Fernanda Pizão Farhat

Modulação dos genes de relógio *Per1*, *Cry1b*,
Clock e da melanopsina por endotelina-1 em
células embrionárias de *Danio rerio*

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

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

São Paulo

2007

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. RELÓGIOS BIOLÓGICOS.....	1
1.1. Bases moleculares dos relógios biológicos	2
2. MELANOPSINA	5
2.1. A descoberta da melanopsina.....	5
2.2. Caracterização molecular da melanopsina	6
2.3. Melanopsina e sinalização intracelular	6
3. ENDOTELINAS.....	8
3.1. Caracterização geral e síntese	8
3.2. Funções das endotelinas	9
3.3. Receptores de endotelinas	9
OBJETIVOS	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
1. Manutenção de células ZEM 2S.....	12
2. Curvas de crescimento celular	12
3. Determinação da presença de RNAm para melanopsina, receptor de endotelina e Cry	13
3.1. Extração de RNA total.....	13
3.2. Reação de transcriptase reversa - RT-PCR	14
3.3. Reação de polimerase em cadeia – PCR	14
3.4. Clonagem e sequenciamento para confirmação dos produtos de PCR..	18
4. Determinação da presença da proteína melanopsina por imunocitoquímica	19
5. Ensaios hormonais por PCR quantitativo (tempo real).....	20
RESULTADOS.....	23
1. Proliferação celular.....	23
2. Determinação da presença de RNAm de melanopsina, Cry e de receptores de endotelinas	25
3. Demonstração da presença da proteína melanopsina	29
4. Expressão temporal de melanopsina, Per1, Clock, Cry1b e a influência de endotelina-1	31
4.1. Melanopsina.....	31
4.2. Clock	36
4.3. Per1.....	41
4.4. Cry1b.....	46
DISCUSSÃO	51
RESUMO.....	59
ABSTRACT	62
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

INTRODUÇÃO

1. RELÓGIOS BIOLÓGICOS

Relógios biológicos são marcapassos endógenos presentes tanto em eucariotos quanto em procariotos. Relógios diferentes possuem períodos distintos, e aqueles que se aproximam de 24h de oscilação são chamados relógios circadianos (*circa* = aproximadamente; *dian* = um dia). Ritmos com períodos mais curtos ou mais longos são chamados ultradianos e infradianos, respectivamente. Em mamíferos, os relógios circadianos controlam uma grande variedade de processos fisiológicos e comportamentais, incluindo padrões de sono, de secreção hormonal, metabolismo e performance cognitiva. O primeiro relógio circadiano identificado nesta classe situa-se no núcleo supraquiasmático (NSQ), localizado no hipotálamo (Takahashi, 1995).

Inúmeros organismos utilizam-se de variáveis ambientais tais como fotoperíodo, temperatura, precipitação pluviométrica e disponibilidade de alimento para regular processos fisiológicos, como hibernação, reprodução e termorregulação (Vivien- Roels *et al.*, 1988), porém uma grande diferença entre ciclos controlados por fatores externos e osciladores biológicos está no fato de que apenas os últimos são capazes de antecipar as mudanças ambientais (von Schantz *et al.*, 2000).

Atualmente sabe-se que relógios estão presentes também em áreas do cérebro fora do núcleo supraquiasmático e em muitos tecidos periféricos como retina, coração, pulmões e fígado. Apesar de muitos seres unicelulares possuírem marcapassos circadianos, foi surpreendente a descoberta de que tecidos e linhagens celulares imortalizadas apresentavam relógios biológicos (Balsalobre *et al.*, 1998; Yamazaki *et al.*, 2000). Em *Drosophila* e *Danio rerio* os osciladores periféricos podem ser sincronizados diretamente por luz (Emery *et al.*, 1998; Stanewsky *et al.*, 1998; Ceriani *et al.*, 1999; Whitmore *et al.*, 2000), enquanto em mamíferos o reinício de fase dos osciladores periféricos parece ser controlado por sinais regulados pelo marcapasso do núcleo supraquiasmático (Yamazaki *et al.*,

2000). Os mecanismos dessa sincronização parecem ser específicos para cada tecido, envolvendo sinais humorais e neurais (Balsalobre *et al.*, 2000; McNamara *et al.*, 2001; Terazono *et al.*, 2003). Relógios periféricos distinguem-se do relógio central uma vez que a expressão dos genes de relógio em órgãos em cultura persiste por apenas alguns dias (Yamasaki *et al.*, 2000).

Osciladores em culturas celulares de mamífero podem ser observados imediatamente após um curto tratamento com altas concentrações de soro, ou com uma extensa variedade de drogas que ativam conhecidas vias de sinalização, como as vias de proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC) e MAPK, as estimuladas pela ativação de receptores de glicocorticóide, endotelina, glicose e ácido retinóico (Akashi & Nishida, 2000; Balsalobre *et al.*, 2000; Hirota *et al.*, 2002; McNamara *et al.*, 2001; Yagita & Okamura, 2000; Yagita *et al.*, 2001). Ritmos circadianos sustentáveis de expressão dos genes de relógio podem ser estabelecidos simplesmente pela exposição de células do teleósteo *Danio rerio* em cultura a ciclos claro:escuro (Vallone *et al.*, 2004).

Uma razão para o recente aumento de atenção para o sistema circadiano de *Danio rerio* é o seu potencial como modelo de sistema para análise genética dos mecanismos de relógio (Allada *et al.*, 2001; Loros & Dunlap, 2001; Yong & Kay, 2001; Stanewsky, 2002; Okamura *et al.*, 2002), já que linhagens celulares derivadas de embriões deste animal expressam relógios sincronizados por luz (Whitmore *et al.*, 2000; Pando *et al.*, 2001).

É possível que não exista um marcapasso central em *Danio rerio*, e que o sistema circadiano seja composto por vários marcapassos distribuídos pelo animal, os quais são independentemente sincronizados por luz (Cahill, 2001).

1.1. Bases moleculares dos relógios biológicos

Os componentes centrais de um relógio são definidos como genes dos quais os produtos protéicos são essenciais para a geração e regulação dos ritmos circadianos no interior de células individuais (Takahashi, 2004).

Abordagens genéticas revelaram uma notável conservação das bases moleculares e bioquímicas dos relógios biológicos. Vários mutantes de *Drosophila*

têm sido descritos, o que trouxe um grande avanço na identificação do papel de cada gene de relógio. Assim, moscas com alelos mutantes de *period* podem exibir períodos mais curtos, mais longos ou arrítmicos. Através da identificação de *period* (*dper*), *cryptochrome* (*dcry*), *clock* (*dclk*), *double-time* (*dbt*) e de suas respectivas proteínas (dPER, dCRY, dCLK e DBT) em *Drosophila*, pesquisadores de vários laboratórios clonaram os ortólogos e parálogos de mamíferos (*mper1*, *mper2*, *mcry1*, *mcry2*, *mClock*, *Bmal1*, *ck1ε* etc.), e determinaram que estes genes desempenham importante função nas bases moleculares do relógio circadiano.

O funcionamento do relógio circadiano envolve mecanismos de retroalimentação positiva e negativa. Os genes *Clock* e *Bmal1* (*brain and muscle Arnt-like protein 1*) formam um heterodímero, funcionando como fator de transcrição para a expressão dos genes *Per* (*period*), *Cry* (*cryptochrome*) e do receptor órfão REV-ERB. PER e CRY formam oligômeros que são transportados do citoplasma para o núcleo, onde bloqueiam a sua própria transcrição ao inibir a ação de CLOCK/BMAL1. Quando a proteína REV-ERB está ausente, o gene *Bmal1* (e possivelmente também o gene *Clock*) é liberado, podendo formar novamente o fator de transcrição CLOCK/BMAL1, reiniciando um novo ciclo circadiano (Albrecht & Eichele, 2003). Em geral, um típico ciclo circadiano tem início nas primeiras horas da manhã com a ativação da transcrição de *Per* e *Cry* por CLOCK/BMAL1. Os níveis de transcrição atingem seu ápice por volta de meio-dia e os níveis de proteína no citoplasma atingem o seu apogeu cerca de duas horas depois.

Um outro mecanismo regulatório é induzido por heterodímeros CLOCK/BMAL1 que ativam a transcrição de receptores nucleares órfãos, *Rev-erba* e *Rora* (Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004; Triqueneaux *et al.*, 2004; Akashi & Takumi, 2005). REV-ERB α e ROR α subseqüentemente competem pela ligação a ROREs (*retinoic acid-related orphan receptor response elements*), presentes no promotor de *Bmal1*. ROR ativa a transcrição de *Bmal1* (Sato *et al.*, 2004; Akashi *et al.*, 2005; Guillaumond *et al.*, 2005), enquanto REV-ERB (α e β) reprime o processo de transcrição (Preitner *et al.*, 2002; Guillaumond *et al.*, 2005). Assim, a oscilação circadiana de *Bmal1* é tanto positivamente quanto negativamente regulada por RORs e REV-ERBs.

O modelo biológico baseado principalmente em estudos realizados com células em cultura, postula que a proteína PER mantém-se em constante vaivém entre o núcleo e o citoplasma. Após sofrer hiperfosforilação pela ação da caseína quinase I ϵ (CkI ϵ), a estabilidade de PER diminui. Ocorre, então, a sua degradação no citoplasma, enquanto a proteína CRY liga-se a PER no núcleo, impedindo a sua saída. Desta forma, ocorre o bloqueio de CLOCK/BMAL1, resultando no fim da transcrição de *Per* e *Cry*. Em algum ponto, quando muita proteína PER é degradada no citoplasma, a concentração de PER no núcleo torna-se muito baixa para manter a retroalimentação, levando ao início de um novo ciclo. Assim, a periodicidade do relógio circadiano resulta da combinação entre retroalimentação transcricional positiva e negativa, o vaivém constante de PER entre o núcleo e o citoplasma, e a fosforilação e degradação de PER (Albrecht & Eichele, 2003).

Dos genes de relógio, somente os *Crys* dos animais possuem ortólogos em plantas, e portanto, representam as proteínas de relógio que mais cedo evoluíram e duplicaram (Tauber *et al.*, 2004). A função de CRY vai de fotorreceptor em plantas e *Drosophila* até fator de transcrição em mamíferos. Em um mesmo organismo, diferentes tecidos utilizam CRY como fotorreceptor ou com função no relógio, como em *Drosophila*. Diferentes membros da família CRY têm função no relógio e na sinalização por luz, o que ocorre em *Danio rerio* (Tauber *et al.*, 2004).

Em *Drosophila*, CRY age como fotorreceptor ligando-se a TIM de forma luz-dependente (Ceriani *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 1998; Ishikawa *et al.*, 1999; Stanewsky *et al.*, 1998). Entretanto, em camundongos, os genes *Cry* funcionam como componentes essenciais na alça negativa da retroalimentação circadiana (Kume *et al.*, 1999; Thresher *et al.*, 1998; van der Horst *et al.*, 1999; Vitaterna *et al.*, 1999).

Pelo menos seis tipos de *Crys* estão presentes nas células Z3 de *Danio rerio*, classificados como *Cry* repressor (zCry 1a, 1b, 2a e 2b) e não repressor (zCry 3 e 4). As diferenças nestes zCrys ainda não estão esclarecidas (Kobayashi *et al.*, 2002).

2. MELANOPSINA

2.1. A descoberta da melanopsina

Há muito já se sabia que os fotorreceptores clássicos, cones e bastonetes, não eram essenciais para o ajuste do relógio biológico mestre de mamíferos, o núcleo supraquiasmático, ao ciclo claro:escuro. No entanto, também era fato conhecido que a enucleação bilateral em camundongos levava o relógio a correr em livre-curso, com um período menor que 24h. Deveria haver, portanto, na retina, fotorreceptores outros que não cones e bastonetes, portadores de fotopigmento, capazes de capturar a irradiação luminosa e enviar essa informação ao núcleo supraquiasmático (Yamazaki *et al.*, 2002).

Somente no final da década de 90, graças aos esforços de dois pesquisadores, Ignacio Provencio e Mark Rollag, uma nova opsina foi descoberta. Curiosamente, essa opsina foi clonada inicialmente de melanóforos embrionários do anfíbio *Xenopus laevis* e, por isso, a denominaram melanopsina. Em seguida, esses pesquisadores foram capazes de clonar melanopsina da retina de todos os grupos de vertebrados estudados, inclusive do homem (Provencio *et al.*, 1998). Corresponde ao gene *Opn4* do genoma humano.

Melanopsina é encontrada em uma subpopulação de células ganglionares da retina de camundongo e humana (Provencio *et al.*, 2002), intrinsecamente fotossensíveis (Berson *et al.*, 2002), que irradiam para o núcleo supraquiasmático e para outros centros integradores de respostas fóticas não visuais (Gooley *et al.*, 2001). Não só o soma dessas células é imunorreativo para melanopsina, mas também uma extensa rede dendrítica, formando a estrutura ideal para captura de luminosidade.

Em células ganglionares da retina, a resposta intrínseca à luz é abolida em manipulações genéticas em que a expressão de melanopsina é perdida, porém não há grande alteração sobre a ritmicidade circadiana (Panda *et al.*, 2002). Esta e outras respostas não-visuais à luz são suprimidas apenas quando a deficiência em melanopsina está conjugada com mutações que incapacitam cones e bastonetes

(Panda *et al.*, 2003).

2.2. Caracterização molecular da melanopsina

A sequência peptídica da melanopsina demonstra que esta proteína pertence ao grupo dos receptores com sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G, especificamente da família de proteínas fotorreceptoras, conhecidas como opsinas.

Melanopsina encontrada em vertebrados apresenta maior homologia à sequência peptídica de opsinas de invertebrados (Provencio *et al.*, 1998). Enquanto comparações das seqüências de aminoácidos das melanopsinas publicadas revelam significativa similaridade entre as espécies (cerca de 55% de identidade excluindo-se os terminais N- e C-), elas são muito menos conservadas em relação às seqüências comparáveis entre cones e bastonetes (aproximadamente 85% de identidade entre *Xenopus* e o homem em opsinas de cones). Dessa forma, acreditava-se que as seqüências de melanopsina conhecidas não fossem de fato ortólogas, mas que os múltiplos genes evoluíram no genoma dos vertebrados.

Confirmando essa hipótese, em galinha, teleósteo e *Xenopus*, foram identificados novos genes da melanopsina, denominados Opn4_m (*mammal-like*), sendo estes os ortólogos da melanopsina humana. Já Opn4_x (*Xenopus-like*) está presente somente nos vertebrados não-mamíferos (Bellingham *et al.*, 2006).

A descoberta dos dois genes em genomas de diversos vertebrados (peixe, ave e anfíbio) identifica sua divergência como um ancestral, podendo ter provavelmente ocorrido antes da emergência dos Tetrapoda no final do Devoniano, há 360 milhões de anos atrás. Isso também implica em uma forte pressão seletiva para manter ambos os genes da melanopsina pelo tempo evolutivo e pelo percurso filogenético.

