. O ciclo completo desse sistema de retroalimentação se cumpre em um período próximo a 24 h, gerando, dessa forma, um padrão rítmico circadiano (Vatine *et al.*, 2011).

O funcionamento das alças de retroalimentação, por sua vez, sofre a influência de fatores humorais, que conseguem exercer modulação sobre a expressão dos genes de relógio

em diferentes modelos de relógios periféricos mantidos em cultura (Martins, 2007; Balsalobre *et al.*, 2000; Farhat *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2014a; 2014b). Entretanto, embora não seja uma ideia recente a sugestão de que haja regulação hormonal sobre o relógio biológico, ainda hoje, poucos estudos têm procurado demonstrar por quais mecanismos e vias de sinalização essa regulação ocorre.

Baseado em estudos prévios no laboratório que evidenciaram a expressão rítmica de *perl1b* em células ZEM-2S quando submetidas a ciclos claro/escuro (12:12 CE) ou a condições constantes (Farhat *et al.*, 2009) e, em vista da maior expressão da variante *cry1b* em células embrionárias Z3 (Cermakian *et al.*, 2002), o presente trabalho propôs-se a investigar estes genes como alvos de regulação por glicocorticoides nas células ZEM-2S.

1.4. Os glicocorticoides

A ritmicidade circadiana é uma característica inerente aos sistemas fisiológicos e, especialmente se tratando da fisiologia endócrina, a oscilação diária regular da maioria dos hormônios dentro de um período de 24 h bem como da responsividade dos tecidos-alvo a esses estímulos é observada nos diferentes organismos (Nunes, 2012).

Dentre as classes de hormônios mais intimamente relacionadas ao ritmo comportamental de sono/vigília, encontra-se a família dos glicocorticoides (GC), que exibem ritmos robustos ao longo do dia, com pico de liberação anterior ao início do período de atividade. Dessa forma, animais diurnos, apresentam maior concentração plasmática desses hormônios durante a manhã e, animais noturnos, à noite (Dickmeis *et al.*, 2013; Gamble *et al.*, 2014).

A produção e liberação dos GCs estão condicionadas ao eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise-adrenal/inter-renal (HHA/HHI), altamente conservado entre os vertebrados (Alsop & Vijayan, 2009), e ao sistema nervoso autônomo. A ligação entre o NSQ e o NPV (Moore & Eichler, 1972) permite, dessa forma, que se observem padrões rítmicos circadianos, ultradianos e sazonais nos níveis plasmáticos desses hormônios em condições não-estressantes (Buijs & Kalsbeek, 2001; Dickmeis *et al.*, 2013).

Os GCs são hormônios esteroides sintetizados pela glândula adrenal/suprarrenal (maioria dos tetrápodos), composta por duas porções embriológica, histológica e fisiologicamente distintas, sendo a mais externa o córtex e, a mais interna, a medula. Na maioria dos peixes, quase nunca há formação de adrenais, mas se encontram dois tipos de

tecidos misturados ou justapostos, a glândula inter-renal, homologamente funcional à adrenal (Romer & Parsons, 1985).

Em mamíferos adultos, o tecido medular, considerado um gânglio simpático modificado e, analogamente, as células cromafins de peixes, produzem adrenalina e quantidades variáveis de noradrenalina, enquanto o córtex adrenal, distinguido em três camadas nos mamíferos – zonas glomerulosa (mais externa), fasciculada (intermediária) e reticulada (mais interna) – sintetiza hormônios derivados do colesterol, reunidos sob o termo geral de adrenocorticoides (Norris, 1977; Romer & Parsons, 1985; Bentley, 1998).

A produção de GCs está restrita à zona fasciculada e dentre os principais hormônios que compõem esta família estão o cortisol, abundante em peixes e na maioria dos mamíferos, e a corticosterona, glicocorticoide predominante em anfíbios, répteis, aves e roedores (Cockrem, 2013). Além desses, a cortisona também produzida na zona fasciculada, embora inativa, pode ser transformada em cortisol pela 11- β -oxidação em outros tecidos, sendo liberada, juntamente com o cortisol, em altas concentrações em situações de estresse (Mommsen *et al.*, 1999).

Os papéis fisiológicos mais bem caracterizados desses esteroides estão predominantemente relacionados à resposta adaptativa ao estresse em todos os seus níveis, envolvendo a regulação do metabolismo energético, com mobilização de glicose e ácidos graxos para o sangue e restauração do estoque de glicogênio por gliconeogênese; supressão do sistema imunológico e inibição da reprodução e do crescimento. Em peixes, o cortisol combina estas ações àquelas que, nos vertebrados terrestres, são desempenhadas pelos mineralocorticoides, dessa maneira regulando também o balanço hidromineral (Mommsen *et al.*, 1999).

Portanto, em uma situação em que a homeostase seja interrompida por um estímulo estressor, a detecção desse sinal chega via sistema nervoso central e periférico ao hipotálamo endócrino. Neurônios localizados na porção parvicelular dos núcleos paraventriculares (PVN) secretam CRH (*Corticotropin Releasing Hormone*), o hormônio liberador de corticotropina. Este peptídeo, liberado na eminência mediana, entra na circulação porta-hipofisária e alcança a área das células corticotrópicas na hipófise anterior e ali desencadeia a síntese e clivagem da pró-opiomelanocortina (POMC), que originará, dentre outras moléculas, o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (Pickering, 1981; Donaldson, 1981; Mommsen *et al.*, 1999).

O ACTH é o principal estimulador da síntese e secreção de GCs e, uma vez liberado na corrente sanguínea, atinge as células adrenais/interrenais, ligando-se ao receptor de membrana de melanocortina 2 (*MC2R*). Atualmente, têm se demonstrado que o relógio da glândula

adrenal parece controlar a sensibilidade da glândula ao ACTH, o que se tornaria mais um ponto de regulação circadiana dos GCs (Dickmeis *et al.*, 2013).

A resposta desencadeada pelo ACTH promove o aumento da captação de lipoproteínas do plasma e controla o transporte do colesterol para a mitocôndria, na qual o colesterol deverá ser convertido em pregnenolona, pela clivagem da cadeia lateral ocasionada pela ação da enzima P-450. Nas membranas do retículo endoplasmático liso, esta molécula é metabolizada a 17 α -hidroxiesteroide ou a 17-deoxiesteroide. A enzima 21-hidroxilase, então, origina como produto final desta via o composto 11-deoxicortisol, que pode ser secretado ou então retornar para o interior da mitocôndria, onde a enzima 11 β -hidroxilase (P-450_{11 β}) o converterá para cortisol (Norris, 1997).

Associados às transcortinas, os GCs circulantes atuam sobre as células-alvo via receptor de glicocorticoide (GR), codificado pelo gene NR3C1 (Reyer *et al.*, 2013), que possui um nível relativamente alto de similaridade entre humanos e *Danio rerio* (Schaaf *et al.*, 2009; Schoonheim *et al.*, 2010). Pelo fenômeno de *splicing* alternativo, geram-se duas variantes desse receptor, GR α e GR β , sendo que GR α possui atividade transcricional, enquanto GR β apresenta o domínio de ligação ao ligante comprometido e atua como regulador negativo sobre a ação de GR α (Faria & Longui, 2006).

A maior ou menor responsividade dos tecidos aos GCs é dependente, sobretudo, da densidade intracelular de GR e os moduladores da transcrição do receptor são os próprios GCs, que reduzem a transcrição de GR por mecanismo de *down regulation*, conferindo proteção parcial a potenciais efeitos excessivos dos GCs (Dong *et al.*, 1989).

Bioquimicamente, os GCs, sendo provenientes do colesterol, são moléculas lipossolúveis e, por isso, conseguem atravessar a membrana plasmática por difusão passiva e se ligar a GR no interior da célula. Além disso, tem sido documentada a existência de receptores de membrana para GCs. Dessa forma, esses hormônios atuam por vias genômicas direta e indireta e via não-genômica (Rhen & Cidlowski, 2005).

A ação genômica direta acontece pela formação do complexo ligante-receptor, que se encaminha ao núcleo para ativar ou reprimir a transcrição de genes-alvo, aqueles que contêm na região 5' do promotor um ou mais elementos responsivos a glicocorticoide (GREs) (Donaldson, 1981; Mommsen *et al.*, 1999; Alsop & Vijayan, 2008; Aluru & Vijayan, 2009). Este processo altamente dinâmico na célula ainda pode contar com o recrutamento de proteínas coativadoras ou repressoras que modificam a estrutura da cromatina e facilitam ou inibem a atuação da maquinaria transcricional da célula. Diferentemente, a ação genômica indireta envolve a interação física do complexo GC-GR a outros fatores de transcrição, como

NFkB e AP-1, e parece ocorrer quando há concentrações mais baixas de GCs do que o necessário para que a associação GC-GR-GRE possa mudar a transcrição (Rhen & Cidlowski, 2005).

Entretanto, esses hormônios podem ainda exercer seus efeitos por vias não-genômicas, que envolveriam a ativação de segundos mensageiros (Mommensen *et al.*, 1999; Aluru & Vijayan, 2009; Roy & Rai, 2010), ou então a ativação de enzimas como a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) de forma GR-dependente, mas independente de transcrição (Rhen & Cidlowski, 2005).

Em relação à natureza do GR de membrana (GRm), Evans e colaboradores (2000) revelaram, por técnicas de purificação parcial e análises bioquímicas dos GRm para corticosterona em neurônios do anfíbio *Taricha granulosa*, que estas proteínas diferem dos receptores clássicos citosólicos (GRc). Posteriormente, Losel e colegas (2003) propuseram que esse receptor de membrana seria decorrente de um *splicing* alternativo durante o processamento do RNAm de GR.

Quanto à sinalização evocada por GRm, alguns trabalhos sugerem a associação do GRm ao sistema AMPc-PKA (proteína quinase A); entretanto, outros ainda consideram Ca^{+2} o segundo mensageiro responsável pela amplificação do sinal gerado pela ligação GC-GRm.

Em 1995, Thompson e colaboradores observaram o sinergismo entre dexametasona e a via da PKA na indução de apoptose de células cancerígenas CEM-C7, mas sem associar a ativação da via ao agonista do cortisol. Roy e Rai (2009) sugeriram que a rápida supressão por cortisol da atividade de fagócitos esplênicos do teleósteo *Channa punctatus* decorria da ativação de GRm. Com uso de bloqueadores da produção de AMPc e da ativação de PKA, propuseram que a via do AMPc/PKA estaria associada a essa resposta. Zhang e colegas (2012) detectaram o aumento da proteína ligada a GTP e de AMPc e a ativação da via da PKC (proteína quinase C) em células hipocâmpais de ratos quando estas foram submetidas ao tratamento com corticosterona e propuseram que os GCs estariam agindo através de receptores acoplados à proteína G, ativando diferentes vias de sinalização.

Entretanto, diferentemente da ação bem caracterizada dos GCs através de GRc, as investigações acerca da caracterização de GRm bem como das vias de sinalização subjacentes à ativação deste receptor ainda são controversas e pouco compreendidas.

1.5. Regulação hormonal dos relógios biológicos: a ação dos glicocorticoides sobre os osciladores periféricos

As investigações acerca da comunicação entre o relógio biológico central e os relógios periféricos suscitaram a busca por fatores endógenos encarregados de transmitir a informação temporal para o restante do organismo.

O trabalho pioneiro realizado por Balsalobre e colaboradores (1998) demonstrou que choque de soro em cultura celular de fibroblastos de rato ocasionava a transcrição circadiana dos genes de relógio *Per1* e *Per2* e dos fatores de transcrição REV-ERB α , DBP (*D-site Binding Protein*) e TEF.

Em sequência, o mesmo grupo hipotetizou que os GCs poderiam exercer a função de agentes sincronizadores dos relógios periféricos contidos em tecidos-alvo, uma vez que apresentam uma oscilação de liberação diária característica. De fato, no ano de 2000, Balsalobre e colegas mostraram que a administração de dexametasona (DEXA), análogo sintético de GCs, por 1 h sobre cultura de fibroblastos induzia a expressão circadiana de genes de relógio. Ainda no mesmo estudo, injetando DEXA em camundongos antes ou durante o pico de expressão de *Per1*, a droga prolongava e/ou aumentava significativamente os níveis dos transcritos desse gene. Se administrada posteriormente ao pico, promovia um novo aumento de expressão de *Per1*.

Em cultura de hepatócitos primários de rato, Torra e colaboradores (2000) demonstraram a ação dos GCs como reguladores negativos da transcrição de *Rev-erba*. Embora o mecanismo pelo qual os GCs efetuam essa repressão ainda seja desconhecido, os autores sugeriram que essa modulação hormonal poderia estar associada ao papel adicional que *Rev-erba* exerce sobre a regulação do metabolismo, estabelecendo assim uma ponte entre o relógio circadiano e a homeostasia do metabolismo.

Corroborando os dados de Balsalobre e colegas (2000), Yamamoto e colaboradores (2005) identificaram um GRE na região promotora do gene *Per1* de mamíferos, indicando que os GCs aumentariam os níveis de transcritos desse gene via ação genômica direta e, sendo alvo desses hormônios, *Per1* poderia ser designado como um marcador de estresse. Além disso, ficava proposta uma nova via de regulação transcricional para esse gene, para o qual já era conhecida a regulação operada pelo heterodímero CLOCK:BMAL1 e pelo fator de transcrição CREB (*cAMP Response Element-Binding protein*), que atua sobre o elemento responsivo ao AMPc (CRE) também presente no promotor de *Per1*.

Em 2009, So e colaboradores observaram que DEXA estimulava um padrão oscilatório de transcrição dos genes de relógio *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Npas2* (parálogo de *Clock*) e *Bmal1* e dos genes controlados pelo relógio, *Rev-erb* α/β e *Dbp* em células tronco mesenquimais primárias de camundongos e que *Per1* e *Per2* apresentavam GREs em seus promotores.

Diante dessas evidências, Dickmeis (2009) propôs um modelo de como os GCs regulariam o funcionamento dos relógios periféricos, o qual se encontra representado na figura a seguir.

