UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

LEONARDO HENRIQUE RIBEIRO GRACIANI DE LIMA

Retina de aves como um sistema circadiano e sua modulação por luz e glutamato

Avian retina as a circadian system and its modulation by light and glutamate

SÃO PAULO
2009

LEONARDO HENRIQUE RIBEIRO GRACIANI DE LIMA

Retina de aves como um sistema circadiano e sua modulação por luz e glutamato

Avian retina as a circadian system and its modulation by light and glutamate

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

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

São Paulo

2009

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

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS/USP

Lima, Leonardo Henrique Ribeiro Graciani de
L 732r Retina de aves como um sistema circadiano e sua modulação por luz e glutamato / Leonardo Henrique Ribeiro Graciani de Lima. -- São Paulo : L.H.R.G.L., 2009.
p. : il.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia, 2009.

1. Retina 2. Ritmo Circadiano 3. Fotoperiodismo 4. Glutamato I.Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia II. Título

LC QP 479

Nome: LIMA, Leonardo Henrique Ribeiro Graciani de

TÍTULO: Retina de aves como um sistema circadiano e sua modulação por luz e glutamato

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr (a). _____Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura:_ _____

Prof. Dr(a). _____Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho a meu pai Wanderley de Lima que, pouco antes de seu falecimento, demonstrou a importância de minha formação com a seguinte frase “os cinquenta reais mais bem gastos de toda minha vida foram na taxa de sua inscrição na pós-graduação”

AGRADECIMENTOS

A meus pais e minha família pela oportunidade de presenciar este momento e poder realizar esta e outras atividades.

À minha irmã Vívian que sempre me deu muito amor e carinho e esteve comigo nas horas mais felizes, e também nas mais difíceis.

À minha mulher Thais por um amor maravilhoso, que me incentivou a ser uma pessoa melhor.

A todos os educadores com quem convivi, e que muito fizeram por minha formação e caráter.

À Professora Doutora Ana Maria de Lauro Castrucci pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório, sob sua orientação, pois durante esse tempo aprendi não só a metodologia científica aqui empregada, mas também, que é preciso ter perseverança para conseguir encontrar nos fenômenos biológicos as respostas para as perguntas que queremos responder. Um de seus primeiros ensinamentos a mim foi: “tenha paciência, entenda primeiro porque o resultado do ensaio experimental não foi o esperado, e lembre-se sempre, se fazer pesquisa fosse fácil, a designação em inglês para tal seria apenas *Search*, e não *Research*”.

Ao Professor Doutor Mauro Cesar Isoldi pelo convívio e orientação.

À Professora Doutora Maria Aparecida Visconti pelo fornecimento dos ovos e pelo convívio.

Ao Professor Doutor José Cipolla Neto pela colaboração prática e teórica com nosso laboratório.

Ao Professor Doutor Rui Curi e à Doutora Thais Martins de Lima pela colaboração prática e utilização do citômetro de fluxo.

A todos os colegas e amigos de laboratório, Aninha Fifi, Ana Cris, Luciana, Adriana, Dóris, Marcelo, Guilherme, Carolina, Gláucia, Fernanda, Mábio, Letícia, Maria Nathália, Luciane, Thiago, Jennifer, Kátia, Márcio e Telma pelo convívio.

A Universidade de São Paulo pela continuação de minha formação.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

“SOME ARE BORN TO MOVE THE WORLD
TO LIVE THEIR FANTASIES
BUT MOST OF US JUST DREAM ABOUT
THE THINGS WE'D LIKE TO BE”

(“Losing it”, Signals –RUSH)

RESUMO

O sistema circadiano das aves é composto pela retina, a região homóloga aos núcleos supraquiasmáticos de mamíferos (NSQ) e a glândula pineal. A retina apresenta muitos eventos fisiológicos rítmicos, como por exemplo os movimentos das células fotorreceptoras em vertebrados não mamíferos, a expressão de opsinas, regeneração do cromóforo visual e produção e liberação de melatonina e dopamina. Todos estes eventos rítmicos são coordenados para prever alterações nas condições luminosas que ocorrem durante o dia, otimizando a função retiniana. Neste trabalho foi investigada a expressão de componentes chave de um sistema circadiano, incluindo os dois genes de melanopsina, *Opn4x* e *Opn4m,* os genes de relógio *Clock* e *Per2*, e os genes das enzimas chave da síntese de melatonina, *N-Acetiltransferase,* e de dopamina, *Tirosina Hidroxilase,* em células da retina de embriões de galinha. Culturas primárias de retina de embriões de galinha com 8 dias foram preparadas no ZT0 (quando as luz é acesa) e semeadas na densidade de 10^7 células por frasco de 25 cm^2 . As células foram mantidas em ambiente úmido, com 5 % CO_2, a 40° C, em escuro constante, fotoperíodo 12C:12E, fotoperíodo 12C:12E seguido de escuro constante, ou em escuro constante na presença e na ausência de glutamato 100 uM por 12 h. A extração de RNA total foi feita ao longo de 24 horas com intervalo de três horas tendo início no ZT0 do sexto dia. As amostras foram submetidas a RT-PCR seguido de PCR quantitativo para a quantificação de RNAm. Para confirmar a expressão da proteína OPN4x foi realizado ensaio imunohistoquímico com anticorpos anti-melanopsina de galinha desenvolvidos em coelho. Também foi feita a quantificação da concentração das proteínas OPN4x, CLOCK e TIROSINA HIDROXILASE através da técnica de *Western Blot*. A quantificação do RNAm em escuro constante não apresentou ritmos de transcrição para nenhum gene. Já as células mantidas em fotoperíodo 12C:12E apresentaram padrões rítmicos de transcrição para *Clock, Per2, Opn4m, N-Acetiltransferase* e *Tirosina Hidroxilase*. Glutamato 100 uM foi eficaz em induzir ritmo em *Clock*, e inibiu drasticamente a expressão de *Tirosina Hidroxilase* e, apenas mais pontualmente, de *Opn4x* e *Opn4m*. Ensaios de viabilidade celular e fragmentação de DNA por citometria de fluxo demonstraram que essa inibição não foi resultante de ação tóxica

ou apoptótica do glutamato. O neurotransmissor não teve qualquer efeito sobre a transcrição de *Per2* e de *N-Acetiltransferase*. A quantificação protéica não indicou a presença de ritmo para CLOCK, OPN4x ou TIROSINA HIDROXILASE. A grande variabilidade inter-ensaios nos resultados de quantificação protéica sugere uma menor sensibilidade e precisão para esse método, quando comparado a PCR quantitativo. Nossos resultados indicam que as células de retina de embrião de 8 dias de galinha em cultura já contêm um relógio funcional, porém, este necessita do ciclo claro-escuro ou glutamato para sua sincronização.

ABSTRACT

The avian circadian system is composed by the retina, the mammalian homolog region of the supra-chiasmatic nucleus (SNC) and the pineal gland. The retina itself shows many rhythmic physiological events, such as movements of photoreceptor cells, opsin expression, retinaldehyde re-isomerization, melatonin and dopamine production and release. Altogether these rhythmic events are coordinated to predict environmental changes in light conditions during the day, optimizing retina function. In this work we investigated the expression of key components of a circadian system, including the two melanopsin genes, *Opn4x, Opn4m,* as well as the *Clock*, *Per2*, *N-Acetyltransferase* and *Tyrosine Hidroxylase* genes in chick embryo retinal cells. Primary cultures of chicken retina from 8-day-old embryos were prepared at ZT0 (lights on) and seeded at the density of 10^7 cells per 25 cm^2 culture flask. The cells were kept in a humidified incubator in a 5 % CO_2 atmosphere at 40° C in constant dark, in 12L:12D, in 12L:12D followed by constant dark, or in constant dark in the absence or presence of 100 uM glutamate for 12 h starting at ZT0 of the fifth day *in vitro*. Total RNA extraction was performed along 24 hours every three hours starting at ZT0 of the sixth day. The samples were submitted to RT-PCR followed by quantitative PCR for mRNA quantification. To analyze the OPN4x expression in these cells we performed an immunocytochemistry analysis with antibodies anti-chicken melanopsin developed in rabbit. We also quantified the protein levels of OPN4x, CLOCK AND TYROSINE HYDROXYLASE by Western Blot. The mRNA quantification showed no rhythm of transcription for any gene in cells kept in constant

dark. However under a light-dark cycle, *Clock, Per2, Opn4m, N-Acetyltransferase* and *Tyrosine Hydroxylase* presented rhythm patterns of transcription. 100 uM glutamate was able to induce rhythmic expression of *Clock*, and strongly inhibited the expression of *Tyrosine Hydroxylase* and, just punctually, of *Opn4x* and *Opn4m*. Assays of cell viability and DNA fragmentation using flow cytometry demonstrated that the inhibition did not result of glutamate toxic or apoptotic actions. The neurotransmitter had no effect on *Per2* and *N-Acetyltransferase* transcription. Protein quantification by Western Blot showed no rhythmic oscillation of CLOCK, OPN4x or TYROSINE HYDROXYLASE. The great variability inter-assays seen in the results of protein quantification suggests that this method is less precise and sensitive than quantitative PCR. The present data show evidences that chicken embryonic retinal cells contain a functional circadian clock. However light-dark cycle or glutamate stimuli are needed to its synchronization.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS ..... **VI**