2.3. Melanopsina e sinalização intracelular

Estudos realizados com melanóforos de *Xenopus* demonstraram que a cascata de sinalização por fosfoinositídeos é responsável pela fotodispersão de melanossomos em melanóforos dérmicos de anfíbio, os quais expressam

melanopsina (Isoldi *et al.*, 2005). A ativação por luz de segundos mensageiros de fosfoinositídeos é comum entre fotorreceptores de invertebrados, porém nunca havia sido descrita para vertebrados.

Melanopsina forma um fotopigmento funcional quando é expressa heterologicamente em células COS (Newman *et al.*, 2003), em oócitos de *Xenopus* (Panda *et al.*, 2005), em células Neuro-2A (Melyan *et al.*, 2005) ou em células HEK-293 (Qiu *et al.*, 2005). Através do estabelecimento da linhagem celular HEK293 (*human embryonic kidney cell line*) que expressa melanopsina humana, foi demonstrado que a sinalização por luz evoca uma resposta que depende da ativação de fosfolipase C, e em que há aumento de cálcio intracelular proveniente de estoques intracelulares (Qiu *et al.*, 2005; Kumbalasiri *et al.*, 2006).

De acordo com uma análise molecular comparativa entre as famílias de genes dos fotorreceptores, as células ganglionares da retina, as células horizontais e as células amácrinas evoluíram a partir de um fotorreceptor ancestral rabdomérico, diferente de cones e bastonetes, os quais são derivados de um precursor ciliado comum (Arendt, 2003). Assim, o fato da sinalização por luz em células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis utilizar a via do fosfoinositídeo pode refletir esta história evolutiva.

O primeiro evento crítico na ativação da melanopsina é a fotoisomerização do retinaldeído do cromóforo de 11-*cis* para *all-trans*. No olho de vertebrados, 11-*cis*-retinaldeído provém de várias etapas enzimáticas, processo conhecido como ciclo visual, no qual 11-*cis*-retinaldeído é regenerado a partir de *all-trans* nos segmentos mais externos do fotorreceptor. No entanto, elementos chave dessa via estão no epitélio pigmentar da retina (EPR), essencial, portanto, para essa regeneração.

Como a melanopsina é encontrada nas camadas mais superficiais da retina, distante do EPR, é improvável que esta participe na regeneração do cromóforo 11-*cis* para a melanopsina. Atualmente acredita-se que as células ganglionares utilizem um mecanismo de regeneração do 11-*cis* da melanopsina *in vivo* independente de outros tipos celulares (Tu *et al.*, 2006). De fato, isso estaria de acordo com o fato de que fotorreceptores rabdoméricos regeneram seu retinal 11-*cis in situ*, processo ativado por comprimentos de onda diferentes do estímulo para fotorrecepção.

3. ENDOTELINAS

3.1. Caracterização geral e síntese

A endotelina (ET) foi inicialmente isolada e identificada em culturas de células endoteliais porcinas, sendo um potente peptídeo vasoconstritor composto por 21 resíduos de aminoácidos. Em condições fisiológicas normais, ETs não são hormônios circulantes, agem como fatores autócrinos e parácrinos em múltiplos alvos no organismo. Existem três isoformas endógenas de endotelinas, designadas ET-1, ET-2 e ET-3 (Inoue *et al.*, 1989).

Vários fatores de ação parácrina atuam em mamíferos para regular as respostas fisiológicas de células efetoras. Tais sistemas parácrinos também atuam em vertebrados não-mamíferos, pois parecem ser o meio mais primitivo de comunicação entre as células. Dentre esses fatores, pode-se citar: peptídeos opióides; eicosanóides, em especial as prostaglandinas; óxido nítrico; endotelinas (Fujii, 2000).

Um grupo de peptídeos similares às ETs, as sarafotoxinas (SRTXs), foi encontrado no veneno da serpente *Atractaspis engaddensis* (Sokolovsky & Shrager – Levine, 2001). Estes peptídeos homólogos, os quais presumivelmente evoluíram a partir do mesmo ancestral, são utilizados de diferentes formas: nas serpentes como um veneno exócrino, e em mamíferos como um sinal endócrino.

Os precursores das ETs são processados por duas proteases para criar a forma ativa. As pré-pró-endotelinas, de aproximadamente 200 resíduos, são clivadas por peptidases, formando-se intermediários biologicamente inativos denominados *big* endotelinas (*big* ETs). *Big* ETs são clivadas formando-se os produtos finais com 21 aminoácidos (Inoue *et al.*, 1989). Esta última clivagem é realizada por enzimas denominadas *endothelin-converting enzymes* (ECEs), as quais apresentam-se sob duas formas: ECE-1 e ECE-2. ECE-1 age sobre *big* ETs tanto intracelularmente quanto na superfície celular (Xu *et al.*, 1994). ECE-2 é encontrada em diversos tipos celulares, incluindo neurônios, agindo intracelularmente (Emoto & Yanagisawa, 1995).

3.2. Funções das endotelinas

Inicialmente acreditava-se que apenas as células endoteliais vasculares produzissem ET-1 (Inagami *et al.*, 1995; Palma *et al.*, 2002); no entanto, endotelinas podem ser encontradas em diversos tipos celulares ou teciduais, como em células da musculatura lisa vascular, em queratinócitos, em macrófagos, em glândulas mamárias, na placenta, no endométrio, no sistema nervoso central e em algumas glândulas endócrinas (Stjernquist, 1998). Possuem ampla ação, atuando no tônus basal vascular, no balanço de sódio, no desenvolvimento de células da crista neural e na neurotransmissão.

ET-1 também age nos relógios biológicos, podendo induzir a expressão de genes circadianos em cultura de células Rat-1, sendo que a expressão temporal de *Per*, *Bmal1*, *Cry1* e *Dbp* além de *Clock* têm, nessas células, o mesmo padrão de expressão encontrado no núcleo supraquiasmático (Yagita *et al.*, 2001). ET-1 caU S A rápida síntese de PER1 e PER2, e translocação dessas proteínas para o núcleo (Yagita *et al.*, 2001).

O papel de agente diferenciador das endotelinas em células embrionárias está bem estabelecido para aves e mamíferos. Mutações no receptor ETA e no gene de ET-1 afetam o desenvolvimento dos derivados mesodérmicos da crista neural em aves. A expressão de ET-1 e de seu receptor ETA é variável nos diferentes estágios do desenvolvimento embrionário (Nataf *et al.*, 1998). Em camundongos e humanos, mutações nos genes codificantes do receptor ETB para endotelina e de seu ligante ET-3 provocam deficiências em melanócitos derivados da crista neural e em neurônios entéricos (Opdecamp *et al.*, 1998). Já em vertebrados pecilotérmicos, muito pouco se sabe sobre a função de endotelinas em geral, e particularmente na diferenciação.

Assim, utilizamos células embrionárias de teleósteo com o intuito de demonstrar a existência e provável precoce função do receptor de endotelina na escala filogenética.

3.3. Receptores de endotelinas

Três tipos de receptores para endotelinas já foram clonados, sendo eles designados ETA, ETB e ETC. Todos pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G. Os receptores possuem diferentes afinidades para as três isoformas de ET e/ou sarafotoxinas, sendo: (1) ETA → ET-1 ≥ ET-2 >> SF S6b > ET-3 (Arai *et al.*, 1990); (2) ETB → ET-1 = ET-2 = ET-3 = SFs (Sakurai *et al.*, 1990; 1992) e (3) ETC → ET-3 > ET-1 = ET-2 (Karne *et al.*, 1993).

Em células Rat-1, ET-1 estimula a expressão de *rPer2* via receptor ETA acoplado à proteína Gq/11 (Takashima *et al.*, 2006), mobilizando Ca^{2+} dos estoques intracelulares através de IP_3 (Creba *et al.*, 1983; Streb *et al.*, 1983; Taylor *et al.*, 1991; Singer *et al.*, 1997; Werry *et al.*, 2003).

A ligação de ET-1 ao receptor ETA induz endocitose do complexo, e aproximadamente 30% da ET-1 internalizada permanece fortemente ligada ao receptor mesmo após 2h de endocitose. É possível que a transdução de sinal permaneça mesmo após a internalização (Chun *et al.*, 1994).

Apesar de ETA e ETB utilizarem mecanismos dependentes de arrestina e dinamina/clatrina para a internalização, eles seguem caminhos diferentes no interior da célula após a estimulação por ET. Essas diferentes rotas de tráfego intracelular podem ser importantes para as diferentes respostas fisiológicas mediadas por estes receptores. Enquanto os receptores ETA são reciclados, os receptores ETB seguem para degradação nos lisossomos. A rápida reciclagem de ETA pode explicar a resposta de contração prolongada em células musculares lisas, enquanto a degradação de ETB sugere uma função desse receptor no *clearance* de ET da circulação (Bremnes *et al.*, 2000).

ETA e ETB formam heterodímeros constitutivos, porém a heterodimerização é reversível. A dissociação é mediada especificamente por um agonista seletivo de ETB, e depende da endocitose. A heterodimerização dos receptores resulta em um atraso do seqüestro de ETB quando estimulado por ET-1, resultando numa *down-regulation* do *clearance* de ET-1 (Grogan *et al.*, 2004).

OBJETIVOS

- 1) Investigar a influência da duração da fotofase na proliferação de células embrionárias ZEM 2S do teleósteo *Danio rerio*.
- 2) Investigar a expressão de melanopsina, de *Cry* e de receptores para endotelina em células embrionárias ZEM 2S do teleósteo *Danio rerio*.
- 3) Determinar o padrão temporal da expressão dos genes *Per1*, *Cry1b*, *Clock*, e da melanopsina e sua modulação por endotelina-1 em células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Manutenção de células ZEM 2S

Células ZEM 2S foram mantidas em cinco partes de meio L-15 (Gibco, CA, EUA), e quatro partes de meio D-MEM/F-12 (Gibco, CA, EUA) suplementados com 7,5% de NaHCO_3 , 10% de soro fetal bovino (Cultilab, SP, Brasil) e 1% de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Sigma Chem. Co., MO, EUA), pH 7,2, a 28°C. O meio de cultura foi trocado sob fluxo laminar (Trox modelo FLV) a cada 72 horas e as células subcultivadas (1:6) quando atingiram a confluência dos frascos. Para tanto foram removidas com solução de Tyrode/EDTA (em g/L: NaCl 8,0; KCl 0,2; NaHCO_3 1,0; NaH_2PO_4 0,05; MgCl_2 1,0; EDTA 1,86) e transferidas para novos frascos.

2. Curvas de crescimento celular

Para investigar a influência da fotofase na proliferação celular foram realizadas quatro curvas de crescimento em células previamente mantidas por 5 dias em regime de 14C:10E (14 horas de luz alternadas com 10 horas de escuro) para sincronização da função celular pelo ciclo claro:escuro. No 6º. dia, foram semeadas 1×10^6 células em meio descrito acima em frascos de cultura de 25cm^2 e transferidas para as seguintes condições: escuro constante; 14C:10E; 10C:14E e luz constante. Após adesão por 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio fresco. A partir do segundo dia, a cada 24 horas, as células foram destacadas dos frascos de cultura, em triplicata, com volume conhecido de Tyrode/EDTA, coradas em 0,4% de Trypan Blue (Sigma Chem. Co., MO, EUA) em PBS por 3min e contadas em câmara de Newbauer. Em ciclos de claro-escuro, a luz era ligada às 9 horas e a

intensidade luminosa foi de 650 lux. Em escuro constante, as trocas de meio e remoção das células com Tyrode/EDTA foram realizadas sob luz vermelha (filtro KODAK, GBX-2).

Para obtenção da curva de crescimento e do tempo de duplicação, foi utilizada análise de regressão não-linear para crescimento exponencial pelo programa GraphPad Prism (Intuitive Software for Science, San Diego, CA.). As curvas de crescimento foram comparadas através da análise de variância *one way* e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Determinação da presença de RNAm para melanopsina, receptor de endotelina e Cry

3.1. Extração de RNA total

Para extração do RNA total de células, utilizamos frascos de cultura de 25 cm² semiconfluentes (80 a 90%). Após o descarte do meio, adicionou-se 1 mL de *Tri-Reagent-LS* (Sigma Chem. Co., MO, EUA) diretamente sobre as células. O lisado celular foi coletado e incubado por 5min à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação das proteínas nucleares. Adicionou-se 200 uL de bromo cloropentano (Sigma Chem. Co., MO, EUA) e, em seguida, as amostras foram agitadas vigorosamente por 15seg. Após incubação por 10min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15min a 4° C, separando-se a seguir a fase superior aquosa, que contém RNA. O RNA foi precipitado com a adição de 650uL de isopropanol (Sigma Chem. Co., MO, EUA) por 10min à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 35min a 4° C. O sobrenadante foi removido e o RNA lavado com 1,3 mL de etanol 75%. O RNA foi recuperado por centrifugação a 12.000 x g por 15min a 4° C, e a lavagem com etanol repetida, sendo as amostras colocadas a -80°C por no mínimo 1h. Após nova centrifugação, o etanol foi descartado e o precipitado de RNA evaporado à temperatura ambiente, ressuspendido em 20uL de água tratada com dietil pirocarbonato (H₂O/DEPC, Ambion Inc, TX, EUA) e tratado com DNase conforme instruções do fabricante (*turbo-DNA-free*TM, Ambion Inc., TX, EUA). Resumidamente,

a cada amostra foi adicionado 10% de volume do tampão para DNase I e 1uL de DNase I. A seguir, as amostras foram incubadas por 30min a 37°C. Foram acrescentados 10% do volume de reagente de inativação, seguido por incubação por 2min a temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 x g por 2min para precipitar o reagente de inativação com a DNase.

3.2. Reação de transcriptase reversa - RT-PCR

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

3.3. Reação de polimerase em cadeia – PCR

Para os experimentos seguintes, utilizamos cDNA de células embrionárias ZEM 2S de *D. rerio*, com *primers* para melanopsina e para receptores de endotelina de *D. rerio*. Também foi utilizado cDNA de células embrionárias ZEM 2S de *D. rerio*, com *primers* para os genes *Cry1a*, *Cry1b*, *Cry2a*, *Cry2b*, *Cry3*, *Cry4* e como controles positivos, os *primers* para o receptor de endotelina ETA 14F e 17B e para a melanopsina IPF156 e IPB 198.