Figura 2. Mecanismo hipotético da modulação circadiana da maquinaria molecular do relógio por glicocorticoides (GCs). A presença de GRE positivo na região promotora de *Per1* parece mediar a indução da transcrição pelo complexo GR-GC (Yamamoto *et al.*, 2005). A repressão de *Rev-erbα*, por sua vez, poderia estar relacionada à presença de um GRE negativo no promotor deste gene (Torra *et al.*, 2000) ou aos níveis aumentados de *Per1* que, ao bloquearem a ação transcrricional de CLOCK:BMAL1, impedem que este se ligue ao elemento E-box dos genes de relógio e dos genes controlados pelo relógio, como *Rev-erbα*. A diminuição dos níveis de *Rev-erbα* promoveria o aumento da transcrição de *Bmal1* (Koyanagi *et al.*, 2006). Dessa forma, os GCs modulariam direta e/ou indiretamente a maquinaria molecular do relógio (Dickmeis, 2009).

Interessantemente, apesar da ampla distribuição de GR por quase todos os tecidos, o receptor praticamente não é expresso no NSQ (Rosenfeld *et al.*, 1988) e o tratamento crônico com prednisolona, outro análogo sintético de GCs, é capaz de modular a expressão de genes de relógio em tecidos periféricos de mamíferos, como fígado e músculo esquelético, mas não no NSQ (Koyanagi *et al.*, 2006).

Portanto, diferentemente do relógio central que, aparentemente, é responsivo apenas ao ciclo claro/escuro, a existência dos osciladores periféricos e sua suscetibilidade a fatores cíclicos endógenos conferiria maior plasticidade e precisão na regulação dos ritmos biológicos espalhados pelo organismo. Damiola e colaboradores (2000) e Stokkan e colegas (2001) observaram que, sob condições de disponibilidade contínua de alimento, o NSQ define as fases dos relógios periféricos. Mas quando animais são impostos a uma programação alimentar diária que difere do ciclo diário de alimentação/jejum ao qual estavam condicionados, os tecidos periféricos, porém não o NSQ, têm suas fases redefinidas.

A regulação circadiana por um ciclo alimentação/jejum permite ao organismo programar-se antecipadamente para otimizar os processos de consumo, armazenagem e utilização dos recursos energéticos (Lamia *et al.*, 2008). Sabendo-se que os GCs estão diretamente ligados à regulação do metabolismo energético, Le Minh e colegas (2001), demonstraram que o desacoplamento entre osciladores periféricos e oscilador central em condição de alimentação restrita era impedido pela sinalização evocada pelos GCs.

Embora essa reunião de dados aponte nitidamente a influência dos GCs na regulação dos relógios biológicos, os mecanismos e a relevância dessa modulação hormonal ainda não são bem estabelecidos. Além disso, relógios periféricos de mamíferos são os modelos predominantemente explorados nessas pesquisas, ao passo que estudos com vertebrados não-mamíferos, os quais apresentam uma organização mais descentralizada do sistema circadiano e permitem análises sob o ponto de vista evolutivo, têm recebido pouca atenção.

Com base, portanto, nessas informações e no fato de que células embrionárias de *Danio rerio* em cultura podem constituir modelos de relógios periféricos, sendo diretamente sensíveis à luz e apresentando um mecanismo molecular do relógio circadiano semelhante ao de mamíferos, propôs-se aqui adotar a linhagem ZEM-2S para investigar o potencial papel dos GCs como agentes sincronizadores, bem como a modulação exercida por esses hormônios sobre a expressão gênica dos genes de relógio *per1b* e *cry1b*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a expressão temporal dos genes *per1b* e *cry1b* na linhagem ZEM-2S do teleósteo *Danio rerio* em condições de iluminação variáveis e avaliar o efeito dos glicocorticoides neste modelo de relógio periférico.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a expressão temporal dos genes *per1b* e *cry1b* na linhagem ZEM-2S do teleósteo *Danio rerio* em condições de escuro constante e de ciclo claro/escuro;
- Avaliar os efeitos de dexametasona em células ZEM-2S, analisando sua ação sobre a expressão dos genes *per1b* e *cry1b*;
- Caracterizar o subtipo de receptor de glicocorticoide envolvido na resposta de *per1b* e *cry1b* em células ZEM-2S com o uso do antagonista mifepristone (RU 486).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células ZEM-2S

Células da linhagem ZEM-2S (gentilmente cedidas pelo Prof. Mark Rollag, Uniformed Services University of the Health Sciences, USA e adquiridas originalmente da ATCC, CRL-2147, Virginia, USA) foram mantidas em frascos de 75 cm² com meio de cultura composto por 5 partes de L15, 3 partes de F12 e 2 partes de D-MEM (Athena, Campinas, Brasil), complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell, Campinas, Brasil), 1% de antibiótico e antifúngico (10.000 U/mL de penicilina/ 10.000 µg/mL de estreptomicina/ 25 µg/mL de anfotericina B, Invitrogen, California, USA) e retinaldeído na concentração de 10⁻⁷ M (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) em estufa a 28°C no escuro. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana e, quando atingiam o grau de confluência próximo a 80-90%, as células eram subcultivadas (1:3) por meio do processo de repique com Tyrode/EDTA (NaCl 8,0 g/L; KCl 0,2 g/L; NaHCO₃ 1,0 g/L; NaH₂PO₄ 0,05 g/L; MgCl₂ 1,0 g/L; EDTA 1,86 g/L) e transferidas a novos frascos. Para os experimentos, o meio de cultura utilizado sofreu a redução de SFB, de 10% para 2%.

3.2. Protocolo de montagem dos experimentos

O meio de cultura de frascos confluentes foi removido e as células foram lavadas com PBS sem Ca²⁺ e receberam 3 mL de Tyrode/EDTA para o desprendimento das células. Estando estas em suspensão, 4 mL de meio completo foram adicionados para repor o cálcio e cessar a atividade do EDTA, sendo a suspensão transferida a tubos de centrífuga de 15 mL e centrifugada a, aproximadamente, 500 g por 2 min. Após remoção do sobrenadante, o *pellet* de células foi ressuspensionado em 5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB, 1% de antibiótico/fúngico e retinaldeído 10⁻⁷ M. Uma alíquota de 200 µL foi colocada em um *eppendorf*, com 300 µL de PBS e 500 µL de Trypan Blue 0,4%, totalizando 1 mL de solução final. A partir dessa solução, efetuou-se a contagem de células utilizando a câmara de Neubauer, aceitando-se uma amostragem entre 200 a 500 células contadas em ambos os quadrículos presentes na câmara (contagem feita nos quadrantes das 4 extremidades e do centro dos dois quadrículos, somando 10 quadrantes).

Para calcular o volume necessário de suspensão de células para obtenção de densidade final igual a 1x10⁶ células/mL por frasco de 25 cm², empregou-se a fórmula: $N \times 5 \times 10^3$, onde

N igual ao número de células contadas não-coradas; 5 referente ao fator de diluição da alíquota de 200 μL e 10^3 equivalente a solução final de 1 mL preparada para a contagem.

Adicionado o volume calculado da suspensão de células em cada frasco de 25 cm^2 , acrescentou-se meio de cultura para completar volume final de 4 mL.

Para experimentos com tratamento hormonal, empregou-se dexametasona solúvel em água (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), um análogo sintético de glicocorticoides, diluído para uma concentração final de 10^{-7} M no meio de cultura.

Com relação à concentração de DEXA utilizada, em peixes de modo geral os níveis plasmáticos basais de cortisol – isto é, em condições livres de estresse – variam de 10^{-11} M a 10^{-7} M, sendo dependente também de fatores como o estágio e a história de vida do animal (Lima *et al.*, 2006). A dosagem da concentração plasmática de cortisol nesses vertebrados, entretanto, é dificultosa e, muitas vezes, controversa para enquadrar ou não o animal em situação de estresse (Mommensen *et al.*, 1999). Para *zebrafish*, os níveis circulantes de cortisol não foram encontrados descritos na literatura durante o estabelecimento do protocolo experimental. Dessa forma, optamos livremente para o presente estudo apenas pela concentração de 10^{-7} M.

Para ensaios com o antagonista mifepristone (RU 486) (Enzo Life Sciences, Maryland, USA), a solução estoque foi feita em etanol 100%, com diluições intermediárias em água MilliQ. Na montagem desse pacote experimental, o meio de cultura distribuído aos frascos após a semeadura das células foi previamente suplementado com o antagonista nas concentrações finais de 10^{-5} M ou 10^{-6} M.

3.3. Experimentos em ciclo claro/escuro (12:12 CE)

As garrafas experimentais foram acondicionadas em estufa previamente calibrada para 28°C e ajustada para um regime fotoperiódico de 12:12 CE, com intensidade luminosa de 680 lux de luz branca (99,28 uWatts/cm^2) (*Ecolume full spectrum*, lâmpada de luz branca, modelo YZ8W) incidente sobre a superfície das garrafas.

A partir deste ponto, as células foram mantidas sob estas condições por 6 dias ininterruptos e, no início da fase clara do 7º dia (quando as luzes se acenderam), passou-se à extração do RNA total de quatro em quatro horas, com três garrafas por ponto, totalizando 20 horas de extração.

Para este e todos os outros pacotes experimentais descritos, realizaram-se, pelo menos, dois experimentos independentes para obtenção de $n=6$.

Figura 3. Protocolo de ciclo claro/escuro (12:12 CE). Células ZEM-2S foram submetidas a ciclo claro/escuro (12:12 CE) por 6 dias sem nenhuma manipulação, com extração de RNA total a partir do início do 7º dia, a cada 4 h durante 20 h (ZTs 0, 4, 8, 12, 16 e 20), para avaliação do perfil de expressão gênica ao longo de um ciclo circadiano.

3.4. Experimentos em escuro constante (EE) com pulsos diários de dexametasona (DEXA)

As garrafas experimentais foram acondicionadas em estufa previamente calibrada para 28°C, a qual permaneceu em escuro constante ao longo dos 6 dias, até a etapa da extração de RNA total.

Neste pacote experimental, três grupos foram organizados: 1) células controle sem nenhum tipo de manipulação; 2) células que sofreram 2 trocas de meio diariamente e 3) células que receberam pulsos diários de DEXA 10^{-7} M.

Após 24 h da montagem do experimento, as células designadas para tratamento hormonal tiveram o meio de cultura substituído por meio contendo DEXA 10^{-7} M, com tempo de permanência de 2 h. Após esse período, o meio de cultura foi novamente substituído por meio sem DEXA. Esse procedimento foi repetido todos os dias sempre no mesmo horário, totalizando 5 pulsos ao longo da semana, até a extração do RNA total no 7º dia, iniciada a partir do momento em que se completaram 24 h após o último pulso.

Para distinguir o efeito dos pulsos diários de DEXA do efeito da manipulação provocada pela troca de meio, um grupo de células sofreu as mesmas trocas de meio que o grupo tratado, porém sempre com meio de cultura livre de DEXA.

Todas as manipulações em EE foram feitas sob luz vermelha 7W (~5 lux) em iluminador Konex contendo um filtro *Safe-Light* GBX-2 (Kodak).

Figura 4. Protocolo de escuro constante (EE). (1) Células ZEM-2S não foram manipuladas, ou (2) foram submetidas a trocas de meio, ou (3) receberam pulsos diários de DEXA 10^{-7} M. A partir do início do 7º dia, procedeu-se à extração de RNA total a cada 4 h durante 20 h (ZTs 0, 4, 8, 12, 16 e 20).

3.5. Experimentos com antagonista mifepristone (RU 486)

As garrafas experimentais foram acondicionadas em estufa em escuro constante ao longo dos 6 dias, até a etapa da extração de RNA total.

Neste pacote experimental, cinco grupos de células foram organizados: 1) controle com RU 486 10^{-5} M; 2) controle com RU 486 10^{-6} M; 3) controle positivo com DEXA 10^{-7} M; 4) tratado com RU 486 10^{-5} M + DEXA 10^{-7} M; 5) tratado com RU 486 10^{-6} M + DEXA 10^{-7} M.

O antagonista nas concentrações de 10^{-5} M ou 10^{-6} M esteve presente durante todo o experimento nos grupos 1, 2, 4, 5. Reproduziu-se o mesmo procedimento de pulsos diários de

dexametasona descritos no item 4 deste capítulo, diferindo apenas pela presença constante de RU 486 no meio de cultura dos grupos mencionados.

Este antagonista é eficaz em prevenir a ativação de receptor de glicocorticoide por competir pelo mesmo sítio de ligação que o hormônio e ligar-se com afinidade cerca de 3 a 4 vezes maior que DEXA e 18 vezes maior que cortisol (Bamberger & Chrousos, 1995). Thompson e colegas (1995) descrevem que uma concentração de RU 486 equimolar à de DEXA bloqueou a ação desse agonista. No presente trabalho, haja vista a ausência de uma curva dose-resposta para determinação da concentração do antagonista a ser utilizada nos experimentos com a linhagem ZEM-2S e o conhecimento de que dexametasona é um agonista sintético que apresenta afinidade maior pelo GR bem como um tempo de ativação prolongado sobre este quando comparado ao glicocorticoide endogenamente produzido (Conway-Campbell *et al.*, 2010), definiram-se as concentrações de 10^{-5} M e 10^{-6} M para os ensaios com RU 486. O momento de extração de RNA total foi determinado a partir do estabelecimento do ponto de maior expressão de *per1b* quando sob influência de DEXA, a qual se deu no ZT 16.

3.6. Extração de RNA total, RT-PCR e PCR quantitativo

Após descarte do meio, adicionou-se 1 mL de TRIzol para lisar as células. Os lisados foram coletados em *eppendorfs* de 1,5 mL, mantidos em temperatura ambiente por 5 min e, posteriormente, colocados sobre gelo por 5 min. As amostras foram mantidas congeladas em freezer -80°C até que se procedesse com os próximos passos. Foram adicionados 200 µL de bromocloropropano (BCP, Sigma Aldrich, Missouri, USA), seguido de agitação vigorosa em vórtex por 15 seg. Após 10 min à temperatura ambiente, foi realizada uma centrifugação a 12.000 xg a 4°C por 15 min e, posteriormente, 500 µL da fase aquosa superior contendo RNA foram transferidos para outro *eppendorf* de 1,5 mL. Para precipitar o RNA, foram adicionados 650 µL de isopropanol 100% (Sigma Aldrich, Missouri, USA), pipetando-se a solução para cima e para baixo uma única vez e deixando à temperatura ambiente por 10 min. Após nova centrifugação à mesma velocidade e temperatura durante 35 minutos, o sobrenadante foi removido, e as amostras foram colocadas imediatamente no gelo. Em seguida, adicionou-se 1,3 mL de etanol 75%, agitou-se no vórtex, e centrifugou-se a 12.000 xg a 4°C por 15 min, colocando-se a -20°C por uma hora para precipitar o RNA restante. Após remoção do sobrenadante, novamente foi adicionado 1,3 mL de etanol 75%, agitando no vórtex e colocando a amostra no gelo.