RESUMO ..... **VIII**

ABSTRACT ..... **IX**

INTRODUÇÃO **1**

RITMOS CIRCADIANOS 1

FOTOPIGMENTOS 8

OPSINAS 8

CÉLULAS FOTORRECEPTORAS 10

FOTORRECEPTOR CIRCADIANO 12

RITMOS NEUROQUÍMICOS 15

OBJETIVO GERAL **24**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24

MATERIAL E MÉTODOS **25**

CULTURA DE CÉLULAS DE RETINA 25

PROTOCOLOS DE EXPRESSÃO DE MELANOPSINAS (*OPN4X E OPN4M*), *CLOCK*, *PER2*, *N-ACETILTRANSFERASE* E *TIROSINA HIDROXILASE* EM ESCURO CONSTANTE 26

PROTOCOLOS DE EXPRESSÃO DE MELANOPSINAS (*OPN4X E OPN4M*), *CLOCK*, *PER2*, *N-ACETILTRANSFERASE* E *TIROSINA HIDROXILASE* EM CICLO CLARO-ESCURO 26

PROTOCOLOS DE EXPRESSÃO DE MELANOPSINAS (*OPN4X E OPN4M*), *CLOCK*, *PER2*, *N-ACETILTRANSFERASE* E *TIROSINA HIDROXILASE* EM CÉLULAS PRÉ-INCUBADAS EM CICLO CLARO-ESCURO, SEGUIDO DE ESCURO CONSTANTE 27

PROTOCOLOS DE EXPRESSÃO DE MELANOPSINAS (*OPN4X E OPN4M*), *CLOCK*, *PER2*, *N-ACETILTRANSFERASE* E *TIROSINA HIDROXILASE* SOB O EFEITO DE GLUTAMATO 28

EXTRAÇÃO DE RNA, RT-PCR (*REVERSE TRANSCRIPTASE-POLIMERASE CHAIN REACTION*) E QUANTIFICAÇÃO DE RNAM DE MELANOPSINAS (*OPN4X* E *OPN4M*), *CLOCK*, *N-ACETILTRANSFERASE* E *TIROSINA HIDROXILASE* POR PCR QUANTITATIVO (TEMPO REAL) 29

DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DA PROTEÍNA MELANOPSINA OPN4X POR ENSAIO IMUNOCITOQUÍMICO 32

WESTERN BLOT 33

VIABILIDADE CELULAR 35

FRAGMENTAÇÃO DE DNA 35

ANÁLISE ESTATÍSTICA 36

RESULTADOS **37**

CARACTERÍSTICAS DA CULTURA 37

Clock *38*

Per2 ..... *44*

Opn4x *48*

Opn4m *52*

N-acetiltransferase *57*

Tirosina Hidroxilase *61*

EXPRESSÃO PROTÉICA 67

Ensaio Imunocitoquímico *67*

Western Blot *68*

CLOCK *68*

OPN4x *71*

TIROSINA HIDROXILASE *74*

OPN4m *77*

PER2 ..... *78*

N-ACETILTRANSFERASE *78*

Viabilidade celular e fragmentação de DNA *79*

DISCUSSÃO **87**

CULTURA 89

CLOCK E *PER2* 89

OPN4X E *OPN4M* 92

N-ACETILTRANSFERASE 95

TIROSINA HIDROXILASE 97

TRATAMENTO COM GLUTAMATO 99

VIABILIDADE CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA 100

REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO 101

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **106**

INTRODUÇÃO

Ritmos circadianos

Ritmos circadianos são características marcantes encontradas nos seres vivos, pois representam manifestações evidentes de adaptação. Estes ritmos conferem vantagens significativas para os organismos, porque permitem a estes sincronizar eventos internos com os ciclos físicos do ambiente. Exemplos de ritmos circadianos incluem oscilações nos níveis de vários hormônios como melatonina, cortisol, hormônio de crescimento, de modo que a produção ou liberação destes ocorra em uma hora precisa do dia (ASCHOFF, 1960; PITTENDRIGH, 1960).

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

Entende-se por organização circadiana o modo como o sistema circadiano inteiro é unificado fisiologicamente, e pelos princípios e regras que determinam as interações entre seus componentes. A organização circadiana se estende tanto amplamente quanto profundamente dentro da fisiologia e do comportamento dos organismos multicelulares. No núcleo do sistema que regula e controla os diversos ritmos que podem ser medidos em vertebrados, são encontradas três estruturas que unidas por suas interconexões formam um “eixo circadiano“ central comum a todos os vertebrados, inclusive os mais primitivos. Essas estruturas são as retinas, o complexo pineal (pineal e o órgão/olho parietal) e o núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo (MENAKER *et al.*, 1997).

Os sinais fornecidos pelo ambiente para que os organismos ajustem

seus ritmos são chamados de *zeitgebers* (doador do tempo em alemão). O principal *zeitgeber* ambiental é o ciclo de claro e escuro. Os sinais luminosos são capturados por células fotorreceptoras especializadas, e então convertidos em sinais neurais e hormonais que governam a fisiologia e o metabolismo dos organismos. O aumento dos recursos tecnológicos, e também do número dos estudos realizados em organismos que até então eram pouco estudados, tem revelado que células fotorreceptoras ou estruturas responsáveis pela captação da informação luminosa ambiental são encontradas desde organismos procariontes (SPUDICH *et al.*, 2000; SPUDICH, 2006). Peixes, anfíbios, répteis e aves possuem células fotorreceptoras especializadas distribuídas em várias regiões do encéfalo, e a luz que incide sobre o corpo destes animais penetra pela pele e crânio e atinge essas células fotossensíveis, que veiculam a informação para o homólogo do NSQ (MENAKER, 1972). Na retina de mamíferos, foi descrita uma rede de células ganglionares portadoras de um novo fotopigmento, a melanopsina (PROVENCIO *et al.*, 1998; 2002); algum tempo depois Berson e colaboradores mostraram que essas células são intrinsecamente fotossensíveis, e enviam projeções para o núcleo supraquiasmático (NSQ), o chamado relógio mestre dos vertebrados (BERSON *et al.*, 2002).

Em mamíferos, os sinais luminosos captados pela retina são convertidos em impulsos nervosos (despolarização das células ganglionares imunopositivas para melanopsina), os quais são conduzidos pelo trato retino-hipotalâmico, culminando com a liberação de glutamato (um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central) nas células do NSQ causando o arrastamento do relógio mestre, ou seja, ajustando a fase do relógio endógeno mestre com a fase dos ciclos ambientais (OHI *et al*., 1991; TAKEUCHI *et al*., 1991).

O relógio endógeno encontrado no NSQ dos mamíferos é formado pelo acoplamento das oscilações fisiológicas espontâneas de seus neurônios. O mecanismo responsável pelas oscilações espontâneas de cada neurônio do NSQ, por sua vez, é formado por um mecanismo molecular que consiste de duas alças de retroalimentação de controle de expressão gênica interligadas, uma negativa e a outra positiva. A alça de retroalimentação negativa envolve a regulação dinâmica de três genes *Period* (em camundongos designados como

mPer1-3) e dois genes *Cryptocrome* (*mCry1* e *mCry2*). A transcrição destes genes é feita de forma rítmica e controlada pelos fatores de transcrição CLOCK e BMAL1, que são proteínas que contêm domínios *basic helixloop helix* (bHLH) em sua estrutura. Quando as proteínas mPER e mCRY são traduzidas, elas formam complexos multiméricos que são translocados para o núcleo. No núcleo, as proteínas mCRY agem como reguladores negativos que interagem diretamente com as proteínas CLOCK e ou BMAL1 para inibir a transcrição de *mPER* e *mCRY.* Concomitantemente, mPER2 contribui para a transcrição rítmica de *Bmal1* que forma junto com *mClock* a alça de transcrição positiva, que é expressa em fase oposta a *mPer/mCry*. A disponibilidade aumentada de BMAL1 promove a heterodimerização de CLOCK/BMAL1 necessária para re-iniciar o ciclo de transcrição de *mPer/mCry.* O modelo proposto por Reppert e Weaver para o funcionamento do relógio do NSQ, baseado nestas duas alças de retroalimentação, propõe que no início do dia circadiano (CT0), a transcrição de *mPer* e *mCry* é controlada pelo acúmulo de heterodímeros CLOCK/BMAL1 (os níveis mais elevados do RNAm de *mPer1* ocorrem nos CTs4-6, os de *mPer3* nos CTs4-8, e *mPer2* no CT8, enquanto que o nível mais alto de *mCry* ocorre no CT10). Por volta do meio dia (CT12), as proteínas mPER e mCRY são expressas no núcleo, onde mCRY interrompe (desliga) a transcrição de *mPer* e *mCry* mediada por CLOCK/BMAL1. Ao mesmo tempo em que mPER2 interrompe a transcrição de *mPer* e *mCry,* essa proteína ativa a transcrição de *Bmal1*, cujos níveis mais elevados de RNAm são encontrados a partir do CT15, ao CT18 (REPPERT; WEAVER, 2001). A renovação dos níveis de BMAL1 no final da noite aumentam a heterodimerização de CLOCK/BMAL1 na hora circadiana apropriada para ativar a transcrição de *mPer* e *mCry* re-iniciando o ciclo. Acredita-se que o ritmo de *Bmal1* gera o ritmo da proteína BMAL1 com um intervalo de 4 a 6 horas de atraso (REPPERT; WEAVER, 2001).