Tabela I. Primers utilizados para PCR de melanopsina

<i>forward primer</i>	<i>backward primer</i>	cDNA	tamanho esperado(pb)
IPF175	IPB202	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	174
IPF175	IPB191	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	195
IPF175	IPB184	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	377
IPF175	IPB198	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	695
IPF176	IPB184	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	281
IPF176	IPB198	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	599
IPF156	IPB184	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	204
IPF156	IPB198	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	522
IPF166	IPB198	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	365
IPF212	IPB198	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	187
IPF180	IPB198	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	141

Tabela II. Primers utilizados para PCR de receptores de endotelinas

<i>forward primer</i>	<i>backward primer</i>	cDNA	seletividade e tamanho esperado(pb)
14F	16B	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	ETA 284
14F	17B	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	ETA 544
15F	18B	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	ETB 699
15F	19B	ZEM 2S de <i>D. rerio</i>	ETB 823

Tabela III. Primers utilizados para PCR de *Cry*

<i>forward primer</i>	<i>backward primer</i>	cDNA	seletividade e tamanho esperado(pb)
38F	43B	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Cry1a</i> 246
39F	44B	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Cry1b</i> 175
40F	45B	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Cry2a</i> 150
41F	46B	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Cry2b</i> 203
42F	47B	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Cry3</i> 216
43F	48B	ZEM 2S de <i>D.rerio</i>	<i>Cry4</i> 188

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

<i>Primers</i>	Sequências
IPF175	5'-CCT AGC TGT GGC TGA TTT CTT-3'
IPF176	5'-CGA GCT CTA CGC CTT CTG C-3'
IPF156	5'-TAT CGC TGC TGA TCG TTG TC-3'
IPF166	5'-GGG CTT CAG ACG TCT TGT TC-3'
IPF212	5'-GGG AAA CGC ACA AGG TGT AT-3'
IPF180	5'-GGC GAA AGT CGC TCT TGT AG-3'
IPB202	5'-CGG TCA AAG TCA TCA TCG AG-3'
IPB191	5'-GAC AAC GAT CAG CAG CGA TA-3'
IPB184	5'-TGG GGT GAA GGT CAT GTA ATC-3'
IPB198	5'-CTT GGC AAT CAC AGC AGG TA-3'
14F	5'-TGG CTA AAG CCG TCT TCT GT-3'
15F	5'-TTT CGA GCA GTG TCA TCC TG-3'
16B	5'-CCT GAA CTG GAC ACC TGG TT-3'
17B	5'-CCC GAA GTC TGA GAA ACA GC-3'
18B	5'-TTA TGG CTG ATC CTC GCT CT-3'
19B	5'-TCA CCA TTT TAT GGT TCA TGG-3'
38F	5'- TTT GCT GCA GTG TTT GGA AG - 3'
39F	5'- CCA GCA ACT CTC CTG CTA CC - 3'
40F	5'- ACC AAC AAC TGT CCC GCT AC - 3'
41F	5'- AGA GGC ATG ATG GGA AAA TG - 3'
42F	5'- GAT CAA CCA TGC AGA GAG CA - 3'
43F	5'- CCA GAG GAA CCT GGA ATT GA - 3'
43B	5'- TCC AGA TCG TAG AGC GTG TG - 3'
44B	5'- TGC AAA TGC TGG AAA CTC TG - 3'
45B	5'- CAA CAG AGC CGC TTG ATA CA - 3'
46B	5'- GGT CGC TCA AAG TTC TCC TG - 3'
47B	5'- GGT GTA GAA GGT GCG GTG AT - 3'
48B	5'- TAT GGT CTG AGC TGC CAC TG - 3'

Tabela V. Parâmetros utilizados para as reações de PCR

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

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

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

3.4. Clonagem e sequenciamento para confirmação dos produtos de PCR

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

O filtrado foi passado por colunas Millipore para remoção de sais, ficando o DNA retido na coluna. Este foi então eluído com 18uL de água destilada e 2uL de

tampão de PCR (10x). Utilizando o kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, CA, EUA), 2uL da solução acima foram adicionados a 1uL de solução salina, 2uL de água estéril e 1uL do vetor pCR II TOPO. Após incubação à temperatura ambiente por 5min, os tubos foram colocados sobre gelo e 2uL da reação adicionados ao frasco de células competentes One Shot. O conteúdo total foi espalhado em placas de agar contendo ampicilina (Quality Biological Inc., MD, EUA), nas quais X-gal 50mg/ml (Invitrogen, CA, EUA) havia sido previamente aplicada. Após 12h a 37° C, colônias brancas foram coletadas, colocadas em 3mL de LB (Quality Biological Inc., MD, EUA) contendo 3uL de canamicina 50mg/mL e incubadas por mais 12h a 37° C. A seguir procedeu-se a PCR utilizando os *primers* promotores do vetor (T7 ou SP6) para verificação da inserção do produto (o peso deve ser o peso do produto de PCR + 190). Metade do volume foi congelado em LB contendo glicerol e a outra metade submetida a purificação de DNA com kit Mini-Prep (Promega, WI, EUA). Após quantificação do DNA em espectrofotômetro, nova reação de PCR foi feita para sequenciamento, com 400 a 500ng de plasmídeo, 6,4pmol de *primer* T7, 4uL de Big Dye, completando-se o volume com água destilada para 20uL. O volume total foi a seguir passado em colunas Edge Bio, evaporado e ressuspendido em 20uL de tampão ABI para sequenciamento.

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

4. Determinação da presença da proteína melanopsina por imunocitoquímica

Dois antisoros foram obtidos de 2 coelhos inoculados com o peptídeo correspondente à seqüência de 15 aminoácidos N-terminal, adicionada de uma cisteína (MSHHSSWRGHHCAPGC), e conjugado com a proteína *keyhole limpet* hemocianina (Covance Research Products, CA, EUA). Esses antisoros foram denominados UF060 e UF061, sendo utilizados sem purificação posterior, na

diluição 1:2000.

As células ZEM 2S foram semeadas em lâminas e, após um período de 24h para adesão, foram fixadas em 4% de paraformaldeído em PBS, a 4°C durante 1 hora. Após lavagem em PBS (10min, 3x), sítios não específicos foram bloqueados com 6% de soro de jumento (Sigma Chem. Co., MO, EUA) em PBS durante 60min. Após lavagens em PBS (10min, 3x), as lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C com o antisoro primário UF061, na ausência ou na presença do peptídeo antigênico nas concentrações de 1mg/mL, 0,1mg/mL, 0,01mg/mL, 0,001mg/mL e 0,0001mg/mL, ou em pré-soro (retirado dos coelhos antes da inoculação). Após três lavagens em PBS, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho, conjugado a Cy3 (feito em jumento, Jackson Laboratories, MA, EUA) na diluição 1:500 em tampão de incubação, durante 1h, protegidas de luz, à temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram novamente lavadas por três vezes em PBS e montadas em meio aquoso Vectashield contendo DAPI (Vector Laboratories, CA, EUA), cobertas com lamínulas e seladas com esmalte transparente. O tampão de incubação utilizado para diluição dos antisoros primários e do anticorpo secundário contém 1% de albumina de soro bovino, 0,25% de carragenina lambda e 0,3% de Triton-X-100 (Sigma Chem. Co., MO, EUA). As imagens foram obtidas em fotomicroscópio de fluorescência Zeiss Axiophot, digitalizadas e coloridas utilizando-se Adobe Photoshop.

5. Ensaios hormonais por PCR quantitativo (tempo real)

Células ZEM 2S foram semeadas (3×10^6 células por frasco de 25cm²) em meio como anteriormente descrito e mantidas em regime de fotoperíodo 12C:12E (luz acesa às 9:00h) durante cinco dias a fim de sincronizar a função celular pelo ciclo claro:escuro. Ao final deste período, as células foram tratadas com endotelina-1 (ET-1) em concentrações crescentes, durante 24h, permanecendo naquele regime de fotoperíodo até o final do experimento.

Para os ensaios de PCR quantitativo, foram preparadas soluções contendo os *primers* (300nM para *Clock*, *Cry 1b*, *Per 1* e melanopsina e 50nM para RNA 18S), sondas (200nM para *Clock*, *Cry 1b*, *Per 1* e melanopsina e 50nM para 18S),

Supermix 2X (KCl 100mM, Tris-HCl 40mM, dNTPs 1,6mM, iTaq DNA polimerase 50U/mL e MgCl₂ 6mM, BioRad, CA, EUA) suplementado com 400uM de dNTPS, 6mM de MgCl₂ e 0,1 U/uL de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, CA, EUA), e H₂O para volume final de 29uL/poço. Essa solução foi aliquotada (cada alíquota suficiente para 3,5 poços) em tubos, e o cDNA de cada amostra dos diferentes tratamentos descritos acima foi adicionado (3,5uL/alíquota) a um tubo. As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa de experimento (30uL/poço). Controles negativos foram incluídos rotineiramente, feitos sem cDNA.

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

A análise dos dados foi feita pela comparação entre número de cópias dos poços controle e experimentais, obtida entre as porções de crescimento geométrico das curvas, passando-se uma reta denominada limiar que cruza essas porções. Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (C_T), foi encontrado o ΔC_T que é a diferença desse valor para o gene de interesse e para o RNA 18S. A seguir, subtraíram-se os valores encontrados para os poços tratados daqueles dos poços controle, obtendo-se o $\Delta\Delta C_T$. Colocando-se esse valor como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) obteve-se o número de vezes que o gene está expresso após o tratamento em questão em relação ao controle. Os resultados foram normalizados, estabelecendo-se o número de vezes em que o gene está expresso no grupo controle de menor expressão, como correspondendo a 100% da expressão. Para determinar os níveis de significância das possíveis diferenças entre os ZTs e aquelas induzidas pelo tratamento hormonal em relação ao controle, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por Tukey. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

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

RNA 18S	<p>Forward primer: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'</p> <p>Backward primer: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'</p> <p>Sonda: 5'-TexasRed-TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC-BlackHole2-3'</p>
Melanopsina	<p>Forward primer: 5'- GCGATTGTCTTCTGCCTCTGA - 3'</p> <p>Backward primer: 5'- AGGGAAGTGAAGTGAACCA - 3'</p> <p>Sonda: 5'-6-FAM-AGTGATTCTTGCTGGACTGAGAGTGAGGCT-BlackHole1-3'</p>
Clock	<p>Forward primer: 5'-GCAACCAGTCTACCCAGCTGAT-3'</p> <p>Backward primer: 5'-CGGTTGTGAATGTGCCTTGT-3'</p> <p>Sonda: 5'-HEX-CTCCAGGCGGCGTTTCCTCTTCA-BlackHole1- 3'</p>
Cry 1b	<p>Forward primer: 5'- CGTCTCTGGAGGAGCTCGG - 3'</p> <p>Backward primer: 5'- TCTCCCCCGGGCCAC - 3'</p> <p>Sonda: 5'-HEX-TTTGAAACAGAGGGACTGTCCACTGCTG- BlackHole1- 3'</p>

Per1	<p>Forward primer:</p> <p>5'- AGCTCAAACCTCTCACAGCCCTT - 3'</p> <p>Backward primer:</p> <p>5'- TCAGAGCTGGCACTCAACAGA - 3'</p> <p>Sonda:</p> <p>5'- Cy5-TCCACCCAGCAGTTCTCTGGCATACA-BlackHole2- 3'</p>
------	--

RESULTADOS

1. Proliferação celular

Nos ensaios com células ZEM 2S mantidas em escuro constante, a fase de crescimento exponencial se iniciou 48 horas após a semeadura. O tempo de duplicação foi de aproximadamente 38,36 horas ($r^2=0,938$; Fig.1; Tabela VII).

A seguir foram feitos ensaios com células ZEM 2S cultivadas em regime 14C:10E, condição em que a fase de crescimento exponencial se iniciou 96 horas após a semeadura. O tempo de duplicação foi de aproximadamente 41,82 horas ($r^2=0,856$; Fig.1 ; Tabela VII).

Já em células mantidas em regime 10C:14E, a fase de crescimento exponencial se iniciou 72 horas após a semeadura e o tempo de duplicação foi de aproximadamente 43,80 horas ($r^2=0,946$; Fig.1; Tabela VII).

Em células ZEM 2S mantidas sob luz constante, a fase de crescimento exponencial se iniciou 120 horas após a semeadura e o tempo de duplicação foi de aproximadamente 71,42 horas ($r^2=0,915$; Fig.1; Tabela VII).

Ao compararmos os tempos de duplicação de células que foram mantidas nos regimes 14C:10E, 10C:14E e escuro constante, observa-se que não houve diferença significativa entre eles. Entretanto, ao compararmos esses tempos de duplicação com o de células mantidas em claro constante, verifica-se que houve um aumento significativo no tempo de duplicação caU S Ado pela luz constante. Cuidados foram tomados de forma a confirmar que o menor número de células era devido à diminuição de proliferação e não à morte celular, contando-se células também no meio de cultura removido e U S Ando-se Trypan Blue para distinguir células viáveis das não viáveis.

Tabela VII. Crescimento de células ZEM-2S, mantidas em 14C:10E por 5 dias, semeadas em densidade inicial de $1,0 \times 10^6$ células/frasco de 25cm^2 e transferidas para escuro constante (EE); 14C:10E; 10C:14E; ou luz constante (LL). Os valores representam a média $\pm$ SEM (EE e 14C:10E n = 6; 10C:14E e LL n=3 frascos).

Tempo (horas)	Número de células ($\times 10^6$) EE	Número de células ($\times 10^6$) 14C:10E	Número de células ($\times 10^6$) 10C:14E	Número de células ($\times 10^6$) LL
Semeadura (0)	1,00	1,00	1,00	1,00
48	$0,943 \pm 0,090$	$0,887 \pm 0,071$	$0,840 \pm 0,043$	$0,690 \pm 0,000$
72	$1,717 \pm 0,041$	$1,637 \pm 0,102$	$1,167 \pm 0,033$	$0,780 \pm 0,031$
96	$2,788 \pm 0,177$	$1,556 \pm 0,096$	$1,783 \pm 0,044$	$0,675 \pm 0,063$
120	$3,718 \pm 0,108$	$2,415 \pm 0,204$	$3,060 \pm 0,013$	$2,060 \pm 0,040$
144	$3,777 \pm 0,057$	$3,690 \pm 0,101$	$3,718 \pm 0,112$	$1,825 \pm 0,052$
168	$5,727 \pm 0,037$	$3,627 \pm 0,146$	$5,00 \pm 0,400$	$2,573 \pm 0,013$
Tempo de duplicação (horas)	38,36	41,82	43,80	71,42
Intervalo de confiança (horas)	47,48 a 32,18	55,46 a 33,56	55,40 a 36,21	127,6 a 49,58

Fig.1. Proliferação de células ZEM 2S (n=3-6 frascos) submetidas a diferentes regimes fotoperiódicos.

2. Determinação da presença de RNAm de melanopsina, *Cry* (experimentos realizados em colaboração com Cássia Borges Lima Bulhões Martins) e de receptores de endotelinas

Determinamos a presença de RNA mensageiro de melanopsina em células embrionárias ZEM 2S por PCR (Fig. 2), o que foi confirmado por sequenciamento (Fig. 3).

Os experimentos de PCR para ETA e ETB em cDNA de células ZEM 2S (Fig. 4) sugeriram a presença de ETA em células ZEM 2S. Não foram identificadas bandas com peso correspondente ao esperado para ETB nessa linhagem celular (Fig. 4). A identidade do receptor ETA em ZEM 2S foi confirmada pelo sequenciamento (Fig. 5).