Após centrifugação à mesma velocidade, temperatura e tempo descritos acima, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* secado à temperatura ambiente por 5 a 10 min. O *pellet* foi ressuspensionado com 20 µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (H₂O DEPC, Ambion, California, EUA). Para remoção de eventual contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase I (*kit turbo DNA-freeTM*, Life Technologies, California, USA). Resumidamente, foram acrescentados 10% do volume de *10x Turbo DNase buffer* e 1 µL de *Turbo DNase*, misturando-se gentilmente. As amostras foram então incubadas por 30 min a 37°C, recebendo 10% do volume de reagente de inativação, seguindo-se incubação por 2 min à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 10.000 xg por 2 min para precipitar o reagente de inativação com a DNase, transferindo-se o sobrenadante contendo o RNA para novo *ependorf*.

Fez-se leitura da concentração de RNA total das amostras em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop, Delaware, USA) assumindo-se para sua utilização uma razão 260/280 acima de 1,6 e quantidade de RNA total suficiente (2 µg de RNA) para preparo das reações em RT-PCR.

O volume em µL necessário da solução de RNA total para obtenção de 2 µg foi usado para a reação de RT-PCR adicionando-se 1 µL de oligonucleotídeos randômicos (50 µg/µL) e 1 µL de dNTPs 10 mM (ambos da Life Technologies, California, USA), em reação com volume final de 13 µL ajustado com H₂O DEPC. As amostras foram submetidas a aquecimento por 5 min a 65°C e a seguir resfriadas para 4°C. Posteriormente, adicionou-se a cada amostra um mix constituído de 4 µL de tampão para PCR (5x), 1 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de 40 U/µL de inibidor de ribonuclease e 1 µL de 200 U/µL da enzima *Superscript III* (todos reagentes da Life Technologies, California, USA), para um volume final de 20 µL. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada novamente por 5 min a 25°C e 50 min a 50°C, seguida por incubação a 70°C por 15 min para interrupção da reação. O cDNA sintetizado foi mantido a 4°C e utilizado nas reações subsequentes de PCR quantitativo (em tempo real).

Para os ensaios de PCR quantitativo utilizou-se o protocolo multiplex (metodologia *Taqman*) para análise simultânea dos genes *cry1b*, *per1* e RNAr 18S, com um mix contendo os *primers* (300 nM para *per1b* e *cry1b* e 50 nM para RNAr 18S), sondas (200 nM para *per1b* e *cry1b* e 50 nM para 18S), Supermix 2X (BioRad, ou Life Technologies, ambos da California, USA), complementado para aumentar as concentrações finais para 400 µM de dNTPS, 6 mM de MgCl₂, 0,1 U/µL de *Platinum Taq* DNA polimerase (Life Technologies, California, USA), e H₂O *DNase/RNase free* para volume final de 30 µL/poço. Adicionaram-

se 3 µL de cada amostra de cDNA em *ependorfs* previamente identificados já contendo 87 µL do mix, para que, ao final, fossem feitas triplicatas, cada uma contendo 1 µL de cDNA.

As sequências dos *primers* e sondas utilizadas estão indicadas na Tabela 1 a seguir, tendo sido utilizado RNA ribossômico 18S como normalizador dos experimentos conforme descrito na literatura (Goidin *et al.*, 2001; Schmid *et al.*, 2003; Aerts *et al.*, 2004; Zhu & Altmann, 2005; McCurley & Callard, 2008), com *primers* desenhados em região altamente conservada. Todos os ensaios foram realizados em um termociclador iQ5 (BioRad Laboratories, EUA), nas seguintes condições: 7 min a 95° C seguido por 45 ciclos de 30 seg a 95° C e 30 seg a 60° C.

A eficiência dos *primers* foi verificada através do cálculo do ângulo de inclinação da curva de regressão linear. Após uma diluição seriada de uma única amostra de cDNA (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16), foi feita uma corrida de PCR quantitativo em multiplex. Calculou-se, a seguir, a média das triplicatas dos C_{Ts} para cada gene, que foi usada para construir o eixo y do gráfico de regressão linear. Para cada ponto da curva foi calculado o log da diluição seriada do cDNA utilizado, que compôs o eixo x. A eficiência para cada par de *primer* foi calculada de acordo com a equação $10^{(-1/x)-1} \times 100$, onde x corresponde ao ângulo de inclinação da curva de regressão linear. Valores entre 90% e 110% foram considerados como indicadores de alta eficiência.

Tabela 1. *Primers* e sondas para os ensaios de PCR quantitativo

<i>Templates</i>	Sequências	Seletividade	Concentração final
RNA 18S X03205.1	For: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	Todos os vertebrados	50 nM
	Rev: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'		50 nM
	Pr: 5'-/5TexRd/TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC-3BHQ_2/-3'		50 nM
<i>per1b</i>	For: 5'-AGCTCAAACCTCTCACAGCCCT T-3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'-TCAGAGCTGGCACTCAACAGA-3'		300 nM
	Pr: 5'-/5HEX/TTTGAAACAGAGGGACTGTCCACTGCTG/3BHQ_1/-3'		200 nM
<i>cry1b</i>	For: 5'-CGTCTCTGGAGGAGCTCGG-3'	<i>Danio rerio</i>	300 nM
	Rev: 5'-TCT CCC CCG GGC CAC - 3'		300 nM
	Pr: 5'-/5Cy5/TCCACCCAGCAGTTCTCTGGCATA CA/3BHQ_2/-3'		200 nM

For = forward; Rev = reverse; Pr = sonda fluorescente; TexRed = fluoróforo Texas Red; Cy5 = fluoróforo Cyanine 5; Hex = fluoróforo 6-carboxy-2,4,4,7,7-hexachlorofluorescein succinimidyl ester; 3BHQ_1 = Black hole quencher 1 (IDT); 3BHQ_2 = Black hole quencher 2 (IDT).

3.7. Análise estatística

O método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ é conveniente para analisar mudanças relativas na expressão gênica determinada por PCR quantitativo (Livak & Schmittgen, 2001). Neste caso, deve-se adotar um gene para controle interno (*housekeeping gene*), sendo aqui utilizado o RNA eucariótico 18S.

A análise por meio dele permite uma quantificação relativa que, diferentemente da quantificação absoluta, descreve a mudança na expressão de um gene alvo em comparação a um grupo de referência, como um grupo controle (Livak & Schmittgen, 2001), tendo sido este o método empregado para avaliar a expressão de *perl1b* e *cry1b* em 12:12 CE e em EE, com e sem tratamento hormonal, na presença ou na ausência de mifepristone (RU 486).

Por meio da comparação entre o número de ciclos de amplificação dos poços obtido nas porções de crescimento geométrico das curvas, através de uma reta limiar denominada C_T (*Threshold Cycle*), que cruza essas porções, é possível saber o ΔC_T , que é a diferença entre os valores médios do gene de interesse e do RNA 18S. Então, subtrai-se a média de menor valor dos valores médios encontrados para os poços dos vários tempos, ou a média dos poços controle dos poços tratados, obtendo-se o $\Delta\Delta C_T$.

Colocando-se esse valor como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) obteve-se o número de vezes que o gene está expresso após o tratamento em questão em relação ao menor valor de expressão do grupo em escuro constante sem trocas de meio, isto é, que não sofreu nenhuma manipulação.

Em estudos cronobiológicos, quando os *zeitgebers* estão devidamente caracterizados, como ciclos claro/escuro, alimentação/jejum ou estações do ano, um conjunto de técnicas de análise de ritmos biológicos pode ser aplicado a uma série temporal. Dentre tais testes estatísticos possíveis, se encontra a análise de variância (ANOVA, na sigla em inglês), cujo emprego apresenta a vantagem de comparar médias dentro do período investigado, avaliando se as variações entre os diferentes horários são significativamente maiores que a variação aleatória inerente aos dados, sem, contudo exigir uma forma específica de série temporal (Benedito-Silva, 2003).

Utilizando o software GraphPad Prism 5, para comparar os níveis de significância entre os diferentes tempos em uma mesma condição, em que a única variável é o tempo, aplicou-se a análise de variância de uma via, *One-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Entre os diferentes tempos de um par de grupos, como escuro constante e fotoperíodo e grupos controle e tratado, empregou-se a análise de variância de duas vias, *Two-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, assumindo para ambos os testes, $p < 0,05$ como probabilidade de rejeição da hipótese nula.

Antes do emprego dos testes de análise de variância, os dados foram verificados para teste de normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov e expressos como a média $\pm$ desvio padrão da média (SEM). Todos os resultados foram originados de, no mínimo, dois experimentos independentes, cada um com $n=3$.

4. RESULTADOS

4.1. Expressão temporal dos genes de relógio *per1b* e *cry1b* em células ZEM-2S submetidas a escuro constante (EE) e a ciclos claro/escuro (12:12 CE)

Baseado no conhecimento de que o ciclo claro/escuro é um potente agente sincronizador dos ritmos biológicos, o primeiro objetivo do projeto pretendia determinar o perfil de expressão temporal dos genes de relógio *per1b* e *cry1b* na linhagem ZEM-2S, em condições de escuro constante (EE) e sob o regime fotoperiódico 12:12 CE durante seis dias, com extração do RNA total ao início do 7º dia.

Para todos os resultados apresentados, padronizou-se como menor valor de expressão aquele obtido no grupo em EE sem trocas de meio (Figuras 5 A e 6 A).

Em condições constantes EE, o perfil de expressão de *per1b* apresentou oscilação ao longo das 24 h (Figura 5 A). Entretanto, quando as células foram submetidas a ciclos claro/escuro, a oscilação tornou-se robusta, com notável distinção dos níveis de RNAm entre as fases clara e escura. O pico de expressão deu-se no início da fase clara, no ZT 0, seguido de diminuição dos transcritos em direção à fase escura, na qual o transcrito alcançou os valores mais baixos no ZT 16 (Figura 5 B).

A análise estatística detectou diferenças temporais extremamente significativas na expressão de *per1b* resultantes do efeito do ciclo claro/escuro (CE) comparado a EE: observa-se um aumento de cerca de 80 vezes dos níveis dos transcritos desse gene no ZT0 e de cerca de 30 vezes no ZT4 em relação ao seu controle em EE, definindo um perfil de expressão caracteristicamente circadiano.

Figura 5. Expressão temporal de *per1b* em EE e em 12:12 CE, sem trocas de meio. Os dados são a média ($n = 4 - 6$ frascos) $\pm$ EPM do transcrito de *per1b* normalizado pelo transcrito do RNA 18S e expressos relativos ao menor valor do grupo em EE sem trocas de meio. **(A)** Células foram mantidas em EE por 6 dias e no início do 7º dia, o RNA total foi extraído por 20 horas a cada 4 horas. **(B)** Células foram submetidas ao ciclo 12:12 CE por 6 dias e no início da fase clara do 7º dia, o RNA total foi extraído por 20 h a cada 4 h. *One-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey apontou diferenças estatísticas entre as horas ou os ZTs ($p < 0,05$, a significativamente diferente de b). Asteriscos indicam diferença estatística do ZT do grupo em 12:12 CE em relação ao respectivo controle em EE (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, *Two-way* ANOVA, seguida por pós-teste de Bonferroni).

Em relação ao gene *cry1b*, oscilações nos níveis de seu RNAm em EE não foram detectadas (Figura 6 A), ao passo que, em exposição ao ciclo 12:12 CE, mesmo com níveis de transcritos baixos como os observados em EE, o perfil de expressão temporal apresentou variação ao longo das 24 h, com pico alcançado no ZT0, seguido de um declínio nos ZTs 4 e 8. Um novo aumento de expressão é observado no início da fase escura, no ZT 16, seguido de um decréscimo próximo a zero no ZTs 16 e 20 (Figura 6 B).

Para *cry1b*, o ciclo CE claramente impôs uma variação temporal sobre sua expressão gênica, a qual não foi vista condições constantes, evidenciando, assim como para *per1b*, a presença de um perfil de expressão circadiano.

Figura 6. Expressão temporal de *cry1b* em EE e em 12:12 CE, sem trocas de meio. Os dados são a média ($n = 4 - 6$ frascos) $\pm$ EPM do transcrito de *cry1b* normalizado pelo transcrito do RNA 18S e expressos relativos ao menor valor do grupo em EE sem trocas de meio. **(A)** Células foram mantidas em EE por 6 dias e no início do 7º dia, o RNA total foi extraído por 20 h a cada 4 h. **(B)** Células foram submetidas ao ciclo 12:12 CE por 6 dias e no início da fase clara do 7º dia, o RNA total foi extraído por 20 h a cada 4 h. *One-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey apontou diferenças estatísticas entre os ZTs ($p < 0,05$, *a* significativamente diferente de *b*). Asteriscos indicam diferença estatística do ZT do grupo em 12:12 CE em relação ao respectivo controle em EE (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, *Two-way* ANOVA, seguida por pós-teste de Bonferroni).

4.2. Expressão temporal dos genes de relógio *per1b* e *cry1b* em células ZEM-2S em EE submetidas a trocas de meio

Na literatura é apontado que fatores presentes no meio de cultura, ou mesmo a simples substituição do meio em horários regulares, poderiam se constituir como pista ambiental para células em cultura. Portanto, de forma a distinguir o efeito da simples manipulação pela troca de meio dos efeitos resultantes do tratamento hormonal, os resultados expostos a seguir apresentam a expressão de *per1b* e *cry1b* em EE sem e com manipulações.

Como já relatado e observado na Figura 5 A, *per1b* apresenta variação temporal em seu perfil de expressão mesmo em condições constantes (Figura 7 A). Frente às trocas de meio realizadas diariamente, os níveis de RNA_m do gene mantiveram-se oscilantes ao longo das 24 h, porém agora com um perfil de expressão modificado, com aparente mudança de fase, pois

os maiores níveis de transcritos são observados nas primeiras 12 h (0, 4 e 8 h) e os menores, na segunda metade do ciclo (12, 16 e 20 h) (Figura 7 B).