Nas aves, existe controvérsia sobre a localização precisa da região homóloga ao NSQ dos mamíferos. Nelas são encontrados dois núcleos: o núcleo medial hipotalâmico MNH (também conhecido como núcleo periventricular pré-óptico) e o núcleo hipotalâmico retinocepiente lateral LHRN (também conhecido como NSQ visual), possíveis homólogos do NSQ de mamíferos (CASSONE; MOORE, 1987; NORGREN; SILVER, 1989 a, b; SHIMIZU *et al*., 1994; UNDERWOOD *et al*, 2001). A perda da ritmicidade após

a remoção da pineal ou dos olhos em pardais (*Passer domesticus)* assim como de outras seis espécies de aves mantidas em condições constantes (YOSHIMURA *et al*., 2001) é algo notável, pois mostra que o homólogo ao NSQ é incapaz de manter a ritmicidade do organismo na ausência de sinais provenientes desses órgãos. Ciclos de 24h de claro-escuro podem forçar aves pinealectomizadas ou cegas a exibir uma periodicidade de 24 horas em ritmos de atividade, alimentação, ou temperatura (GASTON; MENAKER, 1968; UNDERWOOD *et al*., 1984; UNDERWOOD; SIOPES, 1984). Porém essa ritmicidade observada após a remoção dos olhos ou da pineal persiste por dias ou semanas, ao longo dos quais diminui até que o animal se torne arrítmico em condições constantes. Em pardais pinealectomizados mantidos em escuro constante, um único pulso de luz pode induzir uma ritmicidade temporária que pode durar de 6 a 7 dias (GASTON; MENAKER, 1968).

A glândula pineal das aves é considerada um órgão circadiano, pois contém os três componentes mais importantes de um sistema circadiano: 1) fotorreceptores que propiciam uma aferência (*input*) de sinais ambientais para o oscilador (WAINWRIGHT; WAINWRIGHT, 1978; KASAL *et al*., 1979; TAKAHASHI *et al*., 1980; BINKLEY, 1983; OKANO *et al*., 1994; BAILEY; CASSONE, 2005; IUVONE *et al*., 2005); 2) genes de relógio localizados em suas células que constituem um oscilador capaz de governar funções fisiológicas deste órgão (OKANO; FUKADA, 2001; OKANO *et al*., 2001; BAILEY *et al*., 2002; CHONG *et al*., 2003); 3) uma eferência (*output*) de sinais fisiológicos para o organismo, a qual é constituída pela síntese e liberação de melatonina no plasma sanguíneo (CASSONE; MENAKER, 1984; OKANO; FUKADA, 2001).

Nos mamíferos, a produção de melatonina pela pineal é, e continua rítmica, mesmo que o animal seja mantido em condições constantes, com um pico máximo noturno. Isto ocorre porque o ritmo de síntese de melatonina pela pineal é controlado de forma circadiana pelo NSQ (KLEIN *et al*., 1992). Pois as células do NSQ acionam uma via multisináptica que inclui o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), e neurônios que emitem projeções para o trato intermédio-lateral da espinha dorsal que contém os corpos celulares que inervam o gânglio cervical superior. Os axônios pós-ganglionares simpáticos do gânglio cervical superior ascendem junto à artéria carótida onde entram no

nervo coronário e vão até a pineal. Nesta, a liberação noturna de noradrenalina pelas fibras simpáticas ocasiona um rápido aumento de 150 vezes nos níveis do RNAm da enzima chave (o passo limitante) da via de síntese de melatonina, a N-acetiltransferase (NAT), e também um aumento de 50 a 70 vezes na atividade da enzima, o que resulta em um aumento de 10 vezes na síntese e liberação de melatonina na corrente sanguínea durante a noite (MOORE, 1996).

Além de ser controlada pelo relógio endógeno do NSQ, a produção de melatonina pela glândula pineal também é controlada pela luz. Pois além de arrastar o relógio central, o glutamato que chega às células do NSQ trazendo a informação luminosa captada pela retina faz com que ocorra a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) um dos principais neurotransmissores inibitórios no PVN, causando então foto-inibição da produção e liberação da melatonina (KALSBEEK *et al*., 1999; 2000).

Nas aves, existem duas rotas pelas quais a luz pode sincronizar a produção de melatonina pela pineal com ritmos claro-escuro, pois além da via descrita para os mamíferos, que também está presente nas aves, os fotorreceptores presentes na pineal desses animais são capazes de inibir a produção de melatonina em resposta à luz, independentemente da informação captada pela retina. Estudos mostram também que a informação visual captada pela retina pode sincronizar o ritmo de síntese e liberação de melatonina pela glândula pineal em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) (BARRETT; UNDERWOOD, 1991) e em galinhas, sendo que nestas, comprimentos de onda próximos aos de ultra-violeta sincronizam a produção de melatonina pela pineal (ROSIAK *et al*., 2005; ROSIAK; ZAWILSKA, 2005).

Culturas de células de pineal podem mostrar ritmos diários na atividade da NAT, e na secreção de melatonina em condições constantes. Esses ritmos podem ser iniciados por ciclos de claro-escuro de 24 h em peixes, lagartos e aves (UNDERWOOD, 1990; UNDERWOOD *et al*., 1990a, b; MURAKAMI *et al*., 1994; BARRETT; TAKAHASHI, 1997; NAKAHARA *et al.*, 1997). Ritmos de síntese e secreção de melatonina pela pineal *in vitro* têm sido encontrados em pombos, pardais, e galinhas (MURAKAMI *et al*., 1994; BARRETT; TAKAHASHI, 1997). A persistência dos ritmos de melatonina em cultura de células da pineal de galinhas é altamente influenciada pela temperatura, sendo

mais persistente em condições constantes a 40^0 C do que a 37^0 C (BARRETT; TAKAHASHI, 1997). Em algumas aves, por ex. codornas japonesas, a pinealectomia não afeta significativamente os ritmos retinianos nem os de atividade quando estas estão submetidas a ciclos de claro-escuro, ou a escuro constante (UNDERWOOD; SIOPES, 1984). Porém esses ritmos não estão presentes nessas espécies quando estas sofrem a remoção completa dos olhos e são mantidas em condições constantes (UNDERWOOD; SIOPES, 1984; UNDERWOOD, 1994; UNDERWOOD; EDMONDS, 1995a, b).

A luz pode exercer dois efeitos distintos sobre os ritmos de melatonina secretada por células de pineal de galinhas em cultura: supressão severa da síntese de melatonina e avanço de fase, ou o arrastamento do marca-passo circadiano que controla a síntese de melatonina (ZATZ; HEATH, 1995). A deficiência de vitamina A reduz a resposta de inibição de síntese de melatonina, mas não a resposta de avanço de fase, indicando que diferentes fotopigmentos podem estar envolvidos nesses dois tipos de resposta à luz (ZATZ, 1994), um deles cujo cromóforo não é o retinaldeído.

Muitos eventos na retina dos vertebrados exibem ritmos circadianos, incluindo a renovação dos discos membranosos dos segmentos externos dos fotorreceptores, movimentos fotomecânicos dos cones e bastonetes em vertebrados não mamíferos, migração de pigmento, morfologia sináptica, atividades enzimáticas, síntese e liberação de melatonina e dopamina, níveis de AMPc e também expressão do RNAm de iodopsina, o fotopigmento de cone vermelho (CASSONE; MENAKER, 1984; PIERCE; BESHARSE, 1985; 1987; CAHILL; BESHARSE, 1991; CAHILL *et al*., 1991; PIERCE *et al*., 1993; GREEN *et al*., 1995a, b; TOSINI; MENAKER, 1996; 1998; MANGLAPUS *et al*., 1999; IVANOVA ; IUVONE, 2003a, b; CHAURASIA *et al*., 2006). Alguns ritmos como os de expressão de iodopsina podem ser encontrados em culturas de retina de galinha obtidas a partir de embriões de galinha com nove dias de incubação (ZHANG *et al*., 2003), período em que a maioria dos diferentes tipos celulares da retina já deixou o ciclo mitótico e encontra-se em estágio de diferenciação (BELECKY-ADAMS *et al*., 1996).