Determinamos ainda que, em células embrionárias ZEM 2S, os seis genes *Cry* conhecidos são expressos (Fig. 6).

Fig. 2. Fotografia do gel de agarose 1,2% contendo os produtos de PCR resultantes da utilização de diferentes *primers* para melanopsina de *Danio rerio* em cDNA de células embrionárias ZEM 2S. L corresponde ao marcador de peso molecular (DNA ladder, 100bp Promega) e a 13 ausência de cDNA. As setas correspondem respectivamente às bandas com *primers*: IPF175+IPB184, 377pb (linha 3); IPF176+IPB184, 281pb (linha 5) e IPF156+IPB184, 204pb (linha 7).

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

```
TTGGGCCCTCTANATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCT
GCAGAATTGCCCCTTTGGGGTGAAGGTCATGTAATCCCAAGAACAAGACG
TCTGAAGCCCCTCAGGGACATAAGCACTCCAGCCAAAGAAAGGCGGAAG
GCTCCAACCCAGGGAGTAGAGCCACACAACGACCAACACAGCTCCAGCT
TTGCGTCGGCTTACTCTGCTTACTAGGGCGAGAGGCTGAGTTATGGCGA
GACAACGATCAGCAGCGATGGCGGTCAAAGTCATCATGGAGCAGATTCC
AAAGAGGGGCACCGCAGAAGGCGGTANAGCTCGCAAGGGCGCTCGCCAAA
TACCCAGCGCCTGTGTAACTGGCTGCAAAGAACACAGGAGACTGGGTG
ACGGACATTAANAAATCAGCCACAGCTAGGAA
```

Fig. 3. Resultado do sequenciamento de melanopsina em células ZEM 2S, feito a partir de produto amplificado com o par de *primers* IPF175 + IPB184.

Fig. 4. Fotografia do gel de agarose 1,2% contendo os produtos de PCR resultantes da utilização de diferentes *primers* para receptores de endotelina de *Danio rerio* em cDNA de células embrionárias ZEM 2S. As setas correspondem respectivamente às bandas com *primers*: 14F+16B, 284pb (linha 3); 14F+17B, 544pb (linha 5).

Receptor de endotelina ETA, células ZEM 2S, linha 5, peso 544pb

```
GNTGGGCCTCTANAGCATGCTCGACGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCCG
CCCTTTGGCTAAAGCCGTCTTCTGTTTAGTGCTGATCTTTGCTCTCTGCTGGTTCCCTCT
GCATCTCAGCAGACTGCTGAAGAAAATGGGTTTATGTTCCAAACGATGAAAGACGTTGT
GACCTGCTCAACTTCCTGTTGATCATGGGATTATTTTGGTATCAACTTGGCGACTGTGAA
CTCTTG CATCAACCCCATCATCCTCTACTTTGTCAGCAAGAAGTTCAAGAATTGCTTTAA
GTCCTGCTTGTGCTGCTGGTGTACTCTAACAACCAGGTGTCCAGTTCAGGTCCAGTGA
ACGGCACTAGCATTCAAGTGCAAAAACCATGAGCCCCGGCAACCTCTACCCGACGGAG
TCCGGAAATCAGCGACTGAGAAAACGTCTAAAAAANTGCCTTACAAACATTATCCAACAT
TATTANACTAANGCCTTGGCTTGCGCATNAGTGTTAAATTATATCAGTTCAGACAACAT
GGACTGAATATTTAAAGCTCCACACAGTGTTCTAN
```

Fig. 5. Resultado do sequenciamento de receptor ETA em células ZEM 2S, feito a partir de produto amplificado com o par de *primers* 14F + 17B.

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

3. Demonstração da presença da proteína melanopsina

O anticorpo UF061, na diluição de 1:2000, apresenta forte marcação imunocitoquímica das células ZEM 2S (em vermelho Cy3, Fig. 7A), com o núcleo marcado em azul para DAPI (Fig.7B). As duas imagens sobrepostas aparecem na Fig. 7C.

Na presença do peptídeo imunogênico na concentração de 1mg/ml houve total bloqueio da marcação imunocitoquímica por UF061 (Fig.7D), demonstrando assim a especificidade da ligação. Vêem-se os núcleos marcados com DAPI em azul (Fig. 7E) e as duas imagens sobrepostas na Fig. 7F.

Substituição do antisoro por pré-soro (soro retirado do coelho previamente a sua inoculação com o peptídeo) resultou também em ausência de sinal fluorescente (Fig. 7G). Núcleos marcados com DAPI aparecem em azul (Fig. 7H), e as duas imagens sobrepostas na Fig.7I.

Fig. 7. (A) Marcação imunocitoquímica de células embrionárias ZEM 2S com antisoro UF061 1:2000 contra melanopsina de *Danio rerio*, produzido em coelho (Cy3). (B) Mesmo campo de (A) com marcação nuclear por DAPI. (C) Imagens A e B sobrepostas. (D) Ausência de marcação imunocitoquímica de células embrionárias ZEM 2S com antisoro UF061 contra melanopsina de *Danio rerio* quando o anticorpo foi previamente adsorvido com 1mg/ml do peptídeo antigênico. (E) Mesmo campo de (D) com marcação nuclear por DAPI. (F) Imagens D e E sobrepostas. (G) Ausência de marcação imunocitoquímica de células embrionárias ZEM 2S quando o antisoro UF061 foi substituído pelo pré-soro 1:2000. (H) Mesmo campo de (G) com marcação nuclear por DAPI. (I) Imagens G e H sobrepostas.

4. Expressão temporal de melanopsina, *Per1*, *Clock*, *Cry1b* e a influência de endotelina-1

4.1. Melanopsina

Melanopsina não apresentou ritmicidade de expressão em células ZEM 2S submetidas a 5 dias de ciclo 12C:12E, sendo ZT18 o ponto de expressão significativamente maior entre os ZTs controles. Endotelina-1 exerceu um efeito bifásico, sendo que nas menores concentrações utilizadas houve aumento de expressão do fotopigmento, e nas maiores, inibição da mesma. Na concentração 10^{-11} M houve aumento de expressão em todos os ZTs da fase de claro (Fig. 8). Na concentração 10^{-10} M, ET-1 aparentemente estabeleceu uma oscilação ao longo das 24 horas, com crescente expressão na fase de escuro, atingindo um pico em ZT21, e decrescente durante o período de luz, com o mínimo em ZTs 6 e 9 (Fig. 9). Já nas concentrações de 10^{-9} M e 10^{-8} M (Figs. 10 e 11), ET-1 inibiu a expressão de melanopsina, abolindo qualquer oscilação.

Fig. 8. PCR quantitativo para melanopsina de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10^{-11} M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, $\pm$ SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT3 (menor expressão). ^o significativamente diferente dos demais ZTs controles, $p \leq 0,05$; + significativamente diferentes dos ZTs tratados 12, 15, 18 e 21, $0,001 < p < 0,01$; * significativamente diferentes dos respectivos controles, $0,001 < p < 0,01$.

Fig. 9. PCR quantitativo para melanopsina de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10⁻¹⁰M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, ± SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT3 (menor expressão). **o** significativamente diferente dos demais ZTs controles, $p \leq 0,05$; **+** significativamente diferente dos demais ZTs tratados, $0,001 < p < 0,01$; ***** significativamente diferentes dos respectivos controles, $0,001 < p < 0,01$.

Fig. 10. PCR quantitativo para melanopsina de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10⁻⁹M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, ± SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT3 (menor expressão). ^o significativamente diferente dos demais ZTs controles, p ≤ 0,05; * significativamente diferentes dos respectivos controles, 0,001 < p < 0,01.

Fig. 11. PCR quantitativo para melanopsina de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10⁻⁸M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, $\pm$ SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT3 (menor expressão). ^o significativamente diferente dos demais ZTs controles, $p \leq 0,05$; * significativamente diferentes dos respectivos controles, $0,001 < p < 0,05$.

4.2. *Clock*

A expressão do gene *Clock* é rítmica em regime de fotoperíodo 12C:12E, com valores significativamente maiores em ZT12 a ZT21 do que em ZT0, ZT3 e ZT9, indicando um aumento de expressão coincidente com o período de escuro (Fig. 12). Foi observado um pico de expressão em ZT6, durante a fase de luz. ET-1 nas concentrações de 10^{-11} e 10^{-10} M aboliu o ritmo de expressão de *Clock*, e inibiu o pico de expressão em ZT6. Expressão de *Clock* permaneceu elevada somente em ZT18 (Figs. 12, 13). Nas maiores concentrações (10^{-9} M e 10^{-8} M), a inibição ocorreu em todos os ZTs, abolindo completamente o ritmo e atenuando qualquer variação previamente observada entre os ZTs (Figs. 14 e 15).

Fig. 12. PCR quantitativo para *Clock* de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10^{-11} M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, $\pm$ SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT3 (menor expressão). ^o significativamente diferente dos demais ZTs controles, $p < 0,001$, exceto ZTs 18 e 21; [#] significativamente diferentes dos ZTs controles 0, 3 e 9, $0,001 < p < 0,05$; ⁺ significativamente diferente dos demais ZTs tratados, $0,001 < p < 0,05$; ^{*} significativamente diferentes dos respectivos controles, $0,001 < p < 0,05$.

Fig. 13. PCR quantitativo para *Clock* de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10⁻¹⁰M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, ± SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT3 (menor expressão). ^o significativamente diferente dos demais ZTs controles, p<0,001, exceto ZTs 18 e 21; [#] significativamente diferentes dos ZTs controles 0, 3 e 9, 0,001<p<0,05; ⁺ significativamente diferente dos demais ZTs tratados, 0,001<p<0,05; ^{*} significativamente diferente do respectivo controle, p<0,001.

Fig. 14. PCR quantitativo para *Clock* de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10⁻⁹M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, $\pm$ SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT3 (menor expressão). ^o significativamente diferente dos demais ZTs controles, $p < 0,001$, exceto ZTs 18 e 21; [#] significativamente diferentes dos ZTs controles 0, 3 e 9, $0,001 < p < 0,05$; * significativamente diferentes dos respectivos controles, $0,001 < p < 0,05$.

Fig. 15. PCR quantitativo para *Clock* de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10⁻⁸M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, $\pm$ SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT3 (menor expressão). ^o significativamente diferente dos demais ZTs controles, $p < 0,001$, exceto ZTs 18 e 21; [#] significativamente diferentes dos ZTs controles 0, 3 e 9, $0,001 < p < 0,05$; ^{*} significativamente diferentes dos respectivos controles, $0,001 < p < 0,05$.

4.3. *Per1*

A expressão do gene *Per1* é rítmica em regime fotoperíodo 12C:12E, com valores significativamente maiores nos ZTs 21, 0, 3, 6 e 9 do que nos ZTs 12, 15 e 18, indicando um aumento de expressão na fase de claro (Fig. 16). Vale mencionar que já em ZT21, há um aumento significativo antecipatório da fase de luz. Nas concentrações de 10^{-11} e 10^{-10} M, ET-1 não alterou o período ou a amplitude desse ritmo (Figs. 16 e 17). A ação evidente de ET-1 foi a inibição da expressão de *Per1* na fase de luz (ZT0, ZT3, ZT6 e ZT9), e também em ZT21 (fase de escuro) nas maiores concentrações (10^{-9} M e 10^{-8} M) não afetando o período da oscilação, mas diminuindo marcadamente sua amplitude (Figs. 18 e 19).

Fig. 16. PCR quantitativo para *Per1* de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10^{-11} M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, $\pm$ SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT15 (menor expressão). # e + significativamente diferentes dos ZTs 12, 15 e 18, $0,001 < p < 0,01$.

Fig. 17. PCR quantitativo para *Per1* de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10⁻¹⁰M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, ± SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT15 (menor expressão). # e + significativamente diferentes dos ZTs 12, 15 e 18, 0,001<p<0,01.

Fig. 18. PCR quantitativo para *Per1* de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10⁻⁹M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, ± SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT15 (menor expressão). # e + significativamente diferentes dos ZTs 12, 15 e 18, 0,001<p<0,01; * significativamente diferentes dos respectivos controles, 0,001<p<0,01.

Fig. 19. PCR quantitativo para *Per1* de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10⁻⁸M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, ± SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT15 (menor expressão). # e + significativamente diferentes dos ZTs 12, 15 e 18, 0,001<p<0,01; * significativamente diferentes dos respectivos controles, 0,001<p<0,01.

4.4. *Cry1b*

O padrão de expressão do gene *Cry1b* apresentou valores significativamente maiores nos ZTs 21, 0, 3, 6 e 9 do que nos ZTs 12, 15 e 18, indicando um aumento de expressão na fase de claro (Fig. 20). Assim, coincidentemente com o observado para o gene *Per1*, a expressão de *Cry1b* foi rítmica durante o ciclo claro:escuro, com aumento na fase de claro e diminuição na fase de escuro. Novamente a ET-1 apresentou um efeito bifásico sobre a expressão deste gene, aumentando a mesma em ZT0, ZT3 e ZT6 (fase de luz), na concentração de 10^{-11} M (Fig.20), e em ZT6 e ZT9 na concentração 10^{-10} M (Fig. 21) sem, no entanto, alterar o período ou a amplitude do ritmo. Por outro lado, durante toda a fase de luz houve inibição da expressão de *Cry1b* na presença de ET-1 10^{-9} e 10^{-8} M (Figs. 22 e 23), diminuindo a amplitude observada nas células controle. A expressão de *Cry1b* permaneceu elevada somente nos ZTs 0, 3, 6 e 9, ou 3, 6 e 9, respectivamente, em comparação com os outros ZTs.

Fig. 20. PCR quantitativo para *Cry1b* de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10^{-11} M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, $\pm$ SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT18 (menor expressão). # e + significativamente diferentes dos ZTs 12, 15 e 18, $0,001 < p < 0,01$; * significativamente diferentes dos respectivos controles, $0,001 < p < 0,05$.

Fig. 21. PCR quantitativo para *Cry1b* de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10^{-10} M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, $\pm$ SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT18 (menor expressão). # e + significativamente diferentes dos ZTs 12, 15 e 18, $0,001 < p < 0,01$; * significativamente diferentes dos respectivos controles, $0,001 < p < 0,05$.

Fig. 22. PCR quantitativo para *Cry1b* de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10⁻⁹M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, ± SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT18 (menor expressão). # significativamente diferentes dos ZTs controles 12, 15 e 18, 0,001<p<0,01; + significativamente diferentes dos ZTs tratados 12, 15, 18 e 21, 0,001<p<0,05; * significativamente diferentes dos respectivos controles, 0,001<p<0,01.