Embora em EE, os níveis de RNAm de *per1b* já se apresentem oscilantes, as trocas de meio em EE foram capazes de promover alteração desse perfil e aumentar o nível de expressão, sobretudo nas primeiras horas, em cerca de 6 a 8 vezes, como sinalizado pelo teste estatístico.

Figura 7. Expressão temporal de *per1b* em EE sem e com trocas de meio diárias. Os dados são a média ($n = 4 - 6$ frascos) $\pm$ EPM do transcrito de *per1b* normalizado pelo transcrito do RNA 18S e expressos relativos ao menor valor do grupo em EE sem trocas de meio. **(A)** Células foram mantidas em EE por 6 dias e no início do 7º dia, o RNA total foi extraído por 20 horas a cada 4 horas. **(B)** Células foram mantidas em EE por 6 dias e submetidas diariamente a 2 trocas de meio sem DEXA como controle do grupo submetido a tratamento hormonal. No 7º dia, completadas as 24 h após a última troca de meio, o RNA total foi extraído por 20 h a cada 4 h. *One-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey apontou diferenças estatísticas entre as horas ou os ZTs ($p < 0,05$, *a* significativamente diferente de *b*). Asteriscos indicam diferença estatística do ZT do grupo em EE com trocas de meio em relação ao respectivo controle em EE (*** $p < 0,001$, *Two-way* ANOVA, seguida por pós-teste de Bonferroni).

Como já descrito na Figura 6 A, *cry1b* não apresentou variação temporal em EE (Figura 8 A), porém as trocas de meio diárias provocaram variação temporal sobre sua expressão. Embora os valores dos níveis dos transcritos não tenham aumentado ou diminuído significativamente em relação ao grupo EE sem trocas de meio, nos ZTs 4 e 8 distinguem-se

maiores expressões quando comparados aos outros ZTs, sendo ainda evidenciada estatisticamente em ZT0, uma redução nos níveis de transcritos de *cry1b* (Figura 8 B) em relação ao seu respectivo controle (Figura 8 A).

Figura 8. Expressão temporal de *cry1b* em EE sem e com trocas de meio diárias. Os dados são a média ($n = 4 - 6$ frascos) $\pm$ EPM do transcrito de *cry1b* normalizado pelo transcrito do RNA 18S e expressos relativos ao menor valor do grupo em EE sem trocas de meio. **(A)** Células foram mantidas em EE por 6 dias e no início do 7º dia, o RNA total foi extraído por 20 horas a cada 4 horas. **(B)** Células foram mantidas em EE por 6 dias e submetidas diariamente a 2 trocas de meio sem DEXA como controle do grupo de células submetido tratamento hormonal. No 7º dia, completadas as 24 h após a última troca de meio, o RNA total foi extraído por 20 h a cada 4 h. *One-way* ANOVA seguida pelo teste de Tukey apontou diferenças estatísticas entre os ZTs ($p < 0,05$, *a* é significativamente diferente de *b*). Asteriscos indicam diferença estatística do ZT do grupo com trocas de meio em relação ao seu controle em EE sem trocas de meio (** $p < 0,01$, *Two-way* ANOVA seguida por pós-teste de Bonferroni).

4.3. Expressão temporal dos genes de relógio *per1b* e *cry1b* em células ZEM-2S em EE submetidas a pulsos diários de dexametasona 10^{-7} M (DEXA 10^{-7} M)

Células de mamíferos em cultura utilizadas como modelos de relógio periférico têm se mostrado suscetíveis à ação de GCs, os quais atuam sobre a expressão gênica dos componentes da maquinaria molecular do relógio biológico.

A fim de avaliar os GCs como moduladores da expressão gênica de *per1b* e *cry1b* e testar a hipótese de que esses hormônios poderiam atuar como agentes sincronizadores

também em células de teleósteos, foi desenhado um protocolo experimental em que a presença e a ausência do hormônio no meio de cultura se constituíssem para a população de células mantida em EE como uma pista temporal.

As comparações foram traçadas entre o grupo em EE com trocas de meio livre de hormônio e o grupo em EE que recebeu tratamento hormonal diariamente por 2 h. Como descrito anteriormente (Figura 7 A), as trocas de meio para a expressão de *per1b* promoveram variações temporais (Figura 9 A), as quais foram mantidas no grupo tratado com DEXA. Todavia, os valores médios de expressão, sobretudo nos ZTs 0, 4, e 8, foram reduzidos após o tratamento hormonal, enquanto que o ZT 16 apresentou o pico de expressão de *per1b*. As diferenças nesses pontos em relação aos respectivos controles foram detectadas estatisticamente (Figura 9 B).

Figura 9. Expressão temporal de *per1b* em EE com trocas de meio e em EE com pulsos diários de dexametasona (DEXA 10^{-7} M). Os dados são a média ($n = 4 - 6$ frascos) $\pm$ EPM do transcrito de *per1b* normalizado pelo transcrito do RNA 18S e expressos relativos ao menor valor do grupo em EE sem trocas de meio. **(A)** Células foram mantidas em EE por 6 dias e submetidas diariamente a 2 trocas de meio sem DEXA como controle do grupo de células que sofreu tratamento hormonal. No 7º dia, completadas as 24 h após a última troca de meio, o RNA total foi extraído por 20 horas a cada 4 horas. **(B)** Células foram mantidas em EE por 6 dias e submetidas diariamente a um pulso de 2 h de DEXA 10^{-7} M, ao fim das quais, esse meio de cultura foi substituído por meio livre de DEXA. No 7º dia, completadas as 24 h após o último pulso, o RNA total foi extraído por 20 h a cada 4 h. *One-way* ANOVA seguida pelo teste de Tukey apontou diferenças estatísticas entre os ZTs ($p < 0,05$, *a* é significativamente diferente de *b*, *c* é significativamente diferente de *d*). Asteriscos indicam diferença

estatística do grupo tratado em relação ao seu controle em EE com trocas de meio em um mesmo ZT (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, *Two-way ANOVA* seguida por pós-teste de Bonferroni).

Para *cry1b*, como mencionado anteriormente (Figuras 8 A e 8 B) as trocas de meio também provocaram alterações em seu perfil de expressão temporal. Contudo, comparando-se ao grupo que sofreu trocas de meio com DEXA, neste, os níveis dos transcritos desse gene apresentaram maiores valores de expressão nos ZTs 8 e 12, enquanto, na ausência do hormônio, os picos ocorreram nos ZTs 4 e 8 (Figura 10 B). Mas vale notar que o perfil oscilatório observado apenas com trocas de meio não foi alterado com a adição de DEXA (Figuras 10 A e 10 B).

Figura 10. Expressão temporal de *cry1b* em EE com trocas de meio e em EE com pulsos diários de dexametasona (DEXA 10^{-7} M). Os dados são a média ($n = 4 - 6$ frascos) $\pm$ EPM do transcrito de *cry1b* normalizado pelo transcrito do RNA 18S e expressos relativos ao menor valor do grupo em EE sem trocas de meio. **(A)** Células foram mantidas em EE por 6 dias e submetidas diariamente a 2 trocas de meio sem DEXA como controle do grupo de células que sofreu tratamento hormonal. No 7º dia, completadas as 24 h após a última troca de meio, o RNA total foi extraído por 20 h a cada 4 h. **(B)** Células foram mantidas em EE por 6 dias e submetidas diariamente a um pulso de 2 h de DEXA 10^{-7} M, ao fim das quais, esse meio de cultura foi substituído por meio livre de DEXA. No 7º dia, completadas as 24 h após o último pulso, o RNA total foi extraído por 20 h a cada 4 h. *One-way ANOVA* seguida pelo teste de Tukey apontou diferenças estatísticas entre os ZTs ($p < 0,05$, *a* é significativamente diferente de *b*).

Em suma, os pulsos de DEXA foram capazes de modificar significativamente o perfil de expressão apenas de *per1b* quando comparado ao grupo controle, diminuindo ou aumentando os níveis de RNAm entre os diferentes tempos. Para *cry1b*, o tratamento hormonal manteve o perfil oscilatório observado no grupo controle com trocas de meio, apenas deslocando o pico de expressão, antes visto entre os ZTs 4 e 8, para os ZTs 8 e 12.

Embora o papel modulador do hormônio tenha sido evidenciado para um dos genes analisados, sua ação como agente sincronizador não se evidencia claramente como para o ciclo claro/escuro, não confirmando, portanto, a hipótese inicial de que pulsos de glicocorticoide seriam capazes de mimetiza-lo enquanto pista ambiental para células ZEM-2S.

4.4. Ensaio com antagonista mifepristone (RU 486 10^{-5} M e RU 486 10^{-6} M)

Como último passo do trabalho, que visou determinar a via pela qual os glicocorticoides modulariam a expressão dos genes de relógio, empregou-se o uso do antagonista mifepristone, também designado como RU 38486 ou RU 486.

Como observado, não foram detectadas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratado com DEXA na análise de expressão do gene *cry1b* (Figuras 10 A e 10 B). Dessa forma, os dados sobre a avaliação dos efeitos de RU 486 apresentados a seguir referem-se apenas ao gene *per1b*, o qual teve sua expressão temporal modulada por DEXA (Figuras 9 A e 9 B). Vale lembrar também que os ensaios com este antagonista foram realizados somente no ZT de maior expressão de *per1b*, ZT16.

Nossos resultados demonstraram que o antagonista, na concentração de 10^{-5} M, foi capaz de inibir o aumento da expressão de *per1b* provocado por DEXA, retornando os níveis de expressão desse gene próximos aos valores do controle (Figura 11 A).

Entretanto, de modo controverso, na concentração de 10^{-6} M, ao invés de suprimir a resposta ao agonista DEXA, RU 486 aumentou a expressão de *per1b* em cerca de 3 vezes quando comparado ao valor do grupo tratado com DEXA (Figura 11 B).

Figura 11. Efeito de RU 486 10^{-5} M e 10^{-6} M sobre a expressão de *per1b* induzida por DEXA 10^{-7} M. Os dados são a média ($n = 3 - 5$ frascos) $\pm$ EPM do transcrito de *per1b* normalizado pelo transcrito do RNA 18S e expressos relativos ao menor valor do grupo em EE sem trocas de meio. **(A)** Células foram mantidas em EE por 6 dias e divididas em grupos que foram submetidos a: (1) trocas de meio diárias; (2) trocas de meio com antagonista de DEXA, RU 486, na concentração de 10^{-5} M; (3) pulsos diários de DEXA 10^{-7} M e (4) pulsos diários de DEXA 10^{-7} M + RU 486 10^{-5} M. **(B)** Células foram submetidas às mesmas condições de **(A)**, porém com RU 486 na concentração de 10^{-6} M. No 7º dia, completadas as 24 h após o último pulso, o RNA total foi extraído no ZT 16. Letras indicam valores com diferenças significativas (a diferente de b , $p < 0,01$; c diferente de d , $p < 0,001$, *One-way* ANOVA seguida por pós-teste de Tukey).

5. DISCUSSÃO

5.1. O ciclo claro/escuro e o modelo de relógio periférico das células ZEM-2S

A temporalidade como característica intrínseca à vida constituiu-se por mecanismos internos que conferiram aos organismos a capacidade de produzir e manter a ritmicidade independentemente das oscilações temporais externas (Marques *et al.*, 2003; Peirson *et al.*, 2009).

O estabelecimento da endogenicidade como propriedade dos ritmos biológicos, todavia, foi certamente uma das questões mais amplamente debatidas durante a consolidação dos conhecimentos cronobiológicos (Marques *et al.*, 2003) e, somente passando das análises comportamentais aos estudos moleculares dos ritmos, sobretudo com a descoberta de osciladores periféricos e a facilidade de isolamento destes em condições constantes, a compreensão dessa característica tornou-se mais sólida.

Atrelada diretamente ao caráter endógeno está a persistência dos ritmos em livre-curso, que consiste na manutenção autossustentada da ritmicidade independentemente da presença de fatores temporizadores exógenos. No entanto, o que se observa é que o período exibido pelo oscilador em livre-curso é sensivelmente desviado do valor preciso do ciclo ambiental ao qual está subordinado (Marques *et al.*, 2003).

Neste trabalho, com a adoção das células ZEM-2S como modelo de relógio periférico, demonstramos a presença de tais propriedades dos ritmos biológicos a partir dos resultados de expressão gênica, sobretudo, do gene de relógio *per1b* em escuro constante (EE). Sua expressão rítmica mesmo na ausência de pistas temporais já havia sido demonstrada no trabalho de Farhat e colegas (2009), assim como também a oscilação no perfil de expressão do gene *cry1b*. Entretanto, aqui, o emprego de outro tipo de tratamento estatístico não revelou um padrão rítmico para este último, embora os valores dos níveis de expressão tenham se assemelhado ao longo das 24 h àqueles observados por Farhat e colaboradores (2009).

Esses dados concordam com os obtidos em células Z3, uma linhagem embrionária estabelecida por Pando e colegas (2001), em que se observou a manutenção de um padrão rítmico de expressão para *per1* e *per3*, enquanto *per2* não oscilou em condições constantes. Posteriormente, Wang (2008), em estudos filogenéticos, distinguiu dois homólogos para *per1* em *Danio rerio*, *per1a* e *per1b*, e verificou que estes apresentavam diferenças temporais e espaciais de expressão em embriões examinados até 96 horas pós-fertilização. Tais resultados

reforçaram a ideia já levantada por Pando e colaboradores (2001) de que as diferentes dinâmicas de expressão dos genes *per* se deviam a mecanismos de regulação distintos que os regiam e estes, por sua vez, teriam se estabelecido ao longo da trajetória evolutiva dessa família gênica.

Essa variedade de genes *per* em *D. rerio*, bem como dos outros membros constituintes do repertório gênico da maquinaria molecular do relógio desse teleósteo, por sua vez, favoreceu a hipótese de que, ao invés de redundância, essa multiplicidade significasse especializações nas funções desempenhadas por cada gene (Vatine *et al.*, 2011). Consistente com isso, a observação de oscilações na expressão temporal em EE para *per1b* demonstra que este gene é regulado pelo relógio circadiano, denominação essa cunhada que se opõe aos genes que são induzíveis por luz, como *per2*, o qual responde com aumentos significativos a pulsos de luz (Ramos *et al.*, 2014), mas não oscila em condições constantes (Cahill, 2002; Delaunay *et al.* 2003; Vatine *et al.*, 2011).