A secção do nervo óptico exclui a possibilidade de qualquer relógio extraocular mandar informações para a retina, sendo assim o fato de que a retina continua capaz de sincronizar a produção de melatonina e de dopamina

com ciclos de claro-escuro, o que se mantém em escuro constante, prova que existe um relógio autônomo na retina capaz de controlar seus próprios ritmos (UNDERWOOD *et al*., 1990b).

Evidências iniciais vindas de estudos com o hamster mutante *tau* indicam que os relógios retinianos funcionam de uma maneira muito semelhante à do NSQ. Esses hamsters mutantes exibem períodos extremamente curtos de atividade locomotora, devido a uma mutação pontual no gene *ckIε* que resulta em uma enzima caseína quinase I com atividade alterada, ou seja, com deficiência na sua capacidade de fosforilar PER (LOWREY *et al*., 2000). A investigação dos ritmos de melatonina, em cultura de retina de hamster mutante *tau,* assim como o estudo da renovação dos discos membranosos do segmento externo dos fotorreceptores em animais intactos, revelam que esses ritmos também exibem padrões curtos, sugerindo que os mesmos mecanismos moleculares do NSQ são encontrados na retina (GRACE *et al*., 1996; TOSINI; MENAKER, 1996; 1998). Inúmeros estudos mostraram que genes de relógio como *Clock* e *Period* também são expressos na retina de todos os vertebrados examinados até agora (GEKAKIS *et al*., 1998; ZYLKA *et al*., 1998; NAMIHIRA *et al*., 1999; 2001; KUHLMAN *et al*., 2000; SAKAMOTO *et al*., 2000; YOSHIMURA *et al*., 2000; ZHU *et al*., 2000; ZHUANG *et al*., 2000; ZHU; GREEN, 2001; BAILEY *et al*., 2002; HAQUE *et al*., 2002; CHONG *et al*., 2003; WITKOVSKY *et al*., 2003).

Em 2006, Chaurasia e colaboradores mostraram, através da análise de genes de relógio em culturas da retina de embriões de galinha obtidas no sexto dia embrionário, enriquecidas em células fotorreceptoras, evidências de um sistema circadiano completo nessas células. Neste trabalho, os autores relatam que os genes *Bmal1* e *Opn4x* apresentam picos de expressão no fim do dia tanto em fotoperíodo claro-escuro quanto em escuro constante. *Clock* apresenta seu pico de expressão à noite em fotoperíodo claro-escuro, mas é arrítmico em escuro constante. *Cry1* e *Per2* aumentam pela manhã e são pouco expressos durante a noite. A amplitude do ritmo de expressão de *Per2* é reduzida em escuro constante, e os níveis de expressão de *Cry1* e *Per2* são estimulados por exposição luminosa noturna (CHAURASIA *et al*., 2006).

Fotopigmentos

Pesquisas buscando identificar qual, ou quais os fotopigmentos envolvidos na fotorrecepção circadiana mostraram que a maioria dos fotopigmentos presentes na retina está envolvida apenas com a visão, seja noturna ou diurna. Porém existem evidências que mostram um novo grupo de moléculas fotoativas presentes na camada interna da retina de mamíferos, e também em outras regiões encefálicas como a glândula pineal e regiões profundas do encéfalo de vertebrados não mamíferos que participam da fotorrecepção circadiana (TAKAHASHI *et al*., 1980; FOSTER *et al*., 1991; PROVENCIO *et al*., 1998; CASHMORE *et al*., 1999; PROVENCIO *et al*., 2000; PANDA *et al*., 2002; PROVENCIO *et al*., 2002; PANDA *et al*., 2003; ROLLAG *et al*., 2003; CHAURASIA *et al*., 2005; ISOLDI *et al*., 2005; QIU *et al*., 2005).

Opsinas

Os fotopigmentos visuais dos vertebrados pertencem à família das opsinas. Atualmente as opsinas são classificadas em tipo 1 e tipo 2. Opsinas tipo 1 são proteínas muito antigas, usadas para a coleta de energia e informação luminosa, encontradas em arqueobactérias e eucariotos. Graças às novas técnicas de sequenciamento genético em amostras provindas de organismos de água doce, marinhos, pântanos e mares glaciais, o número de opsinas do tipo 1 conhecido está aumentando rapidamente (atualmente>800). Opsinas tipo 2 são encontradas somente em eucariotos (SPUDICH, 2006; MCCARREN; DELONG, 2007).

Mesmo pertencendo a famílias distintas, existem muitas semelhanças entre opsinas do tipo 1 e do tipo 2. Pois ambas são proteínas de sete domínios transmembrânicos, ambas utilizam uma molécula de retinaldeído associada para a captação da luz, e em ambas o retinaldeído associa-se à proteína por meio de uma ligação do tipo base de Schiff a um resíduo lisina na sétima alça transmembrânica da proteína. As opsinas do tipo 1 diferem em espaço físico e na distribuição dos seus domínios intermembranosos em relação às opsinas

tipo 2, o que se reflete em diferentes cascatas de sinalização. As opsinas do tipo 1 funcionam dentro da membrana para bombear íons ou sinalizar via outras proteínas integrais de membrana diferentemente da sinalização via proteína G, desencadeada pela ativação de opsinas tipo 2.

A descoberta de que não existe uma relação filogenética entre esses dois tipos de opsinas apesar da grande convergência nos detalhes moleculares de funções causou estarrecimento na comunidade científica, e culminou na hipótese de que o mecanismo fundamental para detecção luminosa via opsinas associadas ao retinaldeído, foi descoberto e explorado independentemente duas ou mais vezes pelos seres vivos (FERNALD, 2006).

Os progenitores das opsinas tipo 1 provavelmente existiram no início da evolução, antes da divergência entre eubactérias, arqueobactérias e eucariotos, o que significa que o mecanismo de transporte de íons, que usa energia luminosa em associação com as opsinas tipo 1, precede a evolução da fotossíntese como meio de utilizar a energia luminosa. As opsinas já estavam presentes nos animais antes mesmo da divisão destes em protostômios e deuterostômios e o tamanho de cada família de opsinas está crescendo rapidamente conforme os pesquisadores investigam organismos não tradicionalmente pesquisados em lugares inusitados.

O espectro de absorção destes fotopigmentos é modulado por um pequeno número de aminoácidos adjacentes ao sítio de ligação do cromóforo no domínio transmembrânico das opsinas, onde os efeitos da seleção natural são mais evidentes.

Muitos genes de opsinas recém descobertos, assim como novos genes de outras famílias específicas para a fototransdução, como por exemplo, proteínas heterotriméricas ligadoras de guanina (proteínas G), e canais dependentes de ligação a nucleotídeos, surgiram cedo na evolução dos vertebrados, durante extensivas duplicações cromossômicas que ocasionaram o surgimento de tecidos especializados na captura da informação luminosa como ocelos, olhos e retinas (ARENDT; WITTBRODT, 2001).

Células fotorreceptoras

Até há pouco tempo, os fotorreceptores eram classificados como fotorreceptores de vertebrados (ciliares) e fotorreceptores de invertebrados (rabdoméricos). Essa classificação era baseada nas diferentes vias de sinalização, morfologia e especializações das células fotorreceptoras encontradas exclusivamente em vertebrados e em invertebrados. Recentemente esse conceito foi alterado, pois fotorreceptores rabdoméricos foram encontrados em vertebrados, assim como fotorreceptores ciliares foram encontrados em invertebrados (PROVENCIO *et al*., 1998; 2002; ARENDT *et al*., 2004; ISOLDI *et al*., 2005).

Os fotorreceptores ciliares utilizam membros da família de opsinas ciliares (c-opsinas) incorporadas em cílios especializados, enquanto os fotorreceptores rabdoméricos utilizam membros da família de opsinas rabdoméricas (r-opsinas) que são encontradas em rabdômeros. Cada tipo de receptor utiliza proteínas G diferentes em sua via de sinalização. A proteína Gαt (transducina) é utilizada em fotorreceptores ciliares de vertebrados, a proteína Gαo em fotorreceptores ciliares do molusco *Pecten* e a proteína Gq em fotorreceptores rabdoméricos de vertebrados e de invertebrados. Fotorreceptores ciliares produzem potenciais de membrana hiperpolarizantes por meio de uma cascata que se inicia com a ativação de uma fosfodiesterase por Gαt. Já os fotorreceptores rabdoméricos são despolarizantes e utilizam uma cascata que se inicia com a ativação de uma fosfolipase C. O sítio de amplificação dos sinais bioquímicos, assim como o mecanismo que termina a resposta fisiológica é diferente entre esses dois tipos de opsinas. Além disso, o cromóforo das opsinas rabdoméricas nunca se separa da proteína, sendo regenerado *in situ* por um comprimento de onda diverso do comprimento responsável pelo estímulo da opsina, enquanto que, nas opsinas ciliares o cromóforo é re-isomerizado em tecidos exógenos (GÄRTNER; TOWNER, 1995; VOUGHT *et al*., 2000). Atualmente parece claro que esses dois tipos de fotorreceptores surgiram independentemente e coexistiram nos urobilatérios antes do surgimento dos bilatérios (ARENDT; WITTBRODT, 2001; ARENDT *et al*., 2004; FERNALD, 2006).