Fig. 23. PCR quantitativo para *Cry1b* de células embrionárias ZEM 2S de *Danio rerio* tratadas com ET-1 10⁻⁸M durante 24h. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E durante 5 dias antes do tratamento, assim como durante todo o período experimental. Valores são a média, ± SEM (n=3-4 frascos), em porcentagem relativa ao valor em ZT18 (menor expressão). # significativamente diferentes dos ZTs controles 12, 15 e 18, 0,001<p<0,01; + significativamente diferentes dos ZTs tratados 12, 15, 18, 21 e 0, 0,001<p<0,05; * significativamente diferentes dos respectivos controles, 0,001<p<0,01.

DISCUSSÃO

O teleósteo *Danio rerio* é um modelo ideal para o estudo da regulação circadiana e respostas à luz em tecidos periféricos. Relógios periféricos e células em cultura de *Drosophila* e de *Danio rerio* são diretamente sensíveis à luz (Plautz *et al.*, 1997; Vallone *et al.*, 2004; Whitmore *et al.*, 2000), em contraste com o que é observado em mamíferos, nos quais uma retina funcional para percepção de luz é essencial (Yoo *et al.*, 2004). Melanopsina é o fotopigmento presente em uma subpopulação de células ganglionares responsáveis por ajustar o relógio ao ciclo claro:escuro (Panda *et al.*, 2002, 2003; Provencio *et al.*, 1998, 2002).

Neste trabalho, demonstramos que a linhagem ZEM 2S é fotossensível, sua proliferação sendo inibida pela luz. O mecanismo pelo qual a luz diminui a taxa de proliferação celular ainda permanece pouco claro. Células de *Danio rerio* entram na fase S da mitose em resposta à luz, com pico ao final da fotofase (Dekens *et al.*, 2003). Em células GEM 81 de eritroforoma do teleósteo *Carassius auratus*, a luz também inibe a mitose, sendo a duração da fotofase o fator importante (Im *et al.*, 2006). No entanto, em retina de outro teleósteo *Haplochromis burtoni*, a maior porcentagem de células em fase S foi encontrada na fase de escuro do ciclo (Chiu *et al.*, 1995). É provável que, em células ZEM 2S, semelhantemente ao observado nas linhagens GEM 81 de *Carassius* e Z3 também de *Danio*, a luz cause um retardo na mitose.

O sistema circadiano em fígado de camundongo em regeneração restringe a entrada dos hepatócitos em mitose a certas horas do dia (Matsuo *et al.*, 2003). Nessas células, mecanismos oscilatórios intrínsecos regulam os eventos do ciclo celular através de genes regulados por relógio, tais como *Wee1*, que é intensamente expresso quando *Per1* encontra-se elevado, suprimindo a entrada na fase M. Os genes do relógio em células Z3 oscilam estocasticamente, mas são sincronizados pela luz (Carr & Whitmore, 2005).

Como mencionado, o tempo de duplicação das células ZEM 2S é aumentado pela luz, sugerindo a funcionalidade de um fotopigmento, cuja cascata de sinalização direta ou indiretamente afetaria o ciclo celular, talvez através de *Wee1*. De fato, determinamos que a linhagem ZEM 2S de células embrionárias de *Danio rerio* expressa tanto RNAm como a proteína de melanopsina, fotopigmento acoplado a proteína G, cuja ativação leva a aumento de IP₃ e mobilização de cálcio (Isoldi *et al.*, 2005; Kumbalasiri *et al.*, 2006), via que sabidamente modula o ciclo celular (Berridge *et al.*, 2000; Bootman *et al.*, 1992).

Os principais componentes do relógio molecular mantêm sua ritmicidade no NSQ e em tecidos periféricos, porém alguns deles diferem em sua ritmicidade intrínseca entre os tecidos. Por exemplo, RNAm de *Clock* cicla em tecidos periféricos, mas é constitutivamente expresso no NSQ em mamíferos (Lowrey & Takahashi, 2004). Transcritos dos genes do relógio são expressos ritmicamente em todos os tecidos estudados de *Danio rerio*, e RNAm de *Clock* tem seu pico no início da noite e sua concentração mais baixa ao amanhecer (Shearman *et al.*, 1999). Na linhagem ZEM 2S, este padrão de expressão foi observado em fotoperíodo 12C:12E. O gene *Clock* foi expresso de maneira cíclica ao longo de 24h, aumentando no início da fase escura e decrescendo nas primeiras horas da fase de luz.

Os genes *Per* são os únicos genes de relógio induzíveis por forte estímulo luminoso. Assim, eles podem ser considerados como entrada para o sinal fótico no mecanismo molecular do relógio do NSQ (Albrecht *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1997). O fotoperíodo afeta o ritmo de expressão do gene *Per1* e a produção de proteína PER1 no NSQ de ratos (Messenger *et al.*, 1999; Sumová *et al.*, 2002), hamsters (Carr *et al.*, 2003; Tournier *et al.*, 2003) e camundongos (Steinlechner *et al.*, 2002).

Yamasaki e colaboradores (2000), através de culturas de tecidos (NSQ, músculo esquelético, fígado, e pulmão) mantidas em escuro constante, mas originárias de animais mantidos em fotoperíodo 12C:12E, constataram que o ritmo de expressão de *Per1* permaneceu por mais de 32 dias no NSQ em cultura. Os tecidos periféricos apresentaram ritmo com atraso de fase de 7 a 11 horas em relação ao NSQ, o que se repete *in vivo* (Zylka *et al.*, 1998). Os ritmos observados

nos tecidos periféricos, após 2 ou 7 ciclos em cultura eram atenuados, porém puderam ser re-estabelecidos após sincronização por troca de meio.

Apesar dos três genes *Per* de camundongo oscilarem de forma circadiana, eles têm um pico durante o dia, enquanto em *Drosophila* isso ocorre durante a noite. Neste animal a luz não tem efeito direto sobre *Per*, porém nos camundongos, pulsos de luz aumentam os níveis de RNAm de *Per1* e *Per2*, mas não de *Per3* (Albrecht *et al.*, 1997; Field *et al.*, 2000; Shearman *et al.*, 2000; Takumi *et al.*, 1998; Zylka *et al.*, 1998).

Em *Xenopus* foi constatado que o RNAm de *xPer2* é regulado por luz enquanto RNAm de *xPer1* é regulado de forma circadiana. Também difere o fato de que *Per1* e *Per3* são rítmicos, e *Per2* é estimulado pela luz, semelhantemente à retina de *Xenopus* (Zhuang *et al.*, 2000), enquanto em mamíferos os 3 genes *Per* são rítmicos em condições constantes, e *Per 1* e *2* são estimulados por luz.

Em células embrionárias Z3 de *Danio rerio*, *Per1* e *Per2* são capazes de antecipar a fase de luz, sendo que a expressão de ambos é aumentada antes de a luz acender (Pando *et al.*, 2001). Um quarto gene *Per* foi identificado em larvas e células em cultura deste teleósteo, chamado *zfPer4*. A expressão deste gene é reprimida por luz (Vallone *et al.*, 2004). Nas células embrionárias ZEM 2S, a expressão do gene *Per1* foi cíclica em fotoperíodo, aumentando na fase de claro e diminuindo significativamente durante a fase de escuro. E, semelhantemente à Z3, a linhagem ZEM 2S também prevê o início da fotofase.

Pelo menos seis genes *Cry* estão presentes em *Danio rerio*. Quatro deles, *Cry1a*, *Cry1b*, *Cry2a* e *Cry2b*, apresentam seqüência muito semelhante à de mamíferos (*Cry1*). As proteínas codificadas por esses quatro genes inibem a transcrição mediada por CLOCK/BMAL1, sugerindo uma função no relógio similar à descrita para homólogos de mamíferos. Os outros dois *Crys*, *zCry3* e *zCry4*, apresentam uma seqüência mais diversificada e não inibem a transcrição. Possivelmente desenvolveram funções diferentes (Kobayashi *et al.*, 2000).

O padrão de expressão dos genes *Cry* foi estudado em células embrionárias da linhagem Z3 de *Danio rerio*. Foi constatado que tanto *Cry1b* quanto *Cry3* são expressos em células em cultura. *Cry1a* e *Cry2b* aumentam a expressão em

fotoperíodo claro:escuro, mas o nível diminui muito em células mantidas em cultura ou em células mantidas em fotoperíodo claro:escuro, e posteriormente submetidas a escuro constante. *Cry2a* e *Cry4* aumentam a expressão em células sincronizadas por claro:escuro ou escuro constante, mas apresentam níveis muito baixos em condições de cultura (Cermakian *et al.*, 2002).

O padrão de expressão do gene *Cry1b* na linhagem ZEM 2S foi cíclico em células submetidas ao ciclo claro:escuro. A expressão foi mais alta durante a fase de luz, com pico em ZT3, após três horas de luz acesa. Durante a fase de escuro a expressão diminui drasticamente, aumentando novamente no último horário, antecipando a fotofase, semelhantemente ao gene *Per1*.

O fotopigmento responsável pelas respostas à luz em tecidos e células de *Danio rerio* ainda não foi estabelecido. Alguns prováveis candidatos como a melanopsina (Bellingham *et al.*, 2002), TMT (*teleost multiple tissue*) (Moutsaki *et al.*, 2003) e criptocromos (*Crys*) (Cermakian *et al.*, 2002) já foram sugeridos, porém não houve evidência experimental que comprovasse esta função satisfatoriamente.

Em nosso estudo, determinamos a presença de melanopsina em células embrionárias ZEM 2S, e investigamos o padrão de expressão e sua modulação por endotelina-1. Sakamoto e colaboradores (2005) demonstraram que os níveis de RNAm de melanopsina são regulados por dopamina em retina de ratos, através de receptores D2. Na retina de ratos albinos Wistar (Hannibal, 2006) e de hamsters dourados albinos (dados não publicados de nosso laboratório), a expressão da melanopsina é fortemente inibida pela luz, representando uma adaptação do fotorreceptor em células ganglionares na retina (ipRGCs), durante mudanças de luminosidade do ambiente.

Na retina e glândula pineal de galinha, RNAm de melanopsina (*Opn4*) é regulado de maneira circadiana, aumentando no final da noite subjetiva (Bailey & Cassone, 2004). Na retina de galinha, o pico de expressão foi observado durante o dia no epitélio pigmentar da retina e na camada nuclear interna, mas nos fotorreceptores o pico ocorreu durante a noite (Chaurasia *et al.*, 2005).

Em retina de ratos com cones e bastonetes intactos, os níveis de RNAm de melanopsina foram rítmicos em ciclo claro:escuro e em escuro constante. Após a

degeneração dos mesmos, a expressão foi drasticamente reduzida (<90%), e perdeu a ritmicidade, sugerindo uma regulação destes fotorreceptores sobre a expressão da melanopsina (Sakamoto *et al.*, 2004). Nas células embrionárias ZEM 2S, a expressão da melanopsina não apresentou ritmicidade, semelhantemente ao observado em retina de camundongos (dados não publicados de nosso laboratório).

A expressão dos quatro genes estudados, melanopsina, *Clock*, *Per1* e *Cry1b*, foi modulada por ET-1. Uma das possíveis explicações para estes efeitos seria a utilização por esse hormônio de diversas vias de sinalização e a regulação destes genes por essas vias. A sarafotoxina, agonista dos receptores de ET, atua em células GEM-81 de *Carassius auratus* através das vias da fosfolipase C (PLC), proteínas quinase C (PKC) e A (PKA) e fosfolipase A2 (PLA2) (dados não publicados de nosso laboratório). É provável que estas vias estejam envolvidas nas respostas encontradas em *Danio rerio* pelo tratamento com ET-1. Em células ZEM 2S, nós demonstramos a expressão de receptores de endotelina do subtipo ETA.

A ligação de ET-1 ao receptor ETA em miócito cardíaco desencadeia a cascata de sinalização intracelular que envolve a fosfolipase C, a qual forma inositol trifosfato e diacilglicerol, por fim ativando a proteína quinase C (PKC) (Miyachi & Masaki, 1999; Sugden & Bogoyevitch, 1995). Ainda em miócitos cardíacos, ET-1 induz a expressão da proteína Homer1 α através da via da MAPK (Kawamoto *et al.*, 2006). Também gera hipertrofia através da cascata ERK1/2 (Kennedy *et al.*, 2006), com aumento de ERK1, ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase*), c-Fos, c-Jun (Irukayama-Tomobe *et al.*, 2004) e MAPK (Chen *et al.*, 2006).

Assim como em miócitos, a ativação de ERK e CaM quinase II δ (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II δ) exerce importante função na expressão de *mPer1* através do motivo 5'- GAGGGG - 3' no promotor deste gene, localizado entre -1735 a -1721, por estimulação fótica (Nomura *et al.*, 2003). Nesta mesma região também está contido o elemento responsivo a MEKK, uma quinase à jusante das três maiores MAPKs: ERK, JNK e p38MAPK (Wood & Russo, 2001). Travnickova-Bendova e colaboradores (2002) demonstraram o envolvimento do sítio de ligação do elemento de resposta ao AMPc (CRE), nas vias do AMPc e da MAPK na expressão de *mPer1*. Utilizando a região do promotor, foi observado que um

estímulo combinado com as vias da PKA e MAPK aumentava a atividade do promotor deste gene de maneira CREB-dependente. Porém, em células NIH3T3 não houve resposta a PKA, indicando que a via de sinalização que induz a expressão do gene *mPer1* é dependente do tipo celular (Nomura *et al.*, 2006). A expressão de *mPer1* induzida pelo hormônio GnRH em uma linhagem celular imortalizada de gonadotropos (L β T2) requer a ativação de PKC e ERK1/2 (Olcese *et al.*, 2006). Em células Rat-1, ET estimula *Per1* via receptor ETA acoplado à proteína Gq/11 (Takashima *et al.*, 2006), mobilizando Ca²⁺ dos estoques intracelulares através de IP₃ (Creba *et al.*, 1983; Streb *et al.*, 1983; Taylor *et al.*, 1991; Singer *et al.*, 1997; Werry *et al.*, 2003).

Todos os promotores dos três genes *Per* contêm *E-boxes* e respondem ao heterodímero CLOCK/BMAL1, porém, apenas os promotores dos genes *mPer1* e *mPer2* contêm CREs (*cAMP-responsive elements*) (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002). O promotor de *mPer1* é responsivo a ativação sinérgica de AMPc e MAPK, uma resposta fisiológica que requer integridade de CRE (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002). Estes dados indicam que CREB é um pivô do final da cascata de sinalização que regula os genes *mPer*.

O fator de transcrição CREB liga-se especificamente a CRE e ativa a transcrição de genes quando fosforilado por PKA (Haus-Seuffert & Meisterernst, 2000). CREB também pode funcionar como mediador da indução da expressão de *mPer1* por Ca²⁺. Além da fosforilação por PKA, CREB pode ser fosforilado por CAMKII/IV (Hardingham & Bading, 1998), e o promotor do gene *mPer1* contém quatro CREs (Yamaguchi *et al.*, 2000).