A distinção entre genes regulados pelo relógio ou induzidos pela luz é igualmente aplicada à família dos genes *cry*, em que apenas *cry1a* é diretamente responsivo à luz (Kobayashi *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2014), enquanto todos os outros oscilam temporalmente, cabendo, portanto, *cry1b* nesta classificação.

Cermakian e colegas (2002) observaram padrões de expressão distintos para os seis genes *cry* encontrados na linhagem Z3, os quais também foram posteriormente caracterizados na linhagem ZEM-2S (Martins, 2007). Dentre todos os *cry*, *cry1b*, juntamente com *cry3*, foram eleitos como potenciais moléculas fotossensíveis para regulação do relógio biológico de *D. rerio*, pois eram expressos quando as células eram submetidas a ciclos CE, em EE e em condições naturais. Interessantemente, durante sua identificação em células Z3, mais de uma banda para o gene *cry1b* foi observada, possivelmente sinalizando que sua transcrição gerava diferentes transcritos; este fato poderia justificar o perfil de baixa expressão desse gene em células ZEM-2S mantidas em EE dada a expressão de uma variedade alternativa de isoforma de *cry1b* analisada em nosso modelo.

Entretanto, como referenciado nos capítulos introdutórios, a ritmicidade biológica também se caracteriza pela suscetibilidade ao processo de sincronização, o qual prevê o ajuste ao tempo ambiental do período e das fases expressos pelo relógio biológico. O estabelecimento da vida em meio à alternância entre luminosidade e escuridão naturais impôs-se como uma importante pista temporal para a maioria das espécies, colocando, então, os cronobiologistas os ciclos claro/escuro como principal *zeitgeber* dos ritmos biológicos (Menna-Barreto & Díez-Nogueira, 2012).

De maneira geral, quando relógios periféricos são mantidos em cultura, ou até mesmo, relógios biológicos centrais, se dissociados (Welsh *et al.*, 1995), exibem ritmos individuais, comportando-se cada célula na população como um relógio independente, com período e fases podendo ser distintos entre as células, o que, equivocadamente, pode em uma primeira análise, levar à interpretação de arritmicidade (Carr & Whitmore, 2005). Dessa forma, muito provavelmente, à maneira como ocorre no processo de sincronização, que envolve a ação de um ciclo ambiental sobre um oscilador, arrastando e ajustando-o ao seu período, mecanismos de acoplamento se desenvolvem entre os próprios osciladores, de modo a promover a comunicação entre os mesmos para que seintonizem e expressem um padrão rítmico em comum (Golombek & Aguilar-Roblero, 2003).

Embora os mecanismos biológicos subjacentes ao acoplamento ainda sejam desconhecidos, o bem estabelecido papel do ciclo claro/escuro como principal *zeitgeber* do sistema circadiano para a maioria dos seres vivos estudados se evidencia com os resultados da expressão temporal de *per1b* e *cry1b* em células ZEM-2S expostas a ciclos 12:12 CE.

Como já conhecida a responsividade direta à luz de tecidos periféricos do peixe teleosteo *D. rerio* (Whitmore *et al.*, 2000), a oscilação circadiana de ambos os genes reforça a presença de fotopigmentos circadianos funcionais já em células embrionárias, como na linhagem ZEM-2S estudada neste trabalho, indicando a relevância do ciclo CE desde os estágios iniciais do desenvolvimento bem como a precocidade do estabelecimento do sistema circadiano nesse animal.

Para ambos os genes, demonstrou-se que esse regime fotoperiódico foi capaz de imprimir uma evidente oscilação temporal que, para *per1b*, já havia sido verificada em EE, mas que em CE mostrou-se muito mais robusta, com amplitude e distinção entre as fases muito pronunciadas. Pando e colegas (2001) observaram que o gene *per1* apresentava seu pico de expressão em ZT0, que corresponde ao horário em que a luz acende, da mesma forma como observamos para *per1b*, enquanto *per2* apresentou níveis máximos de expressão mais tardiamente, no ZT 3, e *per3*, entre os ZTs 3 e 6.

O gene *cry1b*, por sua vez, o qual não havia demonstrado oscilação em EE, apresentou um perfil rítmico de expressão, nitidamente influenciado pelo ciclo CE. A partir disso, demonstra-se claramente que as células ZEM-2S são, de fato diretamente fotossensíveis e que o ciclo claro/escuro sincronizou essa população de células.

O arrastamento e o mascaramento, mecanismos pelos quais se dá a sincronização, podem ser desencadeados por uma mesma pista ambiental e se distinguem por

desencadearem, ou não, o ajuste do oscilador endógeno, respectivamente (Mrosovsky, 1999; Marques *et al.*, 2003).

Embora essa classificação permita diferenciar mais cuidadosamente a ação dos fatores ambientais, o próprio histórico de aceitação do mascaramento como um fenômeno importante e integrante do sistema circadiano dificultou e negligenciou por muito tempo a sua discriminação nos resultados de experimentos cronobiológicos (Marques & Waterhouse, 1994). Assumidamente, a abordagem molecular de nossos protocolos limita a obtenção de amostras em intervalos curtos por vários ciclos de 24 h consecutivos e, assim, não nos permitiu a distinção da ação como agente arrastador ou mascarador dos ciclos 12:12 CE sobre as células ZEM-2S. Talvez, o desenho experimental que favorecesse essa análise seria a exposição das células ao ciclo CE por alguns dias, seguida de transferência das mesmas para condições constantes. Se o ritmo deixasse de ser observado imediatamente no primeiro dia, logo após a transição do CE para EE, se confirmaria que o ciclo 12:12 CE mascarou, mas não arrastou o ritmo de expressão gênica.

Todavia, os dados apresentados, indubitavelmente, reafirmam a sensibilidade fótica desse modelo. Trabalhos vêm demonstrando a natureza dessa fotossensibilidade de *D. rerio*, Whitmore *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2011) a qual tem sido atribuída à existência de um grupo de opsinas não-visuais, as melanopsinas (Farhat *et al.*, 2009; Cavallari *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2014).

Recentemente, a descoberta da expressão de cinco genes codificadores para melanopsinas (*Opn4m-1*, *Opn4m-2*, *Opn4m-3*, *Opn4x-1*, *Opn4x-2*) na retina de *D. rerio* (Davies *et al.*, 2011) suscitou a busca pela determinação de qual ou quais delas seriam funcionais. Em células ZEM-2S, apenas as *Opn4m-1* e *Opn4m-2* são, aparentemente, significativamente expressas e Ramos e colegas (2014) detectaram que a proteína OPN4m-1 se encontrava concentrada na membrana citoplasmática, enquanto OPN4m-2, numa região mais próxima ao núcleo da célula, o que leva a crer que OPN4m-1 seja o fotopigmento funcional para a transdução do sinal à maquinaria molecular do relógio de *D. rerio*.

A confirmação da fotossensibilidade periférica de *D. rerio* abre espaço para o questionamento sobre a existência de um oscilador central, tal qual bem definido em mamíferos, uma vez que a percepção do ciclo claro/escuro não é restrita e, dessa forma, o sinal temporal não necessitaria ser transmitido dos centros superiores para a periferia. Apesar disso, alguns estudos apontaram a glândula pineal deste animal como potencial órgão integrador do sistema circadiano (Ziv & Gothilf, 2006) e, atualmente, Moore e Whitmore (2014) demonstraram que múltiplas regiões cerebrais contêm osciladores endógenos

diretamente responsivos à luz e apresentam uma relevante expressão de genes de relógio semelhante à observada no NSQ.

Em peixes, têm se evidenciado a plasticidade dos ritmos biológicos, documentada a partir da observação de diferentes padrões temporais na expressão de comportamentos de atividade e de hábitos em um mesmo indivíduo e/ou entre indivíduos da mesma espécie (Carvalho, 2006; Nomura, 2008). Portanto, em uma perspectiva mais abrangente, nossos resultados, somados ao corpo de conhecimento atual, ressaltam a diversidade estrutural e funcional do sistema circadiano, que tem sido compreendido como sistema multioscilar, provavelmente organizado hierarquicamente ao longo da linhagem dos vertebrados, que conta com temporizadores biológicos dispersos pelo corpo, suscetíveis e regulados por diferentes pistas ambientais para promover a adaptação dos organismos ao ambiente cíclico em que se encontram.

5.2. As trocas de meio como potenciais *zeitgebers* para culturas celulares

As primeiras evidências de que a manipulação de animais em experimentos cronobiológicos dentro de intervalos regulares poderia sincronizá-los foram demonstradas nos trabalhos de Nicholas Mrosovsky (1989; 1999), que observou que muitas manifestações de rotina em animais de laboratório, tal como mudança de gaiola, introdução de nova roda de atividade, manipulação dos animais para a administração de drogas ou placebos, agiam como pulsos de sincronização sobre o sistema circadiano de *hamsters* em livre-curso, observando-se neles deslocamentos significativos de fase do ritmo quando submetidos a condições de claro ou escuro constantes (Marques *et al.*, 2003).

Em 1998, Balsalobre e colegas verificaram que altas concentrações de soro administradas sobre cultura de fibroblastos e de células da linhagem H35 de hepatoma de rato induziam a transcrição de genes de relógio e genes controlados pelo relógio e, em fibroblastos, também imprimiam aos genes um perfil oscilatório circadiano de expressão. Posteriormente, Yamazaki e colaboradores (2000) observaram que a atenuação dos ritmos de osciladores periféricos em cultura era revertida após a troca de meio. Essa restauração do ritmo foi pensada estar atrelada a três fatores: à remoção de substâncias tóxicas do meio; à substituição dos componentes essenciais exauridos, e/ou, ao choque físico-químico (alteração da temperatura ou pH, por exemplo) ou mecânico propriamente dito decorrente da troca de meio.

A partir dessas evidências, somadas à necessidade de tomar um grupo experimental com trocas de meio livre de hormônio como controle ao grupo tratado, avaliamos o efeito das trocas de meio sobre a expressão de *per1b* e *cry1b*.

Para ambos os genes, a remoção e a substituição diárias do meio de cultura dentro de um intervalo de 2 h promoveu uma oscilação temporal em seus perfis de expressão. Embora em condições constantes os níveis dos transcritos de *per1b* tenham apresentado oscilação circadiana, as trocas de meio em EE aumentaram sensivelmente a amplitude desse ritmo e provocaram uma inversão de fase, trazendo os pontos de maior expressão do gene para as primeiras horas do ciclo e, os menores, para a segunda metade do dia. Para *cry1b*, as trocas de meio impuseram um ritmo em EE que não havia sido observado na ausência de manipulações, demonstrando que podem, especialmente para este gene, se constituir em agente sincronizador de sua expressão.

Estes resultados corroboram o que se têm proposto acerca das manipulações, tanto em experimentos *in vivo* como *in vitro*, na promoção da sincronização dos organismos, reafirmando a ideia de que elas sinalizam tempo se conduzidas periodicamente. Entretanto, nossos dados, assim como os obtidos no trabalho de Yamazaki e colegas (2000), não nos possibilitam distinguir o que exatamente nas trocas de meio as tornam pistas temporais. Claramente em relação à porcentagem de soro, a qual é reduzida para 2% em todos os experimentos, podemos excluí-la como responsável por promover um perfil temporal oscilatório, situação esta diametralmente oposta às investigações de Balsalobre e colaboradores (1998), em que o soro encontrava-se em uma concentração de 50%.

De qualquer forma, essas observações das ações das trocas de meio nos ajudam potencialmente a inferir sobre uma situação em que se analisassem os ritmos de relógios periféricos em um organismo íntegro, sobre os quais fatores circulantes endógenos atuariam carregando, sobretudo, informações temporais, conectando osciladores centrais aos periféricos, e estes entre si, e mantendo a relação de fase entre os ritmos biológicos presentes nos diferentes órgãos e tecidos. Especialmente para *D. rerio*, assumindo a aparente descentralização de seu sistema circadiano, a circulação circadiana desses fatores poderia contribuir para essa manutenção dos ritmos do organismo como um todo, uma vez que seria um sinal homogeneamente distribuído.

A sugestão do papel desses fatores como agentes sincronizadores internos, no entanto, já se evidencia, por exemplo, quando da averiguação da alimentação como potencial *zeitgeber* para os relógios periféricos (Damiola *et al.*, 2000; Le Minh *et al.*, 2001; So *et al.*, 2009) e da sincronização circadiana no sistema vascular operada por fatores como esteroides e vitaminas

(McNamara *et al.*, 2001), o que poderia apontar que, para células em cultura, essa equivalência se daria pela função nutritiva do meio.

5.3. Efeitos de glicocorticoide sobre a maquinaria molecular do relógio das células ZEM-2S

A expansão do conhecimento acerca do sistema circadiano de vertebrados desde a descoberta de osciladores periféricos reconfigurou o pensamento que se tinha sobre sua organização e lhe atribuiu maior complexidade em termos de regulação. Dentre as questões levantadas, uma delas se fundamentou na caracterização das vias de comunicação entre relógios centrais e periféricos e, dessa forma, propôs-se que sinais humorais, como melatonina e glicocorticoides, ou vias neuronais seriam responsáveis por essa mediação (Buijs & Kalsbeek, 2001; Buijs *et al.*, 2003; Tamai *et al.*, 2005).

Corroborando essa ideia, a modulação por neurotransmissores, como glutamato (Lima *et al.*, 2011), ou por diferentes hormônios, como melatonina (Martins, 2007; Moraes *et al.*, 2014a), endotelina (Farhat *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2014b) e α -MSH (Moraes *et al.*, 2014a), exercida sobre a expressão de genes de relógio em diferentes linhagens de vertebrados não-mamíferos tem sido demonstrada pelo nosso laboratório.

Aqui, voltamos-nos pela primeira vez para o estudo dos GCs como reguladores de relógios periféricos. Sob essa perspectiva, como já relatado, esses hormônios passaram a ser investigados com o trabalho de Balsalobre e colegas (2000), que os apostaram como potenciais reguladores dos relógios periféricos, tendo-se em vista o saber vasto e bem consolidado de suas dinâmicas de produção e liberação no organismo, as quais estão intrinsecamente associadas a um controle circadiano, este que, por sua vez, também seria influenciado pelos próprios GCs (Dickmeis *et al.*, 2013).