As opsinas ciliares capazes de responder a estímulos luminosos são encontradas embebidas na bicamada lipídica dos discos membranosos ciliares que compõem o segmento externo das células fotorreceptoras da retina dos vertebrados. Quando um fóton atinge o segmento externo dos fotorreceptores, o 11-*cis*-retinal é isomerizado para a forma all-*trans* causando as alterações conformacionais na molécula da proteína, o que inicia a sinalização. A partir de então muitas moléculas intermediárias são formadas; entre elas, a metarodopsina II, que ativa a proteína trimérica G que libera sua subunidade α chamada de transducina, ativando a cascata de sinalização resumida da seguinte forma:

Fótons → rodopsina → rodopsina ativada (metarodopsina II) → uma proteína ligadora de GTP (transducina) → uma enzima que hidroliza GMPc (GMPc-fosfodiesterase) → fechamento de canais iônicos ao se desligarem de GMPc (HARGRAVE; MCDOWELL, 1992a, b).

Na ausência de iluminação, correntes iônicas geradas principalmente por íons Na^+ atravessam canais iônicos na membrana do segmento externo dos fotorreceptores que permanecem abertos nesta condição. Essas correntes são chamadas de correntes-de-escuro, e despolarizam a membrana das células fotorreceptoras. Sendo assim os fotorreceptores despolarizados liberam neurotransmissores (glutamato) em seus terminais sinápticos em neurônios de segunda ordem. Sob estímulo luminoso as moléculas de rodopsina são isomerizadas para a forma ativa levando ao fechamento dos canais iônicos que interrompem o fluxo da corrente de escuro, causando uma hiperpolarização dos fotorreceptores que então deixam de liberar neurotransmissores para os neurônios de segunda ordem (STRYER, 1991).

A corrente-de-escuro é composta principalmente pelo influxo de Na^+ (80%), porém íons Ca^{2+} (15%) e Mg^{2+} (5%) também estão presentes. No escuro, um trocador de sódio/cálcio é responsável pela remoção do excesso de sódio e de cálcio. Sabe-se hoje que o cálcio, mesmo não sendo responsável pela sinalização ativada pela rodopsina, exerce uma função de segunda ordem muito importante para a transdução do sinal luminoso, pois ele aumenta a capacidade sinalizadora dos fotorreceptores, acelerando a recuperação após a

iluminação, e regula a sensibilidade dos fotorreceptores sob iluminação constante sendo então um importante mecanismo de adaptação luminosa (YAU, 1994; KOUTALOS *et al*., 1995; KOUTALOS; YAU, 1996).

A fototransdução rabdomérica apresenta semelhanças e diferenças notáveis em relação à ciliar, pois assim como na ciliar, a via de transdução é iniciada pela isomerização da opsina induzida por luz, e pela interação dessa proteína com a proteína trimérica ligadora de GTP (proteína G). Porém nos fotorreceptores rabdoméricos, ao invés da opsina se ligar à proteína G transducina que irá ativar uma fosfodiesterase de GMPc, a opsina se liga a uma proteína Gq que ativa a fosfolipase C (PLC), que então catalisa a conversão de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) a inositol-1, 3,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). A produção de DAG, em insetos, leva à abertura de canais iônicos TRP que ocasionam o influxo de Na^+ e de Ca^{2+}. Já em *Limulus*, o IP_3 libera cálcio de compartimentos intracelulares, o qual, combinado à calmodulina, ativa uma guanilato ciclase aumentando a concentração intracelular de GMPc. O aumento de GMPc ocasiona a abertura de canais de sódio dependentes de nucleotídeos cíclicos, gerando a despolarização da membrana celular (MONTELL, 1999; ARENDT; WITTBRODT, 2001; ARENDT, 2003).

Fotorreceptor circadiano

A hipótese de que um fotopigmento até então desconhecido, e diferente das opsinas visuais clássicas, seria necessário para a captura de luz pelo sistema circadiano de mamíferos, originou-se do fato de que camundongos *rd* sofrendo de degeneração da retina, com a ausência de bastonetes (e quase total de cones) ainda apresentarem um efeito robusto de entrada de luz no sistema circadiano, além de pessoas cegas continuarem com a capacidade de sincronizar seus ritmos por ciclos de claro-escuro (FOSTER *et al*., 1991; DAVID-GRAY *et al*., 1998; FREEDMAN *et al*., 1999; LUCAS *et al*., 1999; BELLINGHAM; FOSTER, 2002).

Percebeu-se, então, que os mecanismos responsáveis pelo ajuste fótico do sistema circadiano poderiam resultar de uma complexa, mas ainda não

esclarecida série de processos envolvendo diferentes pigmentos fotorreceptores e relógios celulares (GUIDO *et al*., 2002). Dentre o grupo de pigmentos fotoativos recém-descobertos, a melanopsina *Opn4* provou exercer esta função de ajuste fótico do sistema circadiano de mamíferos (PANDA *et al*., 2002, 2003; PEIRSON; FOSTER, 2006; FOSTER *et al.*, 2007; HANKINS *et al*., 2007).

A descoberta da melanopsina (*Opn4*) ocorreu a partir da pesquisa do mecanismo de migração de grânulos de pigmento, em resposta à iluminação, em melanóforos de *Xenopus leavis* (PROVENCIO *et al*., 1998). Como outras opsinas, a melanopsina possui um resíduo lisina no sétimo domínio transmembrânico, que é necessário para a formação de uma base de *Schiff* com o 11-*cis*-retinaldeído (EBREY; KOUTALOS, 2001; YEAGLE *et al*., 2001). Porém a melanopsina assemelha-se muito às opsinas rabdoméricas, tanto que segrega junto com essas opsinas em análise cladística de seqüências de nucleotídeos (PROVENCIO *et al*., 1998; BELLINGHAM; FOSTER, 2002). Essa semelhança estrutural a opsinas rabdoméricas é bem demonstrada pelo resíduo aromático tirosina, no sítio em que o retinaldeído forma a base de *Schiff*, pois a maioria das opsinas ciliares emprega um resíduo ácido neste sítio, geralmente glutamina (EBREY; KOUTALOS, 2001).

A melanopsina é expressa na retina em todas as classes de vertebrados examinadas até o momento, sendo encontrada desde peixes até mamíferos (BELLINGHAM; FOSTER, 2002; BELLINGHAM *et al.*, 2002; HANNIBAL; FAHRENKRUG, 2002; HANNIBAL *et al.*, 2004) além de protocordados como anfioxos e ascídias (KOYANAGI *et al*., 2005; KUSAKABE; TSUDA, 2007).

Nos mamíferos, uma subpopulação de células da camada ganglionar da retina de camundongos é imunopositiva para melanopsina, que está presente não só no corpo celular, mas também na árvore dendrítica e axônios destes neurônios. De todas as células imunopositivas, 95% estão localizadas na camada ganglionar e suas projeções dendríticas formam, nos camundongos, 2 plexos, um na camada plexiforme interna e outro na externa. Os outros 5% de células imunopositivas estão distribuídos na camada amácrina da retina, mas constituem células ganglionares deslocadas (PROVENCIO *et al*., 2002, BERSON *et al*., 2009). O padrão de expressão de melanopsina difere entre as classes de vertebrados, no entanto sua presença em células ganglionares da

retina é constante. Na retina de *Gallus gallus,* este padrão de expressão difere do que é encontrado em mamíferos, pois um número muito pequeno de células que expressam melanopsina foi visto na camada das células ganglionares, enquanto que um número muito grande de células que expressam melanopsina foi encontrado na camada nuclear interna, tanto por hibridização *in situ* (CHAURASIA *et al*., 2005) como por ensaio imunocitoquímico (LIMA *et al*., 2006). Além disso, a expressão de melanopsina na retina de *Gallus gallus* foi constatada a partir do sétimo dia embrionário (TOMONARI *et al*., 2005; 2007).