O envolvimento da via de sinalização dependente da MAPK no reinício do ciclo já era conhecido em NSQ (Obrietan *et al.*, 1998). Akashi e Nishida (2000) demonstraram que a expressão de *mPer1* provocada pelo tratamento com ésteres de forbol em fibroblastos NIH-3T3 é dependente de MAPK, e a ativação sustentada da cascata da MAPK gera a indução da expressão de genes circadianos.

Em células granulares do cerebelo de camundongos em cultura, a expressão de *mPer1* é estimulada por Ca²⁺ e AMPc, os quais também devem ser responsáveis pela indução de *Per1* em células em cultura (Akiyama *et al.*, 2001).

Nas células ZEM 2S, houve inibição da expressão do gene *Per1* pela ET-1 em toda a fase de claro nas maiores concentrações utilizadas (10^{-9} M e 10^{-8} M). Em células Rat-1, no entanto, ET-1 causa rápida síntese de PER1 e PER2, e translocação dessas proteínas para o núcleo (Yagita *et al.*, 2001). As vias de sinalização que podem ser mobilizadas pela ligação da ET-1 ao receptor ETA, tais como as vias da MAPK, da PKC e ERK1/2, são as mesmas que estimulam a expressão do gene *Per1* em mamíferos. É possível que essas vias de sinalização estimulem também a expressão de genes inibitórios de *Per1*, o que geraria o efeito observado nas células ZEM 2S.

A transcrição de CLK/CYC em *Drosophila* é dependente das vias de sinalização dos nucleotídeos cíclicos, do Ca^{2+} e da cascata da Ras/MAPK (Weber *et al.*, 2006), semelhantemente aos relógios circadianos de mamíferos. A ativação de CLOCK/BMAL-1 é independente de CRE (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002). Nas células ZEM 2S, ET-1 inibiu a expressão do gene *Clock* em todas as concentrações utilizadas, sendo que nas maiores concentrações (10^{-9} M e 10^{-8} M), a inibição também ocorreu em toda a fase de escuro, abolindo completamente o ritmo.

Em mamíferos, um pulso de luz durante a noite subjetiva gera uma potente indução da expressão dos genes *c-fos*, *fos-B* e *jun-B* no NSQ (Kornhauser *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 1998). C-Fos é uma oncoproteína, a qual se associa à proteínas Jun para formar o complexo AP-1 (*activator protein 1*). Este complexo induz a expressão de muitos genes, ligando-se a sequências nos promotores das quais o consenso é TGA(C/G)TCA (Halazonetis, *et al.*, 1988). A indução da expressão por c-Fos parece estar envolvida na mudança de fase acarretada pela luz no relógio circadiano (Kornhauser *et al.*, 1996), como é o caso do gene *zCry1a* (Hirayama *et al.*, 2005). Em células embrionárias Z3 de *Danio rerio*, a indução de expressão dos genes de relógio envolve a via da MAPK (Cermakian *et al.*, 2002). Nas células ZEM 2S, ET-1 apresentou um efeito bifásico sobre a expressão do gene *Cry1b*, aumentando a mesma em ZT0, ZT3 e ZT6 (fase de luz), na concentração 10^{-11} M, e em ZT6 e ZT9 na concentração 10^{-10} M. Durante toda a fase de luz houve inibição da expressão nas maiores concentrações utilizadas. A estimulação da expressão induzida pela ET-1 pode ter sido causada por ativação de *c-fos* e *c-jun* com posterior

formação do complexo AP-1, o qual induz a expressão de vários genes incluindo os de relógio. Assim como nas células Z3, a via da MAPK também pode ter sido utilizada nesta resposta. Os efeitos inibitórios observados nas maiores concentrações de ET-1, assim como citado para o gene *Per1*, podem ter desencadeado aumento de expressão de genes inibitórios do gene *Cry1b*.

Atualmente pouco se sabe sobre a regulação da expressão da melanopsina por hormônios. Nas células ZEM 2S, observamos a modulação deste gene por ET-1, sendo que nas menores concentrações utilizadas houve aumento de expressão do fotopigmento, e nas maiores, inibição da mesma. Alguns laboratórios apontam a expressão cíclica da melanopsina e sua modulação pelo ciclo claro:escuro em retina de ratos (Sakamoto *et al.*, 2005), além da sua inibição pela luz constante em células ganglionares da retina de mamíferos albinos (ratos, Hannibal, 2006; hamsters, dados não publicados de nosso laboratório). No entanto, em camundongos, mesmo albinos, a expressão de melanopsina permanece inalterada (dados não publicados de nosso laboratório), tanto em escuro ou luz constante, como em ciclo claro:escuro. Os mecanismos responsáveis por esses efeitos ainda permanecem em estudo. Pelo fato da resposta da melanopsina à ET-1 ter sido semelhante a do gene *Cry1b* principalmente, é provável que as vias de sinalização utilizadas tenham sido as mesmas, assim como a explicação para a ação bifásica do hormônio.

O presente estudo dá abertura para novas investigações, as quais podem contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares de relógios periféricos.

RESUMO

Relógios biológicos são marcapassos endógenos presentes tanto em eucariotos quanto em procariotos. Relógios diferentes possuem períodos distintos, e aqueles que se aproximam de 24h de oscilação são chamados circadianos. Em mamíferos, o primeiro relógio circadiano identificado situa-se no núcleo supraquiasmático, localizado no hipotálamo. O funcionamento do relógio circadiano envolve mecanismos de retroalimentação positiva e negativa, em geral tendo início com a ativação dos genes *Per* e *Cry* por CLOCK e BMAL1. Atualmente sabe-se que os relógios estão presentes em áreas do cérebro fora do núcleo supraquiasmático e em muitos tecidos periféricos. Em *Drosophila* e *Danio rerio*, os osciladores periféricos podem ser sincronizados diretamente por luz, enquanto em mamíferos o reinício de fase dos mesmos parece ser controlado por sinais regulados pelo marcapasso do núcleo supraquiasmático.

Uma nova opsina, denominada melanopsina, foi recentemente descoberta na retina de todos os vertebrados estudados, em uma subpopulação de células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis. Ela é responsável pela captura de luz e envio dessa informação para o núcleo supraquiasmático.

A endotelina (ET) é um peptídeo vasoconstritor composto por 21 resíduos de aminoácidos. Existem três isoformas endógenas de ETs, designadas ET-1, ET-2 e ET-3. Três tipos de receptores para endotelinas já foram clonados, sendo eles designados ETA, ETB e ETC. Todos pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G.

Órgãos, tecidos e células de *Danio rerio* constituem um excelente modelo para o estudo dos genes de relógio e de ritmos *in vitro*. Em células embrionárias ZEM 2S deste teleósteo, constatamos a presença de melanopsina, do receptor ETA para endotelina, e dos seis genes *Cry* através de PCR. A presença de melanopsina também foi confirmada por imunocitoquímica.

Foram realizadas curvas de crescimento em células ZEM 2S previamente mantidas por cinco dias em regime de 14C:10E (luz acesa às 9:00h).

No 6º. dia, as células foram transferidas para as seguintes condições: escuro constante; 14C:10E; 10C:14E e luz constante. Houve inibição da proliferação celular por luz.

O padrão de expressão temporal dos genes *Per1*, *Cry1b*, *Clock* e da melanopsina foi estudado, assim como sua modulação por ET-1. Células ZEM 2S foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E (luz acesa às 9:00h) durante cinco dias, após o que foram tratadas com ET-1 nas concentrações 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M e 10^{-8} M, durante 24h. O RNA extraído a cada 3h foi submetido a RT-PCR para posterior análise por PCR quantitativo. RNA ribossômico 18S foi utilizado como normalizador do experimento.

Melanopsina não apresentou ritmicidade de expressão em fotoperíodo 12C:12E. ET-1 exerceu efeito bifásico, aumentando a expressão nas menores concentrações de hormônio utilizadas e diminuindo nas maiores. Na concentração 10^{-10} M, ET-1 aparentemente estabeleceu uma oscilação ao longo das 24 horas, com crescente expressão na fase de escuro, atingindo um pico em ZT21 e decrescente durante o período de luz, com o mínimo em ZTs 6 e 9.

A expressão do gene *Clock* é rítmica em regime fotoperíodo 12C:12E, com valores significativamente maiores em ZT12 a ZT21 do que em ZT0, ZT3 e ZT9, indicando um aumento de expressão coincidente com o período de escuro. Foi observado um pico de expressão em ZT6, durante a fase de luz. ET-1 nas concentrações de 10^{-11} e 10^{-10} M aboliu o ritmo de expressão de *Clock*, e inibiu o pico de expressão em ZT6. Expressão de *Clock* permaneceu elevada somente em ZT18. Nas maiores concentrações (10^{-9} M e 10^{-8} M), a inibição ocorreu em todos os ZTs, abolindo completamente o ritmo e atenuando qualquer variação previamente observada entre os ZTs.

A expressão do gene *Per1* é rítmica em regime fotoperíodo 12C:12E, com valores significativamente maiores nos ZTs 21, 0, 3, 6 e 9 do que nos ZTs 12, 15 e 18, indicando um aumento de expressão na fase de claro. Vale mencionar que já em ZT21, há um aumento significativo antecipatório da fase de luz. Nas concentrações de 10^{-11} e 10^{-10} M, ET-1 não alterou o período ou a amplitude desse ritmo. A ação evidente de ET-1 foi a inibição da expressão de *Per1* na fase de luz (ZT0, ZT3, ZT6

e ZT9), e também em ZT21 (fase de escuro) nas maiores concentrações (10^{-9} M e 10^{-8} M) não afetando o período da oscilação, mas diminuindo marcadamente sua amplitude.

A expressão de *Cry1b* foi rítmica durante o ciclo claro:escuro, com aumento na fase de claro e diminuição na fase de escuro. Novamente a ET-1 apresentou um efeito bifásico sobre a expressão deste gene, aumentando a mesma durante a fase de luz na concentração de 10^{-11} M, e em ZT6 e ZT9 na concentração 10^{-10} M. No entanto, não alterou o período ou a amplitude do ritmo. Por outro lado, durante toda a fase de luz houve inibição deste gene na presença de ET-1 10^{-9} e 10^{-8} M, diminuindo a amplitude observada nas células controle.

ABSTRACT

Biological clocks are endogenous timekeepers that are present both in eukaryotic as in prokaryotic organisms. Different clocks have different periods, and those that have about 24h of oscillation are called circadian clocks. In mammals, the first identified circadian clock is located in the suprachiasmatic nucleus, in the hypothalamus. It is now well known that clocks are present in brain regions other than the suprachiasmatic nucleus and in many peripheral tissues. In *Drosophila* and *Danio rerio*, peripheral oscillators can be synchronized directly by light, while in mammals the reset of the phase seems to be controlled by signals regulated by the suprachiasmatic timekeepers. The maintenance of the circadian clock is governed by positive and negative feedback loops, in general starting with the activation of *Per* and *Cry* genes by CLOCK and BMAL1.

A new opsin called melanopsin, was recently discovered in the retina of all studied vertebrates, in a subset of intrinsically photosensitive ganglion cells. This photopigment is responsible for capturing light and sending this information to the suprachiasmatic nucleus.

Endothelin (ET) is a 21-amino acid residue vasoconstrictor peptide. There are three endogenous isoforms of ETs, ET1, ET2 and ET3. Three subtypes of endothelin receptors have already been cloned: ETA, ETB and ETC, all members of the family of G protein -coupled receptors.

Organs, tissues and cells of *Danio rerio* constitute an excellent model for the study of clock genes and rhythms *in vitro*. In ZEM 2S embryonic cells of this teleost, we demonstrated the presence of melanopsin, the endothelin receptor ETA, and the six *Cry* genes by PCR. The presence of melanopsin was also confirmed by immunohistochemistry.

ZEM 2S cells previously kept for five days in 14L:10D (lights on 9:00am) were

transferred in the sixth day to the following conditions: constant darkness, 14L:10D, 10L:14D and constant light, and growth curves were determined. ZEM 2S showed inhibition of proliferation by light.

The temporal expression pattern of the genes *Per1*, *Cry1b*, *Clock* and of melanopsin and their modulation by ET-1 were studied. ZEM 2S cells were kept in 12D:12L photoperiod (lights on 9:00am) for five days, and then treated with 10^{-11} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M and 10^{-8} M ET-1, for 24h. RNA extracted every 3 hours was submitted to RT-PCR for subsequent analysis by Real Time-PCR. 18S ribosomal RNA was used to normalize the results.

Melanopsin did not show rhythmicity of expression in 12D:12L photoperiod. ET-1 exhibited a biphasic effect, increasing the expression in the lower concentrations, and reducing at the higher concentrations. At 10^{-10} M, ET-1 apparently established an oscillation along the 24h-period, with increasing expression in the dark phase, reaching a peak at ZT2, and decreasing during the light phase, with the minimum at ZT6 and 9.

The expression of *Clock* gene was rhythmic in 12D:12L photoperiod, with significant higher values in ZT12 to ZT21 than ZT0, ZT3 e ZT9, indicating an increase of expression coincident with the dark period. A peak of expression was observed at ZT6, during the light phase. At 10^{-11} and 10^{-10} M, ET-1 abolished the rhythm of expression of *Clock*, and inhibited the peak of expression at ZT6. Expression of *Clock* remained high only at ZT18. At the higher concentrations (10^{-9} M e 10^{-8} M), the inhibition occurred at all ZTs, completely abolishing the rhythm and attenuating any variation previously observed among ZTs.

The expression of *Per1* gene was rhythmic in 12D:12L photoperiod, with significant higher values at ZTs 21, 0, 3, 6 and 9 than at ZTs 12, 15 and 18, indicating an increase of expression in the light phase. It is important to mention that at ZT21 there was already a significant increase, anticipatory of the light phase. At 10^{-11} e 10^{-10} M, ET-1 did not alter neither the period nor the amplitude of this rhythm. The evident action of ET-1 was the inhibition of *Per1* expression in the light phase (ZT0, ZT3, ZT6 e ZT9), and also at ZT21 (dark phase), at the higher concentrations (10^{-9} M e 10^{-8} M), with no change in the oscillation period, but markedly reducing its

amplitude.

The expression of *Cry1b* was rhythmic during the light:dark cycle, with increase in the light phase and reduction in the dark phase. Again, ET-1 showed a biphasic effect on this gene expression, increasing it during the light phase at the concentration of 10^{-11} M, and at ZT6 and 9 at 10^{-10} M. However, the hormone did not affect either the period or the amplitude of the rhythm. On the other hand, along the light phase, there was inhibition of *Cry1b* in the presence of ET-1 10^{-9} and 10^{-8} M, reducing the amplitude observed in the control cells.