O segundo aspecto para colocá-los como candidatos à regulação da maquinaria molecular dos ritmos biológicos são os mecanismos de ação, dentre os quais, o mais bem conhecido envolve a ligação desses esteroides a receptores pertencentes a uma superfamília de proteínas que atuam como fatores de transcrição. Tal função é decorrente da existência de um domínio de ligação ao DNA, o qual possui alta afinidade e especificidade a sequências específicas do DNA denominadas elementos responsivos ao GR (GRE), hexâmeros palindrômicos encontrados nos promotores dos genes-alvo dos GCs (Mommensen *et al.*, 1999).

Interessantemente, em 2005, Yamamoto e colaboradores descreveram a presença de GRE na região promotora de *Per1* de mamíferos, que justificaria a observação da indução da

expressão desse gene após 1 h de tratamento. Essa resposta relacionada à atividade transcricional, por sua vez, se dá pela sinalização desencadeada pela ligação do hormônio ao GR, que promove alteração conformacional do receptor. Há a formação de um homodímero com outro complexo GR-GC, o qual se transloca ao núcleo da célula, ligando-se aos GREs. A interação de GR com este elemento é responsável pela indução ou supressão da transcrição gênica, dependendo da natureza do GRE no promotor do gene-alvo que, no caso de *Per1*, portanto, se constituiria em elemento transativador para esse gene.

Entretanto, além desta via, sabe-se que os papéis fisiológicos desempenhados pelos GCs podem envolver rotas intracelulares alternativas à ligação de GR-GC ao GRE, como interações epigenéticas (ligação à cromatina), mobilização de outros fatores de transcrição, ou então, ativação de receptores de membrana. Essa variedade nas possibilidades de atuação levou à discriminação de vias de ação denominadas genômicas diretas e indiretas e não-genômicas, as quais poderiam ser simultaneamente ativadas (Rhen & Cidlowski, 2005).

Dessa forma, a precisão sobre quais os mecanismos de regulação exercidos pelos GCs, se diretos ou secundários, e a contribuição desses para o complexo funcionamento das alças das quais os genes de relógio fazem parte se somam ao campo das indagações a serem respondidas.

Até o momento, estudos demonstraram esses hormônios como indutores da expressão gênica, adotando um protocolo experimental que previa um choque único hormonal, seguido de uma análise do perfil de expressão do gene de relógio a partir de 1 h após o pulso (Balsalobre *et al.*, 2000), ou a administração de injeção periférica de corticosterona em intervalos de 1 h em 1 h (Conway-Campbell *et al.*, 2010). Entretanto, aqui, nos propusemos a investigar a dexametasona, glicocorticoide sintético, como agente modulador da expressão dos genes *per1b* e *cry1b* e como agente sincronizador, impondo sua presença às células ZEM-2S diariamente pelo tempo de 2 h.

Em *per1b*, os pulsos diários de DEXA modularam os níveis dos transcritos desse gene em, praticamente, todos os pontos temporais e impuseram um novo perfil oscilatório ao longo das 24 h quando comparado ao grupo que sofreu trocas de meio livre de hormônio, evidenciando, assim, que a expressão desse gene foi modulada tanto em sua amplitude quanto temporalmente pelo glicocorticoide.

Como supracitado, Yamamoto e colegas (2005) desvendaram a existência de GRE em *Per1* de mamíferos, o qual ainda não se sabe se é conservado filogeneticamente nos genes *per1* dentro da linhagem dos vertebrados. Todavia, nossos dados indicam que, possivelmente,

esse elemento possa já estar presente em peixes. Dessa forma, poderíamos propor que, *a priori*, a modulação de *per1b* foi desencadeada pela ativação da via clássica de ação dos GCs.

Há de se ressaltar, todavia, que, frente ao conhecimento da existência de múltiplas vias de ação dos GCs, as quais são descritas nas diferentes classes de vertebrados, fortalecendo a hipótese do estabelecimento das variadas formas de atividade dos GRs (Tasker *et al.*, 2006), a expressão de *per1b* poderia também ser regulada indiretamente ou por vias não-genômicas. Entretanto, a descoberta de receptores de membrana para esteroides, especialmente, para os GCs, reúne consigo muitas controvérsias sobre a origem, natureza química, as vias de sinalização evocadas por esses receptores e a sensibilidade a bloqueadores e/ou inibidores (Losel *et al.*, 2003).

Trabalhos que vêm evidenciando a atuação dos GCs por vias não-genômicas investigam, sobretudo, seus efeitos sobre inflamação (Rhen & Cidlowski, 2005). Roy e Rai (2009) apontam que a inibição exercida pelo cortisol dentro de 15 min sobre a atividade fagocítica de macrófagos do teleósteo *Channa punctatus* sugere o envolvimento de vias não-genômicas, em vista do tempo em que se observa a resposta. Pelo fato de estimular aumento de AMPc, consideram que este receptor de membrana seja acoplado à proteína G. Além disso, com o bloqueio da rápida resposta frente ao emprego do antagonista RU 486, especulam que esse receptor seja similar ao GRc.

Em contrapartida, no trabalho de Conway-Campbell e colegas (2010), houve detecção da rápida indução da ativação de GR após 10 min do primeiro pulso de corticosterona, a qual foi mensurada pela habilidade de ligação a GRE, o que, como concordam Losel e colaboradores (2003), vai em direção à ideia de que não necessariamente respostas de curto e longo prazo sejam um critério preciso para distinção das vias de sinalização dos GCs.

Além do mais, Venero e Borrell (1999) observaram o aumento transiente dos níveis de aspartato e de glutamato extracelulares na área CA1 do hipocampo em 15 min após a administração de corticosterona. Neste caso, o uso de antagonistas clássicos de GR não foi capaz de impedir tal aumento, contrariando a possibilidade de que receptores citosólicos e de membrana sejam semelhantes, como indicam Evans e colegas (2000), que classificaram diferencialmente os receptores pela estrutura bioquímica apresentada por GRm em células neuronais da rã *Taricha granulosa*.

Embora, coletivamente, esses resultados sejam aparentemente divergentes, o que se sabe ao certo é que RU 486 atua como antagonista da via clássica. E, desconhecendo-se até o momento a presença de GRm em *zebrafish*, no qual se tem descrito a existência de apenas um gene para o receptor, empregamos RU 486 no ponto de maior expressão de *per1b*, o qual se

deu no ZT 16. Na concentração de 10^{-5} M do antagonista, observamos a inibição do pico promovido por DEXA. Esse dado é consistente com o que se conhece a respeito da ação desse antagonista e contribui para que se acredite na presença de GRE na região promotora de *per1b*, sugerindo fortemente a regulação da expressão desse gene pela via genômica clássica.

Apesar disso, em contrapartida, RU 486 na concentração de 10^{-6} M, promoveu um aparente sinergismo ao ser administrado com DEXA, aumentando a expressão de *per1b* em cerca de 3 vezes em relação ao grupo tratado apenas com o glicocorticoide. Este resultado nos leva a hipotetizar que RU 486 possa exercer um papel como agonista parcial, ou que, sendo esse antagonista repressor apenas de GR α , possíveis GRs de membrana existentes nas células ZEM-2S poderiam estar sendo ativados, desencadeando a resposta de aumento que observamos inicialmente, induzida por DEXA.

Em relação à primeira hipótese, embora se ateste em alguns trabalhos que RU 486, em altas concentrações, possa apresentar efeito repressivo se administrado sozinho, atribuindo-lhe uma ação como agonista parcial sobrejacente à sua função como antagonista (Schulz *et al.*, 2002; Wardell *et al.*, 2010), considera-se ainda que tal efeito observado em alguns sistemas *in vivo* e *in vitro* permaneça como uma exceção (Bamberger & Chrousos, 1995). Aqui, a similaridade apresentada entre os valores dos grupos controles sem e com antagonista enfraquecem a possibilidade da ação como agonista parcial de RU 486, já que seria esperado um aumento da expressão de *per1b* na presença do antagonista apenas.

Por outro lado, Morrison (2013) observou que apenas em concentrações mais baixas, como 10^{-10} M, RU 486 foi capaz de agir como agonista e associou ao fato de o antagonista apresentar maior afinidade por GR em cerca de 3-4 vezes em relação à dexametasona (Conway-Campbell *et al.*, 2010). Além disso, considerando a existência de duas isoformas de GR, GR α e GR β , em que a primeira apresenta atividade transcricional e a segunda, apenas regula negativamente a atividade da primeira, não se ligando à molécula do glicocorticoide (Faria & Longui, 2006), a atividade agonística seria dada pela formação do complexo RU 486-GR β , o qual já se verificou atuar como indutor da transcrição de genes-alvo (Lewis-Tuffin *et al.*, 2007).

O modelo de *zebrafish* tem sido empregado como alternativa em estudos sobre resistência aos glicocorticoides pelo fato de apresentar apenas um gene codificador para GR e produzir as isoformas GR α e GR β , tal qual em humanos (Schaaf *et al.*, 2009; Schoonheim *et al.*, 2010). Dessa maneira, nas duas espécies, a dupla ação de RU 486 poderia ser explicada pela sua atividade como antagonista de GR α e como agonista parcial pela associação à GR β (Morrison, 2013).

Excluindo a hipótese sobre a atividade agonística de RU 486, nossa segunda alternativa aponta para a regulação da expressão gênica de *per1b* mediada por GCs através de receptores de membrana (GRm). Para que pudéssemos considerar mais firmemente essa alternativa, deveríamos ter investigado a presença de GRm na linhagem ZEM-2S, na qual, o GRc já havia sido previamente identificado, e dar prosseguimento à caracterização da via de sinalização por segundos mensageiros evocada por esse possível GRm existente.

Passando da análise do gene *per1b*, cuja expressão mostrou-se responsiva ao tratamento hormonal e nos permitiu diferentes perspectivas de análises, o gene *cry1b*, embora tenha apresentado um perfil oscilatório na presença de DEXA, tal oscilação temporal já havia sido atestada apenas com trocas de meio sem hormônio. Observamos que DEXA, no entanto, provocou uma variação na amplitude do ritmo e modulou positiva e negativamente os níveis dos transcritos desse gene em alguns pontos. Porém, quando comparado ao grupo controle, a avaliação estatística não indicou diferenças significativas.

Interpretamos, dessa maneira, que *cry1b*, diferentemente de *per1b*, não é suscetível ao glicocorticoide, uma vez que as trocas de meio com e sem hormônio imprimiram um perfil de expressão muito semelhante em ambas condições. Portanto, neste trabalho, descartou-se investigar os efeitos de RU 486 sobre a expressão de *cry1b*.

De fato, pela primeira vez foi realizado um estudo sobre os efeitos de glicocorticoide sobre a expressão de um gene da família dos criptocromos. Quando da descoberta de GRE em *Per1*, cogitou-se que este elemento pudesse existir no promotor de outros de relógio de mamíferos, dentre eles, os genes *Cry1* e *Cry2*, hipótese essa descartada pelos resultados negativos (Yamamoto *et al.*, 2005).

Como apresentado inicialmente, esse grupo foi originalmente descrito como uma família de receptores de luz azul em plantas (Cashmore *et al.*, 1999) e, posteriormente, descobriu-se que seus membros eram constituintes da maquinaria molecular do relógio biológico de invertebrados e vertebrados (Kobayashi *et al.*, 2000). Dessa maneira, muito provavelmente, a sensibilidade de *cry1b* se restrinja ao ciclo CE e a modulação hormonal seja menos expressiva. Esta ideia aparentemente concorda com o trabalho de Farhat e colaboradores (2009), em que, com emprego de endotelina-1, demonstrou-se que os efeitos desse hormônio sobre a expressão de *cry1b* apresentaram-se pouco evidentes.

Todavia, a discussão sobre os possíveis fatores capazes de alterar a expressão dos genes *cry* não se esgota, pois os estudos têm afirmado cada vez mais a complexidade do funcionamento das alças de retroalimentação compostas pelos genes de relógio (Pereira *et al.*, 2009). Além do mais, particularmente para *zebrafish*, conhece-se a pluralidade de genes *cry*,

confirmada inclusive na linhagem ZEM-2S (Martins, 2007), o que tem levado a crer na especialização de funções entre eles, o que, por sua vez, fundamentaria a ideia de que diferentes agentes poderiam modulá-los diferencialmente.

A visão de que a regulação hormonal seria a chave para a associação entre o relógio central e os relógios periféricos construiu-se com base em estudos realizados em mamíferos, cuja organização do sistema circadiano é centralizado e hierarquizado, com restrição da entrada da informação fótica à retina. Em contrapartida, a exploração de modelos de não-vertebrados destitui, em parte, a lógica dessa organização através da descoberta de osciladores periféricos fotossensíveis. Com isso, temos levantado que para organismos em que a fotossensibilidade seja dispersa, a relevância da regulação hormonal seja atenuada em detrimento da resposta direta ao ciclo CE dada a presença de fotopigmentos circadianos *in loco*.