O fato de a luz depender de fotorreceptores oculares para entrar no sistema circadiano dos mamíferos (YAMAZAKI *et al*., 2002), e de que uma pequena população de células ganglionares contendo melanopsina, além do polipeptídio ativador de adenilil ciclase da pituitária (HANNIBAL *et al*., 1997; 2002) ser intrinsecamente fotossensível (BERSON *et al*., 2002) sugeriu que a melanopsina teria uma função crítica no sistema circadiano de mamíferos. De fato, utilizando camundongos *knock out* para melanopsina e *rdrd,* Provencio e colaboradores demonstraram que as células ganglionares fotossensíveis são essenciais para o ajuste do relógio aos ciclos de claro-escuro, e também para respostas fóticas não visuais, como constrição pupilar e supressão de melatonina (PANDA *et al*., 2002; 2003). Em melanóforos de *Xenopus leavis* foi demonstrado que a ativação da melanopsina induzida por luz é máxima em um comprimento de onda de 470 nm, e que essa ativação inicia uma cascata de eventos que resulta na liberação de cálcio e IP_3, e na ativação de PKCβ. Em última instância, leva ao aumento de Ca^{2+} citossólico e aumento de GMPc (ISOLDI *et al*., 2005). A literatura é controversa quanto à fonte de cálcio. Para aguns, cálcio origina-se de compartimentos intracelulares (KUMBALASIRI *et al*., 2007), para outros do meio externo através de canais TRP6 ou TRP7 (WARREN *et al*., 2006; SEKARAN *et al*., 2007). Em cultura de células ganglionares de rato que expressam melanopsina, a resposta à luz é inibida em 90% por tetrodotoxina, o que indicaria que a maior parte de Ca^{2+} entra na célula através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (HARTWICK *et al*., 2007).

Em 2006, Bellingham e colaboradores, intrigados com a baixa homologia entre a melanopsina de mamíferos e a originalmente clonada de melanóforos de *Xenopus laevis*, realizaram um estudo que culminou com a descoberta de

um outro gene que codifica para uma nova melanopsina em vertebrados não mamíferos. Neste mesmo estudo, os autores relatam que a melanopsina recém-descoberta apresenta uma maior homologia com a melanopsina de mamíferos do que com a melanopsina de *Xenopus leavis.* Como os mamíferos expressam apenas um tipo de melanopsina, essa nova melanopsina seria o verdadeiro ortólogo da melanopsina de mamíferos. Em razão dessas observações, os autores criaram uma nova nomenclatura para melanopsinas (*Opn4*). A melanopsina descoberta em *Xenopus leavis* passou a ser chamada de *Opn4x*, e a nova melanopsina que é expressa nos vertebrados mamíferos e não mamíferos passou a ser *Opn4m* (BELLINGHAM *et al*., 2006).

Ritmos Neuroquímicos

A melatonina é considerada um marcador retiniano por agir localmente como um sinal noturno que regula aspectos específicos da fisiologia da retina de forma circadiana (IUVONE *et al*., 1999). As flutuações diárias na produção de melatonina pela glândula pineal e pela retina são observadas tanto *in vivo* como em culturas de células, e refletem alterações na atividade da N-acetiltransferase (NAT), enzima chave na síntese de melatonina (BERNARD *et al*., 1997; IUVONE *et al*., 1997; BERNARD *et al*., 1999).

Os receptores de melatonina pertencem à família de receptores acoplados a proteína G (REPPERT, 1997) que, quando estimulados, levam à inibição da enzima adenilil ciclase. Na retina de galinha, o RNAm dos receptores Mel1A, Mel1B e Mel1C está presente no segmento interno dos fotorreceptores, na camada nuclear interna e na camada de células ganglionares. Mel1A é expresso de forma rítmica tanto em regime de fotoperíodo claro-escuro, como em escuro constante, e seu pico de expressão ocorre ao meio dia e no meio dia subjetivo quando em escuro constante. Em regime de fotoperíodo claro-escuro, Mel1C também é rítmico, porém com uma amplitude menor. Sua transcrição é alta durante o dia e baixa durante a noite. Em escuro constante, os ritmos de Mel1C ficam 180° fora de fase, apresentando um pequeno aumento durante a noite subjetiva. A expressão de Mel1B é altamente variável e arrítmica (ADACHI *et al*., 2002; NATESAN;

CASSONE, 2002).

Na retina, a melatonina ativa a renovação dos discos membranosos dos bastonetes de *Xenopus* e de ratos (BESHARSE; DUNIS, 1983; BESHARSE *et al*., 1984; WHITE; FISHER, 1989), entretanto a melatonina não é essencial para esse fenômeno em camundongos (GRACE *et al*., 1999). A melatonina também promove aumento no comprimento de cones no escuro na retina de *Xenopus* (PIERCE; BESHARSE, 1985). Ela hiperpolariza e aumenta a resposta das células horizontais à luz (WIECHMANN *et al*., 1988). Na camada interna da retina de vertebrados mamíferos e não mamíferos, a melatoninia inibe a liberação de dopamina (DUBOCOVICH, 1983; DUBOCOVICH; TAKAHASHI, 1987; BOATRIGHT *et al*., 1994; ADACHI *et al*., 1999) e acetilcolina (MITCHELL; REDBURN, 1991). Em contraste, a melatonina aumenta a liberação de glutamato (FAILLACE *et al*., 1996; IUVONE *et al.,* 2005).

Em oposição à melatonina, a dopamina retiniana é sintetizada e liberada com picos diurnos nas diferentes espécies de vertebrados examinados (BESHARSE; IUVONE, 1992; DJAMGOZ; WAGNER, 1992; NIR *et al*., 2000; MANGEL, 2001). Na retina, a dopamina é produzida e liberada por células amácrinas e interplexiformes (DOWLING; EHINGER, 1978; HEDDEN; DOWLING, 1978) e inibe a síntese e liberação de melatonina pela ativação de receptores do tipo D2 (IUVONE; BESHARSE, 1986; CAHILL; BESHARSE, 1991; BESHARSE; IUVONE, 1992; ADACHI *et al.*, 1998; 1999). Por outro lado, a produção de melatonina nos fotorreceptores inibe a liberação de dopamina (DUBOCOVICH, 1983). Esses e outros estudos sugerem a dopamina e a melatonina como potentes moduladores da fisiologia rítmica da retina (PIERCE; BESHARSE, 1985; 1987; MANGLAPUS *et al*., 1999). A luz modula positivamente a liberação de dopamina, assim como a atividade da enzima chave na sua síntese, a tirosina hidroxilase (BESHARSE; IUVONE, 1992; DJAMGOZ; WAGNER, 1992). As variações diárias no conteúdo de dopamina da retina (WIRZ-JUSTICE *et al*., 1984; McCORMACK; BURNSIDE, 1991; 1992; 1993) junto com o conhecimento da expressão de *Per1* em células amácrinas dopaminérgicas sugerem o controle do metabolismo de dopamina por um relógio local (WIRZ-JUSTICE *et al*., 1984; McCORMACK; BURNSIDE, 1991, 1992; 1993; WITKOVSKY *et al*., 2003). Um estudo recente mostrou que os ritmos de dopamina influenciam positivamente a expressão gênica da

melanopsina pela ativação de receptores D_2 em mamíferos (SAKAMOTO *et al*., 2005).

A dopamina age através de cinco subtipos de receptores D1-D5 (GINGRICH; CARON, 1993; SEEMAN; VANTOL, 1994), todos eles pertencentes à família de receptores acoplados a proteína G. Estes receptores por sua vez podem ser agrupados em duas subfamílias: receptores D1, que incluem os receptores D1R e D5R, e receptores D2R, que incluem os receptores D2R, D3Re D4R. Estes receptores estão acoplados a diferentes proteínas G sugerindo que eles ativam diversas cascatas de sinalização, mas a principal diferença entre as duas subfamílias é que os receptores da família D1, quando ativados, levam à ativação da adenilil ciclase e aumento de AMPc, enquanto que os receptores da família D2 levam à inibição da adenilil ciclase e queda de AMPc. Estudos imunocitoquímicos e autorradiográficos mostraram que os receptores D5 são expressos no epitélio retiniano pigmentar (VERSAUX-BOTTERI *et al*., 1997) e que tanto cones como bastonetes expressam receptores da família D2 (MURESAN; BESHARSE, 1993), os quais são do tipo D4 em camundongos. Células bipolares, horizontais, amácrinas e ganglionares possuem receptores D1 (VERUKI; WÄSSLE, 1996; NGUYEN-LEGROS *et al.,* 1997; WITKOVISKY, 2004). Receptores dopaminérgicos ainda não foram suficientemente caracterizados em outras espécies (WITKOVISKY, 2004).

Glutamato é considerado o mais importante neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC), incluindo a retina (OZAWA *et al*., 1998). A concentração desse neurotransmissor no SNC deve-se à neo-síntese local a partir da glicose, pois esse neurotransmissor que também é um aminoácido não atravessa a barreira hemato-encefálica. A síntese do glutamato ocorre pela trans-aminação do α-cetoglutarato do ciclo de Krebs, ou alternativamente pela conversão de glutamina, que é fornecida pelas células da glia, em glutamato pela enzima glutaminase. Os receptores de glutamato (GluRs) são separados em duas classes principais: ionotrópicos (iGluRs) e metabotrópicos (mGluRs) (CONN; PIN, 1997).