CONCLUSÕES

- ✓ A proliferação celular de células ZEM 2S é inibida por luz;
- ✓ Células ZEM 2S expressam melanopsina, receptor do tipo ETA para endotelina, e os seis genes *Cry*;
- ✓ Melanopsina não apresenta ritmicidade de expressão em fotoperíodo 12C:12E. ET-1 modula a expressão de melanopsina, sendo que na concentração de 10^{-10} M aparentemente estabelece uma oscilação ao longo de 24h;
- ✓ A expressão do gene *Clock* é rítmica em regime de fotoperíodo 12C:12E. ET-1 inibe a expressão deste gene em todas as concentrações utilizadas, abolindo completamente o ritmo;
- ✓ A expressão do gene *Per1* é rítmica em regime de fotoperíodo 12C:12E. ET-1 não afeta o período de oscilação, mas diminui marcadamente sua amplitude;
- ✓ A expressão de *Cry1b* é rítmica em regime de fotoperíodo 12C:12E. Nas maiores concentrações utilizadas, ET-1 não altera o período ou a

amplitude do ritmo, porém, nas menores concentrações diminui a amplitude quando comparada as células controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akashi, E. & Nishida, E. 2000. Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. **Genes Dev.**, **14**: 645-49.
- Akashi, M. & Takumi, T. 2005. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, **12**: 441-8.
- Akashi, M.; Ichise, T.; Mamme, T. & Takumi, T. 2006. Molecular mechanism of cell-autonomous circadian gene expression of Period2, a crucial regulator of the mammalian circadian clock. **Mol. Biol. Cell**, **17**: 555-65.
- Akiyama, M.; Minami, Y.; Nakajima, T.; Moriya, T. & Shibata, S. 2001. Calcium and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induced expression of circadian clock gene mPer1 in the mouse cerebellar granule cell culture. **J. Neurochem.**, **78**: 499-508.
- Albrecht, U. & Eichele, G. 2003. The mammalian circadian clock. **Cur. Opin. Gen. Dev.**, **13**: 271-277.
- Albrecht, U.; Sun, Z.S.; Eichele, G. & Lee, C.C. 1997. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. **Cell**, **91**: 1055-64.
- Allada, R.; Emery, P.; Takahashi, J.S. & Rosbash, M. 2001. Stopping time: the genetics of and mouse circadian clocks. **Annu. Rev. Neurosci.**, **24**: 1091-1119.
- Arai, H.; Hori, S.; Aramori, I.; Ohkubo, H. & Nakanishi, S. 1990. Cloning and expression of cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, **348**: 730-32.
- Arendt, D. 2003. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. **Int. J. Dev. Biol.**, **47**: 563-71.
- Bailey, M.J. & Cassone, V.M. 2004. Melanopsin expression in the chick retina and pineal gland. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, **134**: 345-8.
- Balsalobre, A.; Brown, S.A.; Marcacci, L.; Tronche, F.; Kellendonk, C.; Reichardt, H.M.; Schutz, G. & Schibler, U. 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. **Science**, **289**: 2344-47.
- Balsalobre, A.; Damiola, F. & Schibler, U.A. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. **Cell**, **93**: 929-37.
- Bellingham, J.; Chaurasia, S.S.; Melyan, Z.; Liu, C.; Cameron, M.A.; Tarttelin, E.E.; Iuvone, P.M.; Hankins, M.W.; Tosini, G. & Lucas, R.J. 2006. Evolution of Melanopsin Photoreceptors:

- Discovery and Characterization of a New Melanopsin in Nonmammalian Vertebrates. **PLoS Biol.**, **4**: 1334-43.
- Bellingham, J.; Whitmore, D.; Philp, A.R.; Wells, D.J. & Foster, R.G. 2002. Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localisation and phylogenetic position. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, **107**: 128-36.
- Berridge, M.J.; Lipp, P. & Bootman, M.D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, **1**: 11-21.
- Berson, D.M.; Dunn, F.A. & Takao, M. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. **Science**, **295**: 1070-73.
- Bootman, M.D.; Taylor, C.W. & Berridge, M.J. 1992. The thiol reagent, thimerosal, evokes Ca²⁺ spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. **J. Biol. Chem.**, **267**: 25113-9.
- Bremnes, T.; Paasche, J.D.; Mehlum, A.; Sandberg, C.; Bremnes, B. & Attramadal, H. 2000. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. **J. Biol. Chem.**, **275**: 17596-604.
- Cahill, G.M. 2001. Circadian organization in fish and amphibians. *In*: **Biological Rhythms**, New Delhi: Narosa: 125-33.
- Carr, A.J.; Johnston, J.D.; Semikhodskii, A.G.; Nolan, T.; Cagampang, F.R.; Stirland, J.A. & Loudon, A.S. 2003. Photoperiod differentially regulates circadian oscillators in central and peripheral tissues of the Syrian hamster. **Curr. Biol.**, **13**: 1543-8.
- Carr, A.J.F. & Whitmore, D. 2005. Imaging of single light-responsive clock reveals fluctuating free-running periods. **Nat. Cell Biol.**, **7**: 319-21.
- Ceriani, M.F.; Darlington, T.K.; Staknis, D.; Mas, P.; Petti, A.A.; Weitz, C.J. & Kay, S.A. 1999. Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. **Science**, **285**: 553-56.
- Cermakian, N.; Pando, M.P.; Thompson, C.L.; Pinchak, A.B.; Selby, C.P.; Gutierrez, L.; Ewlls, D.E.; Cahill, G.M.; Sancar, A. & Sassone-Corsi, P. 2002. Light induction of a vertebrate clock gene involves signaling through blue-light receptors and MAP kinases. **Curr. Biol.**, **12**: 844-48.
- Chaurasia, S.S.; Rollag, M.D.; Jiang, G.; Hayes, W.P.; Haque, R.; Natesan, A.; Zatz, M.; Tosini, G.; Liu, C.; Korf, H.W.; Iuvone, P.M. & Provencio, I. 2005. Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (Opn4): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types. **J. Neurochem.**, **92**: 158-70.
- Chen, S.; Khan, Z.A.; Karmazyn, M. & Chakrabarti, S. 2006. Role of endothelin-1, sodium

- hydrogen exchanger-1 and mitogen activated protein kinase (MAPK) activation in glucose-induced cardiomyocyte hypertrophy. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, (no prelo).
- Chiu, J.F.; Mack, A.F. & Fernald, R.D. 1995. Daily rhythm of cell proliferation in the teleost retina. **Brain Res.**, **673**: 119–25.
- Chun, M.; Liyanage, U.K.; Lisanti, M.P. & Lodish, H.F. 1994. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **91**: 11728-32.
- Creba, J.A.; Downes, C.P.; Hawkins, P.T.; Brewster, G.; Michell, R.H. & Kirk, C.J. 1983. Rapid breakdown of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in rat hepatocytes stimulated by vasopressin and other Ca²⁺-mobilizing hormones. **Biochem. J.**, **212**: 733-47.
- Darlington, T.K.; Wager-Smith, K.; Ceriani, M.F.; Staknis, D.; Gekakis, N.; Steeves, T.D.; Weitz, C.J.; Takahashi, J.S. & Kay, S.A. 1998. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. **Science**, **280**: 1599-603.
- Dekens, M.P.; Santoriello, C.; Vallone, D.; Grassi, G.; Whitmore, D. & Foulkes, N.S. 2003. Light regulates the cell cycle in zebrafish. **Curr. Biol.**, **13**: 2051-57.
- Earnest, D.J.; Liang, F.Q.; Ratcliff, M. & Cassone, V.M. 1999. Imortal time: circadian clock properties of rat suprachiasmatic cell lines. **Science**, **283**: 693-95.
- Emery, P.; So, W.V.; Kaneko, M.; Hall, J.C. & Rosbash, M. 1998. CRY, A Drosophila clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. **Cell**, **95**: 669-79.
- Emoto, N. & Yanagisawa, M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. 1995. **J. Biol. Chem.**, **270**: 15262-8.
- Field, M.D.; Maywood, E.S.; O'Brien, J.A.; Weaver, D.R.; Reppert, S.M. & Hastings, M.H. 2000. Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. **Neuron**, **25**: 437-47.
- Fujii, R. 2000. The regulation of motile activity in fish chromatophores. **Pigment Cell Res.**, **13**: 300-19.
- Gekakis, N.; Staknis, D.; Nguyen, H.B.; Davis, F.C.; Wilsbacher, L.D.; King, D.P.; Takahashi J.S. & Weitz, C.J. 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. **Science**, **280**: 1564-9.
- Gooley, J.J.; Lu, J.; Chou, T.C.; Scommell, T.E. & Saper, C.B. 2001. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. **Nat. Neurosci.**, **4**: 1165.

- Gregan, B.; Jurgensen, J.; Papsdorf, G.; Furkert, J.; Schaefer, M.; Beyermann, M.; Rosenthal, W. & Oksche, A. 2004. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. **J. Biol. Chem.**, **279**: 27679-87.
- Guillaumond, F.; Dardente, H.; Giguere, V. & Cermakian, N. 2005. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. **J. Biol. Rhythms**, **20**: 391-403.
- Halazonetis, T.D.; Georgopoulos, K.; Greenberg, M.E. & Leder, P. 1988. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. **Cell**, **55**: 917-24.
- Hannibal, J. 2006. Regulation of melanopsin expression. **Chronobiol. Int.**, **23**: 159-66.
- Hardingham, G.E. & Bading, H. 1998. Nuclear calcium: a key regulator of gene expression. **Biomaterials**, **11**: 345-58.
- Haus-Seuffert, P. & Meisterernst, M. 2000. Mechanisms of transcriptional activation of cAMP-responsive element-binding protein CREB. **Mol. Cell Biochem.**, **212**: 5-9.
- Hirayama, J.; Cardone, L.; Doi, M. & Sassone-Corsi, P. 2005. Common pathways in circadian and cell cycle clocks: light-dependent activation of Fos/AP-1 in zebrafish controls CRY-1a and WEE-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **102**: 10194-9.
- Hirota, T.; Okano, T.; Kokame, K.; Shirotani-Ikejima, H.; Miyata, T. & Fukada, Y. 2002. Glucose down-regulates Per1 and Per2 mRNA levels and induces circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, **277**: 44244-51.
- Hogenesch, J.B.; Gu, Y.Z.; Jain, S. & Bradfield, C.A. 1998. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **95**: 5474-9.
- Im, L.H.J.; Isoldi, M.C.; Scarparo, A.C.; Castrucci, A.M.L. & Visconti, M.A. 2006. Rhythmic expression, light entrainment and α -MSH modulation of rhodopsin in a teleost pigment cell line. **Comp. Biochem. Physiol.**, (no prelo).
- Inagami, T.; Naruse, M. & Hoover, R. 1995. Endothelium as an endocrine organ. **Annu. Rev. Physiol.**, **57**: 171-89.
- Inoue, A.; Yanagisawa, M.; Kimura, S.; Kasuya, Y.; Miyauchi, T.; Goto, K. & Masaki, T. 1989. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **86**: 2863-67.
- Irukayama-Tomobe, Y.; Miyauchi, T.; Sakai, S.; Kasuya, Y.; Ogata, T.; Takanashi, M.; Iemitsu, M.; Sudo, T.; Goto, K. & Yamaguchi, I. 2004. Endothelin-1-induced cardiac hypertrophy is inhibited by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α partly via blockade of c-Jun NH2-terminal kinase pathway. **Circulation**, **109**: 904-10.

- Ishikawa, T.; Matsumoto, A.; Kato, T. Jr.; Togashi, S.; Ryo, H.; Ikenaga, M.; Todo, T.; Ueda, R. & Tanimura, T. 1999. DCRY is a *Drosophila* photoreceptor protein implicated in light entrainment of circadian rhythm. **Genes Cells**, **4**: 57-65.
- Isoldi, M.C.; Rollag, M.D.; Castrucci, A.M. & Provencio, I. 2005. Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **102**: 1217-21.
- Karne, S.; Jayawickreme, C.K. & Lerner, M.R. 1993. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETc receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. **J. Biol. Chem.**, **268**: 19126-33.
- Kawamoto, T.; Togi, K.; Yamauchi, R.; Yoshida, Y.; Nakashima, Y.; Kita, T. & Tanaka, M. 2006. Endothelin-1 activates Homer 1 α expression via mitogen-activated protein kinase in cardiac myocytes. **Int. J. Mol. Med.**, **18**: 193-6.
- Kennedy, R.A.; Kemp, T.J.; Sugden, P.H. & Clerk, A. 2006. Using U0126 to dissect the role of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) cascade in the regulation of gene expression by endothelin-1 in cardiac myocytes. **J. Mol. Cell Cardiol.**, **41**: 236-47.
- Kobayashi, Y.; Ishikawa, T.; Hirayama, J.; Daiyasu, H.; Kanai, S.; Toh, H.; Fukuda, I.; Tsujimura, T.; Terada, N. & Kamei, Y. 2000. Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. **Genes Cells**, **5**: 725-38.
- Kornhauser, J.M.; Mayo, K.E. & Takahashi, J.S. 1996. Light, immediate-early genes, and circadian rhythms. **Behav. Genet.**, **26**: 221-40.
- Kornhauser, J.M.; Nelson, D.E.; Mayo, K.E. & Takahashi, J.S. 1990. Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. **Neuron**, **5**: 127-34.
- Kumbalasiri, T.; Rollag, M.D.; Isoldi, M.; de Lauro Castrucci, A.M. & Provencio, I. 2006. Melanopsin Triggers the Release of Internal Calcium Stores in Response to Light. **Photochem. Photobiol.**, **103**: 10432-37.
- Kume, K.; Zylka, M.J.; Sriram, S.; Shearman, L.P.; Weaver, D.R.; Jin, X.; Maywood, E.S.; Hastings, M.H. & Reppert, S.M. 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. **Cell**, **98**: 193-205.
- Loros, J.J. & Dunlap, J.C. 2001. Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*. **Annu. Rev. Physiol.**, **63**: 757-94.
- Lowrey, P.L. & Takahashi, J.S. 2004. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, **5**: 407-41.