Dessa forma, em um primeiro momento havíamos hipotetizado que o glicocorticoide seria capaz de mimetizar a ação do ciclo CE, sincronizando a expressão de *per1b* e *cry1b*. Embora tenhamos demonstrado que *per1b* é afetado pelo tratamento com glicocorticoide, os perfis de expressão em CE e com tratamento hormonal distinguiram-se sensivelmente. Acreditamos que estudos posteriores e uma reavaliação dessa perspectiva sejam necessários para que entendamos mais precisamente a função hormonal na regulação dos genes de relógio em modelos de não-mamíferos, com desenhos experimentais que nos permitam clarificar quando se trata de uma modulação mais pontual da expressão gênica ou quando a ação do hormônio está atrelada à função como agente sincronizador.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho permitem a elaboração de algumas considerações finais, como:

- Reafirmam as células ZEM-2S como bom modelo de estudo de relógios periféricos de vertebrados, visto que, além de apresentarem a expressão robusta de todos os componentes essenciais da maquinaria molecular dos relógios biológicos, são diretamente fotossensíveis, característica mais uma vez comprovada pela expressão dos genes *per1b* e *cry1b*, a qual foi sincronizada pela imposição de ciclos 12:12 CE;
- As trocas de meio podem ser consideradas pistas temporais importantes para células em cultura, uma vez que foram atestadas oscilações temporais nos perfis de expressão de ambos os genes em condições de escuro constante;
- Pulsos diários de glicocorticoide, na concentração de 10^{-7} M, foram capazes de modular os níveis dos transcritos de *per1b* ao longo das 24 h, imprimindo um padrão oscilatório diferente do observado em condições de ciclo CE, EE e EE com trocas de meio. Tal resultado indica a provável presença de um elemento responsivo ao glicocorticoide (GRE) no promotor deste gene;
- A possibilidade de que GCs atuem sobre *per1b* através de receptores de membrana indica a necessidade de que estudos posteriores busquem compreender por quais vias se dá essa regulação e qual a relevância desta para o funcionamento molecular do relógio biológico;
- A aparente ausência de suscetibilidade de *cry1b* questiona a importância da regulação hormonal para organismos cujo sistema circadiano seja composto de osciladores que apresentam independência nos mecanismos de recepção da informação luminosa e indica que a pluralidade dos genes *cry* no genoma de *zebrafish* possa refletir aspectos de uma especialização de funções associada à regulação diferencial de cada um deles.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aerts JL, Gonzales MI, Topalian SL. (2004) Selection of appropriate control genes to assess expression of tumor antigens using real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 36: 84-86, 88, 90-91.
- Albrecht U, Eichele G. (2003) The mammalian circadian clock. *Cur Opin Gen Dev*, 13: 271-277.
- Alsop D, Vijayan MM. (2009) Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294: 711-719.
- Aluru N, Vijayan MM. (2009) Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. *Gen Comp Endocrinol*, 164: 142-150.
- Araújo JF, Marques M. (2003) Intermodulação de frequências dos ritmos biológicos. In: Marques N, Menna-Barreto L (orgs) *Cronobiologia: princípios e aplicações*, 3a. ed, São Paulo: Edusp, p. 99-117.
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schütz G, Schibler U. (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289: 2344-2347.
- Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93: 929-937.
- Bamberger CM, Chrousos GP. (1995) The glucocorticoid receptor and RU 486 in man. *Ann N Y Acad Sci*, 761: 296-310.
- Bartell PA, Miranda-Anaya M, Menaker M. (2004) Period and phase control in a multioscillatory circadian system (*Iguana iguana*). *J Biol Rhythms*, 19: 47-57.
- Bellingham J, Chaurasia SS, Melyan Z, Liu C, Cameron MA, Tarttelin EE, Iuvone PM, Hankins MW, Tosini G, Lucas RJ. (2006) Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *PLoS Biol*, 4(8): 1334-1343.
- Bellingham J, Whitmore D, Philp AR, Wells DJ, Foster RG. (2002) Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localisation and phylogenetic position. *Brain Res Mol Brain Res*, 107: 128-136.
- Benedito-Silva AM. (2003) Aspectos metodológicos da cronobiologia. In: Marques N, Menna-Barreto L (orgs) *Cronobiologia: princípios e aplicações*, 3a. ed, São Paulo: Edusp, p. 220-224.

- Bentley PJ. (1998) *Comparative Vertebrate Endocrinology*, 3a. ed, Cambridge: University Press, 526 pp.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295:1070-1073.
- Blum ID, Lamont EW, Abizaid A. (2012) Competing clocks: metabolic status moderates signals from the master circadian pacemaker. *Neurosci Biobehav Rev*, 36: 254-270.
- Branstaetter R. (2004) Circadian lessons from peripheral clocks: Is the time of the mammalian pacemaker up? *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(16): 5699-5700.
- Buhr ED, Takahashi JS. (2013) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*, 217: 3-27.
- Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS. (2010) Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330: 379-385.
- Buijs RM, Kalsbeek A. (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Rev Neurosci*, 2: 521-526.
- Buijs RM, Van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A. (2003) The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol*, 177: 17-26.
- Cahill GM. (2002) Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res*, 309: 27-34.
- Carr AJ, Whitmore D. (2005) Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. *Nat Cell Biol*, 7: 319-321.
- Carvalho MR. (2006) Sincronização da atividade locomotora em robalos juvenis (*Centropomus parallelus* e *C. undecimalis*) pelo ciclo claro/escuro e ciclo de disponibilidade alimentar. Tese de doutorado. Instituto Oceanográfico. Universidade de São Paulo. 60 pp.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284: 760-765.
- Cavallari N, Frigato E, Vallone D, Frohlich N, Lopez-Olmeda JF, Foà A, Berti R, Sánchez-Vásquez FJ, Bertolucci C, Foulkes NS. (2011) A blind circadian clock in cavefish reveals that opsins mediate peripheral clock photoreception. *PLoS Biol*, 9(9): 1-13.
- Cermakian N, Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. (2000) Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(8): 4339-4344.
- Cermakian N, Pando MP, Thompson CL, Pinchak AB, Selby CP, Gutierrez L, Wells DE, Cahill GM, Sancar A, Sassone-Corsi P. (2002) Light induction of a vertebrate clock

- gene involves signaling through blue-light receptors and MAP kinases. *Curr Biol*, 12: 844-848.
- Cockrem JF. (2013) Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *Gen Comp Endocrinol*, 181:45-58.
- Conway-Campbell BL, Sarabdjitsingh RA, McKenna MA, Pooley JR, Kershaw YM, Meijer OC, Kloet ER, Lightman SL. (2010) Glucocorticoid ultradian rhythmicity directs cyclical gene pulsing of the clock gene Period 1 in rat hippocampus. *J Neuroendocrinol*, 22: 1093-1100.
- Czeisler CA, Shanahan TL, Klerman EB, Martens H, Brotman DJ, Emens JS, Klein T, Rizzo JF. (1995) Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med*, 332: 6–11.
- Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*, 14(23): 2950-2961.
- Davies WI, Zheng L, Hughes S, Tamai TK, Turton M, Halford S, Foster RG, Whitmore D, Hankins MW. (2011) Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. *Cell Mol Life Sci*, 68(24): 4115-4132.
- Dearworth JR, Selvarajah BP, Kalman RA, Lanzone AJ, Goch AM, Boyd AB, Goldberg LA, Cooper LJ. (2011) A mammalian melanopsin in the retina of a fresh water turtle, the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*). *Vision Res*, 51: 288-295.
- Delaunay F, Thisse C, Marchand O, Laudet V, Thisse B. (2000) An inherited functional circadian clock in zebrafish embryos. *Science*, 289(5477): 297-300.
- Delaunay F, Thisse C, Thisse B, Laudet V. (2003) Differential regulation of *period2* and *period3* expression during development on the zebrafish circadian clock. *Gene Expr Patterns*, (3): 319-324.
- Dias CAGM, Santos BR, Mansur BM, Pinheiro MS, Fecury AA, Sá-Oliveira JC, Matayoshi-Calixto PH, Oliveira E, Gouveia Jr A. (2014) Light/dark preference in *Danio rerio*: effects of light exposure duration and day period. *Biota Amazônia*, 4(3): 106-111.
- Díaz NM, Morera LP, Verra DM, Contin MA, Guido ME. (2014) Early appearance of nonvisual and circadian markers in the developing inner retinal cells of chicken. *Biomed Res Int*, doi: 10.1155/2014/646847.
- Dickmeis T. (2009) Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol*, 200: 3–22.

- Dickmeis T, Lahiri K, Nica G, Vallone D, Santoriello C, Neumann CJ, Hammerschmidt M, Foulkes NS. (2007) Glucocorticoids play a key role in circadian cell cycle rhythms. *Plos Biol*, 5: 854-864.
- Dickmeis T, Weger BD, Weger M. (2013) The circadian clock and glucocorticoids: interactions across many time scales. *Mol Cell Endocrinol*, 380: 2-15.
- Donaldson EM. (1981) The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: Pickering AD. *Stress and Fish*. London: Academic Press Inc. LTD, p. 11-47.
- Dong Y, Aronsson M, Gustafsson JA, Okret S. (1989) The mechanism of cAMP-induced glucocorticoid receptor expression: correlation to cellular glucocorticoid response. *J Biol Chem*, 264(23): 13679-13683.
- Dvornyk V, Vinogradova O, Nevo E. (2003) Origin and evolution of circadian clock genes in prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(5): 2495-2500.
- Evans SJ, Murray TF, Moore FL. (2000) Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *J Steroid Bioc Mol Biol*, 72(5): 209-221.
- Farhat FP, Martins CB, Lima LHRG, Isoldi MC, Castrucci AML. (2009) Melanopsin and clock genes: regulation by light and endothelin in the zebrafish ZEM-2S cell line. *Chronobiol Int*, 26(6): 1090–1119.
- Faria CDC, Longui CA. (2006) Aspectos moleculares da sensibilidade aos glicocorticoides. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 50(6): 983-995.
- Foster RG, Follett BK, Lythgoe JN. (1985) Rhodopsin-like sensitivity of extra-retinal photoreceptors mediating the photoperiodic response in quail. *Nature*, 313: 50-52.
- Foster RG, Provencio I, Hudson D, Fiske S, De Grip W, Menaker M. (1991) Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol A*, 169: 39-50.
- Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, Von Schantz M, Muñoz M, David-Gray Z, Foster RG. (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*, 284: 502-504.
- Frigato E, Vallone D, Bertolucci C, Foulkes NS. (2006) Isolation and characterization of melanopsin and pinopsin expression within photoreceptive sites of reptiles. *Naturwissenschaften*, 93: 379–385.
- Gamble KL, Berry R, Frank SJ, Young ME. (2014) Circadian clock control of endocrine factors. *Nature Rev Endocrinol*, 10(8): 466-75.
- Gaston S, Menaker M. (1968) Pineal function: the biological clock in the sparrow? *Science*, 160(3832): 1125-1127.

- Gavriouchkina D, Fischer S, Ivacevic T, Stolte J, Benes V, Dekens MPS. (2010) Thyrotroph embryonic factor regulates light-induced transcription of repair genes in zebrafish embryonic cells. *Plos One*, 5(9): 1-10.
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 280: 1564-1569.
- Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. (2001) Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem*, 295: 17-21.
- Golombek DA, Aguilar-Roblero R. (2003) Mecanismos de temporização nos vertebrados. In: Marques N, Menna-Barreto L (orgs) *Cronobiologia: princípios e aplicações*, 3a. ed, São Paulo: Edusp, p.163-190.
- Golombek DA, Rosenstein RE. (2010) Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev*, 90: 1063-1102.
- Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. (2005) Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*, 20: 391-403.
- Hamassaki DE, Ventura DF. (2012) Fototransdução e a fisiologia da retina. In: Aires MM (coord) *Fisiologia*, 4a. ed, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 313-319.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. (2002) Melanopsin containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, 295:1065-1070.
- Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. (2003) A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health ad disease. *Nature*, 4: 649-661.
- Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. (2011) Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest*, 121: 2133-2141.
- Kobayashi Y, Ishikawa T, Hirayama J, Daiyasu H, Kanai S, Toh H, Fukuda I, Tsujimura T, Terada N, Kamei Y, Yuba S, Iwai S, Todo T. (2000) Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes to Cells*, 5: 725-738.
- Kondo T, Ishiura M. (1999) The circadian clocks of plants and cyanobacteria. *Trends Plant Sci*, 4(5): 171-176.

- Konopka RJ, Benzer S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68(9): 2112-2116.
- Koyanagi S, Okazawa S, Kuramoto Y, Ushijima K, Shimeno H, Soeda S, Okamura H, Ohdo S. (2006) Chronic treatment with prednisolone represses the circadian oscillation of clock gene expression in mouse peripheral tissues. *Mol Endocrinol*, 20(3): 573-583.
- Lahiri K, Vallone D, Gondi SB, Santoriello C, Dickmeis T, Foulkes NS. (2005) Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock. *Plos Biol*, 3(11): 2005-2016.
- Lamia KA, Storch KF, Weitz CJ. (2008) Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (39): 15172-15177.
- Le Minh N, Damiola F, Tronche F, Schütz G, Schibler U. (2001) Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J*, 24: 7128-7136.
- Leliavsky A, Dumbell R, Ott V, Oster H. (2014) Adrenal clocks and the role of adrenal hormones in the regulation of circadian physiology. *J Biol Rhythms*, 29(6): 1-16.
- Lewis-Tuffin LJ, Jewell CM, Bienstock RJ, Collins JB, Cidlowski JA. (2007) Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. *Mol Cell Biol*, 27(6): 2266-2282.
- Lima LC, Ribeiro LP, Leite RC, Melo DC. (2006) Estresse em peixes. *Rev Bras Reprod Anim*, 30(3/4): 113-117.
- Lima LHRG, Santos KP, Castrucci AM. (2011) Clock genes, melanopsins, melatonin and dopamine and their modulation by light and glutamate in chicken embryonic retinal cells. *Chronobiol Int*, 28(2): 89-100.
- Lima LHRG, Scarparo AC, Isoldi MC, Visconti MA, Castrucci AML. (2006) Melanopsin in chicken melanocytes and retina. *Biol Rhythm Res*, 37: 393-404.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analyses of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402-408.
- Liu AC, Welsh DK, Ko CH, Tran HG, Zhang EE, Priest AA, Buhr ED, Singer O, Meeker K, Verma IM, Doyle III FJ, Takahashi JS, Kay SA. (2007) Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell*, 129(3): 605-616.
- Lopes PF, Marques N, Pinto E, Colepicolo P. (2003) Organização Celular e Molecular dos Ritmos Biológicos. In: Marques N, Menna-Barreto L (orgs) *Cronobiologia: princípios e aplicações*, 3a. ed, São Paulo: Edusp, p. 223-245.

- Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M. (2003) Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev*, 83: 965-1016.
- Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS. (2000) Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation *tau*. *Science*, 288: 483-491.
- Marques MD. (2003) Evolução da ritmicidade biológica. In: Marques N, Menna-Barreto L (orgs) *Cronobiologia: princípios e aplicações*, 3a. ed, São Paulo: Edusp, 2003, p. 269-280.
- Marques MD, Golombek D, Moreno C. (2003) Adaptação temporal. In: Marques N, Menna-Barreto L (orgs) *Cronobiologia: princípios e aplicações*, 3a. ed, São Paulo: Edusp, p. 45-54.
- Marques MD, Waterhouse JM. (1994) Masking and the evolution of circadian rhythmicity. *Chronobiol Int*, 11(3): 146-55.
- Martins CBLB. (2007) Expressão gênica temporal de melanopsina (*Opn4*), *clock*, *cry* e *per* e sua regulação por melatonina em células de *Danio rerio*. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. 59 pp.
- McCurley AT, Callard GV. (2008) Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Mol Biol*, 9: 102-119.
- McNamara P, Seo S, Radu DR, Sehgal A, Chakravarti D, Fitzgerald A. (2001) Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: A humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell*, 105: 877-889.
- Menna-Barreto L. (2003) O tempo na biologia. In: Marques N, Menna-Barreto L (orgs) *Cronobiologia: princípios e aplicações*, 3a. ed, São Paulo: Edusp, p. 25-29.
- Menna-Barreto L. (2005) Relógio biológico – prazo de validade esgotado? *Neurociências*, 2(4): 1-4.
- Menna-Barreto L, Wey D. (2007) Ontogênese do sistema de temporização – a construção e as reformas dos ritmos biológicos ao longo da vida humana. *Psicologia USP*, 18(2): 133-153.
- Menna-Barreto L, Diez-Nogueira A. (2012) External temporal organization in biological rhythms. *Biol Rhythm Res*, 43(1): 3-14.

- Miyamoto Y, Sancar A. (1998) Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(11): 6097-6102.
- Mitsu A, Kumazawa S, Takahashi A, Ikemoto H, Cao S, Arai T. (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature*, 323: 720-722.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol Fisheries*, 9: 211-268.
- Moore HA, Whitmore D. (2014) Circadian rhythmicity and light sensitivity of the zebrafish brain. *Plos One*, 9(1): 1-11.
- Moore RY, Eichler VB. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, 42(1): 201-206.
- Moore RY, Klein DC. (1974) Visual pathways and the central neural control of rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res*, 71: 17-33.
- Moraes MNM, Santos LR, Mezzalana N, Poletini MO, Castrucci AML. (2014a) Regulation of melanopsins and *Per1* by α -MSH and melatonin in photo-sensitive *Xenopus laevis* Melanophores. *Biomed Res Intl*, doi: 10.1155/2014/654710.
- Moraes MNM, Lima LHRG, Ramos BCR, Poletini MO, Castrucci AML. (2014b) Endothelin modulates the circadian expression of non-visual opsins. *Gen Comp Endocrinol*, 205: 279-286.
- Morgan E. (1991) An appraisal of tidal activity rhythms. *Chronobiol Int*, 8(4): 283-306.
- Mori T, Binder B, Johnson CH (1996). Circadian gating of cell division in cyanobacteria growing with average doubling times of less than 24 hours. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 10183-10188.
- Morrison NA. (2013) RU486 reversal of cortisol repression of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induction of the human osteocalcin promoter. *Open J Endocr Metabol Dis*, 3: 55-62.
- Mrosovsky N, Reebs S.G, Honrado GI, Salmon PA. (1989) Behavioural entrainment of circadian rhythms. *Experientia*, 45: 696-702.
- Mrosovsky N. (1999) Masking: history, definitions and measurement. *Chronobiol Int*, 16(4): 415-429.
- Nomura MM. (2008) Efeitos dos ciclos de iluminação e de marés na ritmicidade da atividade locomotora de *Bathygobius soporator* (Valenciennes 1837) (Teleostei: Perciformes: Gobiidae). Tese de doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo. 85 pp.

- Norris DO. (1977) *Vertebrate Endocrinology*, 3a. ed, California: Academic Press, Inc, 580 pp.
- Nunes MT. (2012) Hipotálamo endócrino. In: Aires MM (coord) *Fisiologia*, 4a. ed, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 998-1017.
- Ohno S. (1999) Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970–1999. *Cell Develop Biol*, 10: 517-522.
- Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB. (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109: 307-320.
- Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AML, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Van Gelder RN. (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, 301: 525-527.
- Pando MP, Pinchak AB, Cermakian N, Sassone-Corsi P. (2001) A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 10178-10183.
- Peirson SN, Halford S, Foster RG. (2009) The evolution of irradiance detection: melanopsin and the non-visual opsins. *Phil Trans R Soc B*, 364: 2849-2865.
- Pereira DS, Tufik S, Pedrazzoli M. (2009) Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos. *Rev Bras Psiquiatr*, 31(1): 63-71.
- Pickering AD. (1981) Introduction: The concept of biological stress. In: Pickering AD. *Stress and Fish*. London: Academic Press Inc. LTD, p. 1-9.
- Postlethwait JH, Yan YL, Gates MA, Horne S, Amores A, Brownlie A, Donovan A, Egan ES, Force A, Gong Z, Goutel C, Fritz A, Kelsh R, Knapik E, Liao E, Paw B, Ransom D, Singer A, Thomson M, Abduljabbar TS, Yelick P, Beier D, Joly JS, Larhammar D, Rosa F, Westerfield M, Zon LI, Johnson SL, Talbot WS. (1998) Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet*, 18(4): 345-349.
- Preitner N, Damiola F, Lopez ML, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schliker U. (2002) The orphan nuclear receptor Rev-Erb alpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110: 251-260.
- Provencio I, Jiang G, deGrip, WJ, Hayes WP, Rollag MD. (1998) Melanopsin: an opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 340-345.
- Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. (2000) A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*, 20: 600-605.

- Provencio I, Rollag MD, Castrucci AML. (2002) Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature*, 415: 493.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247(4945): 997975-997978.
- Ralph MR, Menaker M. (1988) A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*, 241(4870): 1225-1227.
- Ramos BCR, Moraes MNM, Poletini MO, Lima LHRG, Castrucci AML. (2014) From blue light to clock genes in zebrafish ZEM-2S cells. *Plos One*, 9(9): 1-12.
- Reyer H, Ponsuksili S, Wimmers K, Murani E. (2013) Transcript variants of the porcine glucocorticoid receptor gene (NR3C1). *Gen Comp Endocrinol*, 189: 127–133.
- Rhen T, Cidlowski JA. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids: new mechanisms for old drugs. *The New Eng J Med*, 353(16): 1711-1723.
- Romer A, Parsons TS. (1985) *Anatomia comparada de vertebrados*, São Paulo: Atheneu, 428 pp.
- Rosenfeld P, Van Eekelen JAM, Levine S, De Kloet ER. (1988) Ontogeny of the type 2 glucocorticoid receptor in discrete rat brain regions: an immunocytochemical study. *Brain Res*, 470(1): 119-127.
- Rotenberg L, Marques N, Menna-Barreto L. (2003) História e perspectivas da Cronobiologia. In: Marques N, Menna-Barreto L (orgs) *Cronobiologia: princípios e aplicações*, 3a. ed, São Paulo: Edusp, p. 22-44.
- Roy B, Rai U. (2009) Genomic and non-genomic effect of cortisol on phagocytosis in freshwater teleost *Channa punctatus*: an *in vitro* study. *Steroids*, 74: 449-455.
- Roy B, Rai U. (2010) Transcriptomic and non-transcriptomic signaling mechanisms of cortisol in fishes. *J Scient Res*, 9: 83-99.
- Schaaf MJM, Chatzopoulou A, Spaink HP (2009) The zebrafish as a model system for glucocorticoid receptor research. *Comp Biochem Physiol A*, 153: 75-82.
- Schmid H, Cohen CD, Henger A, Irrgang S, Schlondorff D, Kretzler M. (2003) Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney Int*, 64: 356-360.
- Schoonheim PJ, Chatzopoulou A, Schaaf MJM. (2010) The zebrafish as an *in vivo* model system for glucocorticoid resistance. *Steroids*, 75: 918–925.
- Schulz M, Eggert M, Baniahmad A, Dostert A, Heinzl T, Renkawitz R. (2002) RU486-induced glucocorticoid receptor agonism is controlled by the receptor N terminus and by corepressor binding. *J Biol Chem*, 277(29): 26238-26243.

- Serra EL, Medalha CC, Mattioli R. (1999) Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Braz J Med Biol Res*, 32: 1551-1553.
- Sharma VK. (2003) Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiol Int*, 20(6): 901-919.
- Shearman L, Zylka MJ, Reppert SM, Weaver DR. (1999) Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neurosci*, 89: 387-397.
- So AY, Bernal TU, Pillsbury ML, Yamamoto KR, Feldman BJ. (2009) Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(41): 17582-17587.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. (2008) The behavior and ecology of zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev*, 83: 13-34.
- Stephan FK, Zucker I. (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 69(6): 1583-1586.
- Stokkan KA, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*, 293:490-493.
- Takumi T, Matsubara C, Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yagita K, Maebayashi Y, Sakakida Y, Okamura K, Takashima N, Okamura H. (1998a) A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes to Cell*, 3: 167-176.
- Takumi T, Taguchi K, Miyake S, Sakakida Y, Takashima N, Matsubara C, Maebayashi Y, Okumura K, Takekida S, Yamamoto S, Yagita K, Yan L, Young MW, Okamura H. (1998b) A light-independent oscillatory gene mPer3 in mouse SCN and OVLT. *The EMBO J*, 17(16): 4753-4759.
- Tamai TK, Carr AJ, Whitmore D. (2005) Zebrafish circadian clocks: cells that see light. *Biochem Soc Trans*, 33(5): 962-966.
- Tamai TK, Young LC, Whitmore D. (2007) Light signaling to the zebrafish circadian clock by Cryptochrome 1a. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(37): 14712-14717.
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. (2006) Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*, 147(12): 5549-5556.
- Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y. (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature*, 389: 512-516.
- Tekarita A. (2005) The opsins. *Genome Biol*, 6(213): 213.1-213.9.

- Thompson EBR, Thulasi R, Saeed MF, Johnson BH. (1995) Glucocorticoid antagonist RU 486 reverses agonist-induced apoptosis and c-myc repression in human leukemic CEM-C7 cells. *Ann N Y Acad Sci*, 761: 261-75.
- Thresher RJ, Vitaterna MH, Miyamoto Y, Kazantsev A, Hsu DS, Petit C, Selby CP, Dawut L, Smithies O, Takahashi JS. (1998) Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science*, 282(5393): 1490-1494.
- Torra IP, Tsibulsky V, Delaunay F, Saladin R, Laudet V, Fruchart JC, Kosykh V, Staels B. (2000) Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erb alpha expression in liver. *Endocrinology*, 141(10): 3799-806.
- Tosini G, Bertolucci C, Foà A. (2001) The circadian system of reptiles: a multioscillatory and multiphotoreceptive system. *Physiol Behavior*, 72: 461-471.
- Van der Horst GTJ, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wi J, Verkerk A, Eker APM, Dik Van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JHJ, Yasui A. (1999) Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398: 627-630.
- Vansteensel MJ, Michel S, Meijer JH. (2008) Organization of cell and tissue circadian pacemakers: a comparison among species. *Brain Res Rev*, 58: 18-47.
- Vatine G, Vallone D, Appelbaum L, Mracek P, Ben-Moshe Z, Lahiri K, Gothilf Y, Foulkes NS. (2009). Light directs zebrafish period2 expression via conserved D and E boxes. *Plos Biol*, 7(10): 1-18.
- Vatine G, Vallone D, Gothilf Y, Foulkes NS. (2011) It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Letters*, 585: 1485-1494.
- Venero C, Borrell J. (1999) Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. *Eur J Neurosci.*, 11(7): 2465-2473.
- Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS. (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science*, 264: 719-725.
- Von Schantz M, Jenkins A, Archer SN. (2006) Evolutionary history of the vertebrate period genes. *J Mol Evol*, 62: 701-707.
- Wang H. (2008) Comparative analysis of period genes in teleost fish genomes. *J Mol Evol*, 67: 29-40.
- Wang H, Liu C, Ma F, Chen W, Liu J, Hu B, Zheng L. (2014) Circadian clock mediates light/dark preference in zebrafish (*Danio Rerio*). *Zebrafish*, 11(2): 115-121.

- Wardell SE, Narayanan R, Weigel NL, Edwards DP. (2010) Partial agonist activity of the progesterone receptor antagonist RU 486 mediated by an amino-terminal domain coactivator and phosphorylation of serine400. *Mol Endocrinol*, 24(2): 335-345.
- Weger BD, Sahinbas M, Otto GW, Mracek P, Armant O, Dolle D, Lahiri K, Vallone D, Ettwiller L, Geisler R, Foulkes NS, Dickmeis T. (2011) The light responsive transcriptome of the zebrafish: function and regulation. *Plos One*, 6(2): 1-15.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert MS. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phase circadian firing rhythms. *Neuron*, 14: 697-706.
- Whitmore D, Foulkes NS, Strahle U, Sassone-corsi P. (1998) Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat Neurosci*, 1: 701-707.
- Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-corsi, P. (2000) Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature*, 404: 87-91.
- Underwood H, Menaker M. (1976) Extraretinal photoreception in lizards. *Photochem Photobiol*, 23: 221-243.
- Yamamoto T, Nakahata Y, Tanaka M, Yoshida M, Soma H, Shinohara K, Yasuda A, Mamine T, Takumi T. (2005) Acute physical stress elevates mouse *Period1* mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J Biol Chem*, 280(51): 42036-42043.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288: 682-685.
- Ye R, Selby CP, Chiou YY, Ozkan-Dagliyan I, Gaddameedhi S, Sancar A. (2014) Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian clock. *Genes Dev*, 28(18): 1989-1998.
- Young M. (2000) Life's 24-hour clock: molecular control of circadian rhythms in animal cells. *TIBS*, 25: 601-606.
- Zhang X, Dong G, Golden SS. (2006) The pseudo-receiver domain of CikA regulates the cyanobacterial circadian input pathway. *Mol Microbiol*, 60(3): 658-668.
- Zhang Y, Sheng H, Qi J, Ma B, Sun J, Li S, Ni X. (2012) Glucocorticoid acts on a putative G protein-coupled receptor to rapidly regulate the activity of NMDA receptors in hippocampal neurons. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302: 747-758.

- Zhu LJ, Altmann SW. (2005) mRNA and 18S-RNA coapplication-reverse transcription for quantitative gene expression analysis. *Anal Biochem*, 345: 102-109.
- Zimmerman NH, Menaker M. (1979) The pineal gland: a pacemaker within the circadian system of the house sparrow. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(2): 999-1003.
- Ziv L, Gothilf Y. (2006) Circadian time-keeping during early stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 4146-4151.
- Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. (1998) Three *period* homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*, 20: 1103-1110.