Todos os iGluRs são canais catiônicos não seletivos e carregam os nomes de seus agonistas: *α-amino-3hydroxy-5methyl-4-iso-xazole-propionic acid* (AMPA), *Kainate* (KA) e N-methyl-D-aspartate (NMDA) (BLEAKMAN;

LODGE, 1998). Os receptores do tipo não-NMDA (AMPA e KA) são permeáveis ao Na^+ e ao K^+, mas não ao Ca^{2+}, a ativação desses receptores causa a despolarização da membrana. Os receptores NMDA, além de serem permeáveis ao Na^+, são característicos por apresentarem permeabilidade ao Ca^{2+}, e dependência de voltagem mediada pelo influxo de íons através destes canais. Receptores NMDA quando ativados produzem alterações de longa duração nos neurônios pós-sinápticos (*long lasting changes*). Dezesseis cDNAs para subunidades GluR foram identificadas por clonagem molecular (DANI; MAYER, 1995). NMDAs são formados por cinco dessas subunidades (NR1, NR2A até NR2D), enquanto que receptores AMPA e KA são formados por subunidades GluR1-GluR4 e GluR5-GluR7, respectivamente (CONN; PIN, 1997).

Os mGluRs são receptores acoplados a proteína G e, portanto, possuem os típicos sete domínios transmembrânicos. Porém, ao contrário das outras famílias de receptores metabotrópicos, cujo sítio ligante situa-se nas porções mais externas das alças transmembânicas, o sítio para o glutamato fica no grande domínio extracelular N-terminal (CONN; PIN, 1997). Foram identificados oito diferentes mGluRs (mGluR1-mGluR8), e eles estão subdivididos em três grupos com base na homologia de suas seqüências, e na capacidade de ligar sistemas enzimáticos específicos. O grupo I de mGluRs (mGlur1 e mGluR5) ativa uma fosfolipase C. O grupo II (mGlur2 e mGluR3) e o grupo III (mGluR4,6-8) ambos inibem a atividade da adenilil ciclase, reduzindo a produção de AMPc, porém esses grupos ativam diferentes subtipos de proteína G (CONN; PIN, 1997).

O glutamato é o neurotransmissor dos neurônios da via de sinalização vertical da retina. Todos os tipos de fotorreceptores, cones e bastonetes utilizam o glutamato para transmitir os sinais visuais para os neurônios subseqüentes da via de transmissão do sinal (MASSEY; MILLER, 1990). A captação, a liberação e a ação do glutamato e seus agonistas em neurônios de segunda ordem em preparações de cortes de retina ou em células isoladas de retina em cultura confirmaram que o glutamato é o neurotransmissor que age na primeira sinapse da retina (LASATER, 1991). A ação do glutamato em neurônios de segunda ordem ocorre por meio de dois mecanismos. O primeiro é a ativação do receptor metabotrópico mGluR6, que utiliza GMPc numa

cascata de sinalização para ativação das células bipolares de centro ON, enquanto o segundo tipo envolve pelo menos dois tipos de receptores ionotrópicos AMPA e íons Na^+ para ativação das células bipolares de centro OFF e células horizontais (SLAUGHTER; MILLER, 1981; 1983a, b, c; NAWY; JAHR, 1990a, b).

O glutamato também é considerado o neurotransmissor de todas as células amácrinas e ganglionares na retina dos vertebrados (MARC *et al.*, 1995; KALLONIATIS *et al.*, 1994).

A distribuição dos receptores (subunidade/subtipo) de glutamato na retina de vertebrados é alvo de estudo de muitos laboratórios, e em diferentes animais. Além disso, foram desenvolvidas diferentes técnicas para o estudo da função, localização e da caracterização desses receptores. Um resumo desses trabalhos é apresentado nas tabelas 1, 2 e 3 retiradas do site www.webvision.med.utah.edu.

Tabela 1- Receptores de glutamato em neurônios retinianos analisados por eletrofisiologia

				Glutamate		
ON-bipolar cells	++	**NMDA**	++(APB)	**receptor with**	mudpuppy	Slaughter ; Miller, 1981, 1983
retinal cell type	**non-NMDA receptor**	**receptor**	**mGluR**	**transporter-like pharmacology**	**species**	**references**
			++(APB)	++	white perch	Grant ; Dowling, 1995, 1996
photoreceptors			++(APB)	++ (cones)	salamander salamander	Hirano ; MacLeish, 1991 Eliasof ; Werblin, 1993; Picaud *et al.*, 1995
			++(L-AP4)		salamander	Hensley *et al.*, 1993
			++(AP-4)	++ (rods)	rat	Euler *et al.*, 1996
			++(APB and cGMP)		salamander	Nawy ; Jahr, 1990
OFF-bipolar cells	++		++(APB and cGMP)		mudpuppy cat	Slaughter ; Miller, 1981, 1983 de la Villa *et al.*, (1995)
	++				cat	Sasaki ; Kaneko, 1996
horizontal cells	++ ++				salamander white perch	Hensley *et al.*, 1993 Zhou *et al.*, 1993
	++ ++				rat mudpuppy	Euler *et al.*, 1996 Slaughter ; Miller, 1983
	++				mudpuppy	Slaughter ; Miller, 1983

	++				salamander	Yang ; Wu, 1991
	++	++			catfish	O'Dell ; Christensen, 1989; Eliasof ; Jahr, 1997
amacrine cells	++(AII)				rat	Boos *et al*., 1993
	++	++			mudpuppy	Slaughter ; Miller, 1983
	++	++			rabbit	Massey ; Miller, 1988
	++	++			rat	Hartveit ; Veruki, 1997
	++ (transient ; sustained AC)	++ (transient AC)			salamander	Dixon ; Copenhagen, 1992
ganglion cells	++	++			salamander	Diamond ; Copenhagen, 1993; Mittman *et al*., 1990; Hensley *et al*., 1993
	++	++			primates	Cohen ; Miller, 1994
	++	++			rat	Aizenman *et al*., 1988
	++	++			mudpuppy	Slaughter ; Miller, 1983
	++	++			cat	Cohen *et al*., 1994
	++	++			rabbit	Massey ; Miller, 1988; 1990

Tabela 2 - Expressão de receptores ionotrópicos em neurônios retinianos analisados por imunocitoquímica e hibridização *in situ*

cell type layer	non-NMDA receptor subunits	NMDA receptor subunits	species	references
photoreceptors	GluR6/7 (single cone outer segments)		goldfish	Peng *et al*., 1995
	GluR1 (cone pedicles)		cat	Pourcho *et al*., 1997

OPL	GluR2, GluR2/3, GluR6/7		rat	Peng *et al*., 1995
		NR2A (punctate)	cat	Hartveit *et al*., 1994
	GluR2, GluR2/3 (photoreceptors)		goldfish	Peng *et al*., 1995
bipolar cells	GluR2 (Mb cells)		goldfish	Peng *et al*., 1995
	GluR2, GluR2/3		rat	Peng *et al*., 1995
		NR2D (RBC)	rat	Wenzel *et al*., 1997
	GluR2 and/or GluR4	NR1 (RBC)	rat	Hughes, 1997
	GluR2 (RBC)		rat	Hughes *et al*., 1992
horizontal cells	GluR6/7		goldfish	Peng *et al*., 1995
	GluR2/3		cat	Pourcho *et al*., 1997
INL	GluR2/3, GluR6/7		rat	Peng *et al*., 1995
		NR2A(inner)	rat	Hartveit *et al*., 1994
	GluR1, 2, 5 > GluR4 (outer third), GluR1, 2, 5 (middle third), GluR1-5 (inner third)		rat	Hughes *et al*. 1992
	GluR1-7		rat, cat	Hamassaki-Britto *et al*., 1993
	KA2 (homogenous), GluR6 (inner), GluR7 (inner two thirds)	NR1 (homogenous), NR2A-B (inner third, patchy), NR2C (inner two-thirds)	rat	Brandstatter *et al*., 1994
IPL	GluR1, GluR2/3, GluR6/7		rat	Peng *et al*., 1995
		NR2A	rat, cat, rabbit, monkey	Hartveit *et al*., 1994
amacrine cells	GluR6	NR2A-C	rat	Brandstatter *et al*., 1994
	GluR2/3		cat	Pourcho *et al*., 1997

	GluR1, GluR2/3		rat	Peng *et al.*, 1995
ganglion cells	GluR1		rat	Peng *et al.*, 1995
GCL	GluR2/3, GluR6/7		rat	Peng *et al.*, 1995
	GluR1-5		rat	Hughes *et al.*, 1992
	GluR1-7		rat, cat	Hamassaki-Britto *et al.*, 1993
	GluR6-7, KA2	NR1, NR2A-C	rat	Brandstatter *et al.*, 1994
Muller cells	GluR4		rat	Peng *et al.*, 1995