- Matsuo, T.; Yamaguchi, S.; Mitsui, S.; Emi, A.; Shimoda, F. & Okamura, H. 2003. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. **Science**, **302**: 255-59.
- McNamara, P.; Seo, S.P.; Rudic, R.D.; Sehgal, A.; Chakravarti, D. & Fitzgerald, G.A. 2001. Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. **Cell**, **105**: 877-889.
- Melyan, Z.; Tattelin, E.E.; Bellingham, J.; Lucas, R.J. & Hankins, M.W. 2005. Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. **Nature**, **433**: 741-5.
- Messenger, S.; Ross, A.W.; Barrett, P. & Morgan, P.J. 1999. Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **96**: 9938-43.
- Miyauchi, T. & Masaki, T. 1999. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. **Annu. Rev. Physiol.**, **61**: 391-415.
- Morris, M.E.; Viswanathan, N.; Kuhlman, S.; Davis, F.C. & Weitz, C.J. 1998. A screen for genes induced in the suprachiasmatic nucleus by light. **Science**, **279**: 1544-7.
- Moutsaki, P.; Whitmore, D.; Bellingham, J.; Sakamoto, K.; David-Gray, Z.K. & Foster, R.G. 2003. Teleost multiple tissue (tmt) opsin: a candidate photopigment regulating the peripheral clocks of zebrafish? **Brain Res. Mol. Brain Res.**, **112**: 135-45.
- Munoz, E.; Brewer, M. & Baler, R. 2002. Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box. **J. Biol. Chem.**, **277**: 36009-17.
- Nataf, V.; Grapin-Botton, A.; Champeval, D.; Amemiya, A.; Yanagisawa, M. & Douarin, N.M.L. 1998. The expression patterns of endothelin-A receptor and endothelin 1 in the avian embryo. **Mech. Dev.**, **75**: 145-49.
- Newman, L.A.; Walker, M.T.; Brown, R.L.; Cronin, T.W. & Robinson P.R. 2003. Melanopsin forms a functional short-wavelength photopigment. **Biochemistry**, **42**: 12734-8.
- Nomura, K.; Takeuchi, Y. & Fukunaga, K. 2006. MAP kinase additively activates the mouse Per1 gene promoter with CaM kinase II. **Brain Res.**, **1118**: 25-33.
- Nomura, K.; Takeuchi, Y.; Yamaguchi, S.; Okamura, H. & Fukunaga, K. 2003. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the induction of mPer1. **J. Neurosci. Res.**, **72**: 384-92.
- Obrietan, K.; Impey, S. & Storm, D.R. 1998. Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. **Nat. Neurosci.**, **1**: 693-700.
- Okamura, H.; Yamaguchi, S. & Yagita, K. 2002. Molecular machinery of the mammalian circadian clock. **Cell Tissue Res.**, **309**: 47-56.

- Olcese, J.; Sikes, H.E. & Resuehr, D. 2006. Induction of PER1 mRNA expression in immortalized gonadotropes by gonadotropin-releasing hormone (GnRH): involvement of protein kinase C and MAP kinase signaling. **Chronobiol. Int.**, **23**: 143-50.
- Opdecamp, K.; Kos, L.; Arnheiter, H. & Pavan, W.J. 1998. Endothelin signaling in the development of neural crest-derived melanocytes. **Biochem. Cell Biol.**, **76**: 1093-99.
- Palma, B.D.; Gabriel Jr., A.; Bignotto, M. & Tufik, S. 2002. Paradoxical sleep deprivation increases plasma endothelin levels. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **35**: 75-9.
- Panda, S.; Nayak, S.K.; Campo, B.; Walker, J.R.; Hogenesch, J.B. & Jegla, T. 2005. Illumination of the melanopsin signaling pathway. **Science**, **307**: 600-4.
- Panda, S.; Provencio, I.; Tu, D.C.; Pires, S.S.; Rollag, M.D.; Castrucci, A.M.; Pletcher, M.T.; Sato, T.K.; Wiltshire, T.; Andahazy, M.; Kay, S.A.; Van Gelder, R.N. & Hogenesch, J.B. 2003. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **301**: 525-27.
- Panda, S.; Sato, T.K.; Castrucci, A.M.L.; Rollag, M.D.; Degrip, W.J.; Hogenesch, J.B.; Provencio, I. & Kay, S.A. 2002. Melanopsin: requirement for normal light-induced circadian phase shifting. **Science**, **298**: 2213-16.
- Pando, M.P.; Pinchak, A.B.; Cermakian, N. & Sassone-Corsi, P. 2001. A cell-based system that recapitulates the dynamic light-dependent regulation of the vertebrate clock. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **98**: 10178-83.
- Plautz, J.D.; Kaneko, M.; Hall, J. & Kay, S.A. 1997. Independent photoreceptive circadian throughout *Drosophila*. **Science**, **278**: 1632-35.
- Preitner, N.; Damiola, F.; Lopez-Molina, L.; Zakany, J.; Duboule, D.; Albrecht, U. & Schibler, U. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell**, **110**: 251-60.
- Provencio, I.; Jiang, G.; Degrip, W.J.; Hayes, W.P. & Rollag, M.D. 1998. Melanopsin: an opsin in melanophores, brain, and eye. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **95**: 340-45.
- Provencio, I.; Rollag, M.D. & Castrucci, A.M.L. 2002. Photoreceptive net in the mammalian retina. **Nature**, **415**: 493.
- Qiu, X.; Kumbalasiri, T.; Carlson, S.M.; Wong, K.Y.; Krishna, V.; Provencio, I. & Berson, D.M. 2005. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. **Nature**, **433**: 745-9.
- Sakamoto, K.; Liu, C.; Kasamatsu, M.; Pozdeyev, N.V.; Iuvone, P.M. & Tosini, G. 2005. Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. **Eur. J. Neurosci.**, **22**: 3129-36.

- Sakamoto, K.; Liu, C. & Tosini, G. 2004. Classical photoreceptors regulate melanopsin mRNA levels in the rat retina. **J. Neurosci.**, **24**: 9693-7.
- Sakurai, T.; Yanagisawa, M. & Masaki, T. 1992. Molecular characterization of endothelin receptor. **Trends. Pharmacol. Sci.**, **13**: 103-8.
- Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Tokuya, T.; Miyazaki, H.; Kimura, S.; Goto, K. & Masaki, T. 1990. Cloning of cDNA encoding a non – isopeptide – selective subtype of endothelin receptor. **Nature**, **348**: 732-5.
- Sato, T.K.; Panda, S.; Miraglia, L.J.; Reyes, T.M.; Rudic, R.D.; McNamara, P.; Naik, K.A.; FitzGerald, G.A.; Kay, S.A. & Hogenesch, J.B. 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. **Neuron**, **43**: 527-37.
- Shearman, L.P.; Sriram, S.; Weaver, D.R.; Maywood, E.S.; Chaves, I.; Zheng, B.; Kume, K.; Lee, C.C.; van der Horst, G.T.; Hastings, M.H. & Reppert, S.M. 2000. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. **Science**, **288**: 1013-9.
- Shearman, L.P.; Zylka, M.J.; Reppert, S.M. & Weaver, D.R. 1999. Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. **Neuroscience**, **89**: 387-97.
- Shearman, L.P.; Zylka, M.J.; Weaver, D.R.; Kolakowski, L.F.Jr. & Reppert, S.M. 1997. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. **Neuron**, **19**: 1261-9.
- Singer, W.D.; Brown, H.A. & Sternweis, P.C. 1997. Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. **Annu. Rev. Biochem.**, **66**: 475-509.
- Sokolovsky, M. & Shraga-Levine, Z. 2001. Sarafotoxins and their relationship to the endothelin family of peptides. *In*: **Endothelin and its Inhibitors**, Springer: Warner.T.D. 22-34.
- Stanewsky, R. 2002. Clock mechanisms in Drosophila. **Cell Tissue Res.**, **309**: 11-26.
- Stanewsky, R.; Kaneko, M.; Emery, P.; Beretta, B.; Wager-Smith, K.; Kay, S.A.; Rosbash, M. & Hall, J.C. 1998. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in Drosophila. **Cell**, **95**: 681-92.
- Steinlechner, S.; Jacobmeier, B.; Scherbarth, F.; Dernbach, H.; Kruse, F. & Albrecht, U. 2002. Robust circadian rhythmicity of Per1 and Per2 mutant mice in constant light, and dynamics of Per1 and Per2 gene expression under long and short photoperiods. **J. Biol. Rhythms**, **17**: 202-9.
- Stjernquist M. 1998. Endothelins--vasoactive peptides and growth factors. **Cell Tissue Res.**, **292**: 1-9.

- Streb, H.; Irvine, R.F.; Berridge, M.J. & Schulz, I. 1983. Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. **Nature**, **306**: 67-9.
- Sugden, P.H. & Bogoyevitch, M.A. 1995. Intracellular signalling through protein kinases in the heart. **Cardiovasc. Res.**, **30**: 478-92.
- Sumova, A.; Sladek, M.; Jac, M. & Illnerova, H. 2002. The circadian rhythm of Per1 gene product in the rat suprachiasmatic nucleus and its modulation by seasonal changes in daylength. **Brain Res.**, **947**: 260-70.
- Takahashi, J.S. 1995. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. **Annu. Rev. Neurosci.**, **18**: 531-53.
- Takahashi, J.S. 2004. Finding new clock components: past and future. **J. Biol. Rhythms.**, **19**: 339-47.
- Takashima, N.; Fujioka, A.; Hayasaka, N.; Matsuo, A.; Takasaki, J. & Shigeyoshi, Y. 2006. Gq/11-induced intracellular calcium mobilization mediates Per2 acute induction in Rat-1 fibroblasts. **Genes Cells**, **11**: 1039-49.
- 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, M.W. & Okamura, H. 1998. A light-independent oscillatory gene mPer3 in mouse SCN and OVLT. **EMBO J.**, **17**: 4753-9.
- Tamanini, F.; Yagita, K.; Okamura, H. & van der Horst, G.T. 2005. Nucleocytoplasmic shuttling of clock proteins. **Methods. Enzymol.**, **393**: 418-35.
- Tauber, E.; Last, K.S.; Olive, P.J.W. & Kyriacou, C.P. 2004. Clock gene evolution and functional divergence. **J. Biol. Rhythms**, **19**: 445-58.
- Taylor, S.J.; Chae, H.Z.; Rhee, S.G. & Exton, J.H. 1991. Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. **Nature**, **350**: 516-8.
- Terazono, H.; Mutoh, T.; Yamaguchi, S.; Kobayashi, M.; Akiyama, M.; Udo, R.; Ohdo, S.; Okamura, H. & Shibata, S. 2003. Adrenergic regulation of clock gene expression in mouse liver. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **100**: 6795-800.
- Thresher, R.J.; Vitaterna, M.H.; Miyamoto, Y.; Kazantsev, A.; Hsu, D.S.; Petit, C.; Selby, C.P.; Dawut, L.; Smithies, O.; Takahashi, J.S. & Sancar, A. 1998. Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. **Science**, **282**: 1490-4.
- Tournier, B.B.; Menet, J.S.; Dardente, H.; Poirel, V.J.; Malan, A.; Masson-Pevet, M.; Pevet, P. & Vuilleuz, P. 2003. Photoperiod differentially regulates clock genes expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. **Neuroscience**, **118**: 317-22.

- Travnickova-Bendova, Z.; Cermakian, N.; Reppert, S.M. & Sassone-Corsi, P. 2002. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **99**: 728-33.
- Triqueneaux, G.; Thenot, S.; Kakizawa, T.; Antoch, M.P.; Safi, R.; Takahashi, J.S.; Delaunay, F. & Laudet, V. 2004. The orphan receptor Rev-erb α gene is a target of the circadian clock pacemaker. **J. Mol. Endocrinol.**, **33**: 585-608.
- Tu, D.C.; Owens, L.A.; Anderson, L.; Golczak, M.; Doyle, S.E.; McCall, M.; Menaker, M.; Palczewski, K. & Van Gelder, R.N. 2006. Inner retinal photoreception independent of the visual retinoid cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **103**: 10426-31.
- Vallone, D.; Gondi, S.B.; Whitmore, D. & Foulkes, N.S. 2004. E-box function in a period gene repressed by light. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **101**: 4106-11.
- van der Horst, G.T.; Muijtjens, M.; Kobayashi, K.; Takano, R.; Kanno, S.; Takao, M.; de Wit, J.; Verkerk, A.; Eker, A.P.; van Leenen, D.; Buijs, R.; Bootsma, D.; Hoeijmakers, J.H. & Yasui, A. 1999. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. **Nature**, **398**: 627-30.
- Vitaterna, M.H.; Selby, C.P.; Todo, T.; Niwa, H.; Thompson, C.; Fruechte, E.M.; Hitomi, K.; Thresher, R.J.; Ishikawa, T.; Miyazaki, J.; Takahashi, J.S. & Sancar, A. 1999. Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, **96**: 12114-9.
- Vivien-roels, B.; Pévet, B. & Claustrat, B. 1988. Pineal and circulating melatonin rhythms in the box turtle, *Terrapene carolina triunguis*: effect of photoperiod, light pulse, and environmental temperature. **Gen. Comp. Endocrinol.**, **69**: 163-73.
- von Schantz, M.; Provencio, I. & Foster, R.G. 2000. Recent developments in circadian photoreception: more than meets the eye. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **41**: 1605-7.
- Weber, F.; Hung, H.C.; Maurer, C. & Kay, S.A. 2006. Second messenger and Ras/MAPK signalling pathways regulate CLOCK/CYCLE-dependent transcription. **J. Neurochem.**, **98**: 248-57.
- Werry, T.D.; Wilkinson, G.F. & Willars, G.B. 2003. Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca²⁺. **Biochem. J.**, **374**: 281-96.
- Whitmore, D.; Foulkes, N.S. & Sassone-Corsi, P. 2000. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. **Nature**, **408**: 81-91.
- Wood, J.L. & Russo, A.F. 2001. Autoregulation of cell-specific MAP kinase control of the tryptophan hydroxylase promoter. **J. Biol. Chem.**, **276**: 21262-71.

- Xu, D.; Emoto, N.; Giaid, A.; Slaughter, C.; Kaw, S.; de Wit, D. & Yanagisawa, M. 1994. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. **Cell**, **78**: 473-85.
- Yagita, K. & Okamura, H. 2000. Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. **FEBS Lett.**, **465**: 79-82.
- Yagita, K.; Tamanini, F.; Van Der Horst, G.T. & Okamura, H. 2001. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. **Science**, **292**: 278-81.
- Yamaguchi, S.; Mitsui, S.; Miyake, S.; Yan, L.; Onishi, H.; Yagita, K.; Suzuki, M.; Shibata, S.; Kobayashi, M. & Okamura, H. 2000. The 5' upstream region of mPer1 gene contains two promoters and is responsible for circadian oscillation. **Curr. Biol.**, **10**: 873-6.
- Yamazaki, S.; Alones, V. & Menaker, M. 2002. Interaction of the retina with suprachiasmatic pacemakers in the control of circadian behavior. **J. Biol. Rhythms**, **17**: 315-29.
- Yamazaki, S.; Numano, R.; Abe, M.; Hida, A.; Takahashi, R.; Ueda, M.; Block, G.D.; Sakaki, Y.; Menaker, M. & Tei, H. 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. **Science**, **288**: 682-85.
- Yong, M.W. & Kay, S.A. 2001. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. **Nat. Rev. Genet.**, **2**: 702-15.
- Yoo, M.H.; Lee, J.Y.; Lee, S.E.; Koh, J.Y. & Yoon, Y.H. 2004. Protection by pyruvate of rat retinal cells against zinc toxicity in vitro, and pressure-induced ischemia in vivo. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **45**: 1523-30.
- Zhuang, M.; Wang, Y.; Steenhard, B.M. & Besharse, J.C. 2000. Differential regulation of two period genes in the *Xenopus* eye. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, **82**: 52-64.
- Zylka, M.J.; Shearman, L.P.; Levine, J.D.; Jin, X.; Weaver, D.R. & Reppert, S.M. 1998. Molecular analysis of mammalian timeless. **Neuron**, **21**: 1115-22.