Tabela 3 - Expressão de receptores metabotrópicos em neurônios retinianos analisados por imunocitoquímica e hibridização *in situ*

retinal cell type or layer	Group 1	Group II	Group III	species	references
OPL	mGluR1alpha, mGluR5a (RBC dendrites)			rat	Koulen *et al.*, 1997
			mGluR6 (RBC dendrites)	rat	Nomura *et al.*, 1994
INL			mGluR8	mouse	Duvoisin *et al.*, 1995
			mGluR6	rat	Nakajima *et al.*, 1993
	mGluR5 (BC, HC), mGluR1 (AC)	mGluR2 (AC)	mGluR6 (RBC), mGluR7 (BC), mGluR4,7 (AC)	rat	Hartveit *et al.*, 1995
IPL	mGluR1alpha			rat	Peng *et al.*, 1995
			mGluR7 (CBC terminals; AC dendrites; few GC dendrites)	rat	Brandstatter *et al.*, 1996

	mGluR1alpha, mGluR5a (AC dendrites)			rat	Koulen *et al*., 1997
amacrine cells	mGluR1alpha			rat	Peng *et al*., 1995
	mGluR1alpha	mGluR2/3		cat	Pourcho *et al*., 1997
ganglion cells	mGluR1alpha			rat	Peng *et al*., 1995
GCL			mGluR8	mouse	Duvoisin *et al*., 1995
	mGluR1alpha	mGluR2/3		cat	Pourcho *et al*., 1997
	mGluR1	mGluR2	mGluR4, 7	rat	Hartveit *et al*., 1995

OBJETIVO GERAL

Investigar a fisiologia circadiana da retina de aves.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os ciclos de expressão de *Clock, Per2, Opn4x, Opn4m, NAT* e *TH* em cultura de células de retina de embrião de galinha em escuro constante, e em condições cíclicas de iluminação.

- Avaliar os ciclos de síntese de dopamina e melatonina, para identificar se estes são governados por condições cíclicas de iluminação, ou por mecanismo de relógio molecular na retina.
- Avaliar os efeitos da administração de glutamato sobre a expressão de *Clock, Per2, Opn4x, Opn4m, NAT* e *TH* e sobre a síntese de dopamina e melatonina na retina.

MATERIAL E MÉTODOS

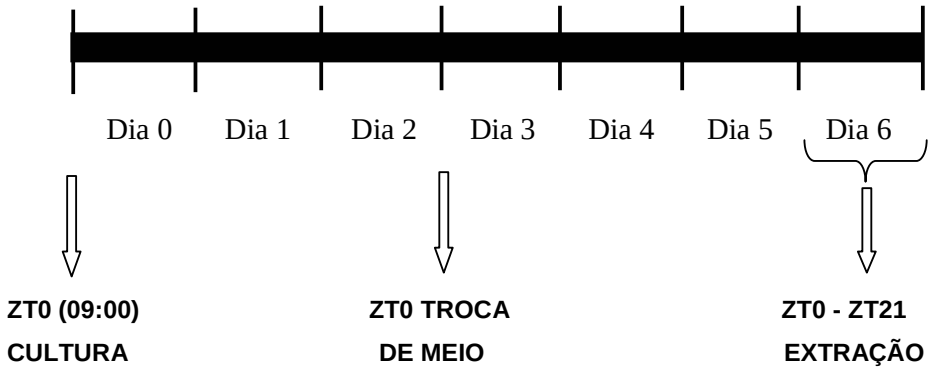
Cultura de células de retina

Ovos embrionados de *Gallus gallus* foram mantidos em temperatura de 37^0 C, em atmosfera umidificada e sob regime fotoperiódico de 12 h de claro (~450 lux) e 12 h de escuro, até o oitavo dia embrionário. As culturas foram feitas de acordo com De Mello e colaboradores (1982), com algumas modificações baseadas nos trabalhos de Paes-de-Carvalho (PAES-DE-CARVALHO *et al*., 2003) e Haque (HAQUE *et al*., 2003). Passamos a utilizar 1 % de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e um inibidor de transportador de adenosina. Efetuamos a troca de meio a cada 72 h, sempre às 09:00 horas da manhã, horário que corresponde ao ZT0 (Zeitgeber Time 0), hora em que se inicia a fase clara tanto do período de incubação do ovo embrionado, como das demais fases do projeto em que as culturas foram submetidas a condições cíclicas de iluminação. As retinas foram dissecadas em solução fisiológica tamponada com fosfato, sem cálcio e magnésio (CMF). Após adição de tripsina (0,05 %), as preparações foram incubadas a 37^0 C por 15 min, após os quais o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 3 mL de meio DMEM (Gibco, E.U.A) complementado com 1 % de estreptomicina e penicilina (Gibco, E.U.A.), 1 % de soro fetal bovino, retinaldeído *all*-trans (Sigma, E.U.A.) 10^{-8} M e inibidor do transportador de adenosina S-(4-Nitrobenzil)-6-tioinosina (NBTI, Sigma, E.U.A.) 5 µM, por retina obtida. O tecido foi então dissociado mecanicamente por 15 a 20 aspirações sucessivas com pipeta de vidro de 5 mL. A suspensão foi diluída de modo a obter-se um número de células aproximado de 10^7 em 6 mL do meio acima descrito, sendo então transferida para garrafa de cultura de 25 cm^2 previamente submetida a tratamento com poli-D-Lisina (Sigma, E.U.A.). As células foram mantidas em estufa a 40^0 C em atmosfera umidificada com 5 % de CO_2 em escuro constante, ou em fotoperíodo de 12 h de claro (~450 lux) por 12 h de escuro. A troca de meio foi realizada a cada 72 h; no escuro foi utilizada luz vermelha de baixa intensidade (~5 lux), proveniente de um iluminador Konex com lâmpada vermelha de 7 W e

com filtro Safe-Light GBX-2 (Kodak, Brasil). As culturas foram utilizadas no sexto dia de cultivo, para que houvesse uma adaptação às condições de iluminação.

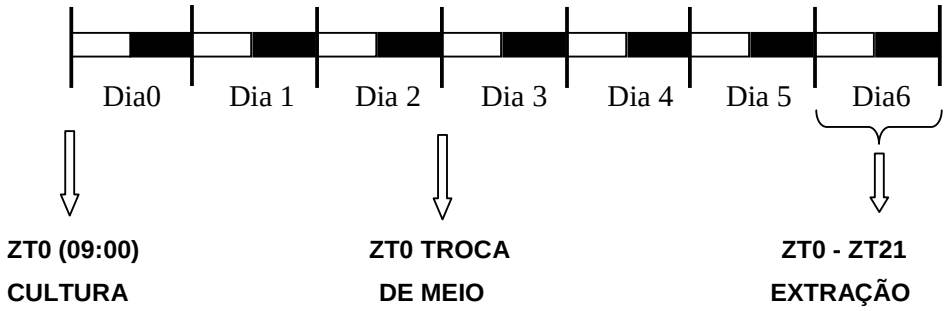
Protocolos de expressão de melanopsinas (*Opn4x e Opn4m*), *Clock*, *Per2*, *N-acetiltransferase* e *tirosina hidroxilase* em escuro constante

As garrafas contendo as células de retina foram mantidas em escuro constante por 5 dias. No sexto dia de cultivo foi realizada a extração do RNA total, ou do conteúdo protéico total das culturas (duas garrafas a cada 3 h) ao longo de 24 h. Cada experimento foi repetido duas a quatro vezes.



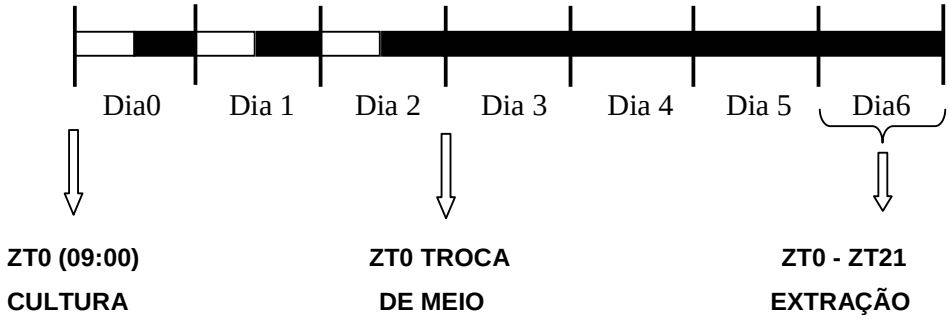
Protocolos de expressão de melanopsinas (*Opn4x e Opn4m*), *Clock*, *Per2*, *N-acetiltransferase* e *tirosina hidroxilase* em ciclo claro-escuro

As garrafas contendo as células de retina foram mantidas em regime de 12 h de claro e 12 h de escuro (12C:12E) por 5 dias. No sexto dia de cultivo foi realizada a extração do RNA total, ou do conteúdo protéico total das culturas (duas garrafas a cada 3 h) ao longo de 24 h. Cada experimento foi repetido duas a quatro vezes.



Protocolos de expressão de melanopsinas (*Opn4x e Opn4m*), *Clock*, *Per2*, *N-acetiltransferase* e *tirosina hidroxilase* em células pré-incubadas em ciclo claro-escuro, seguido de escuro constante

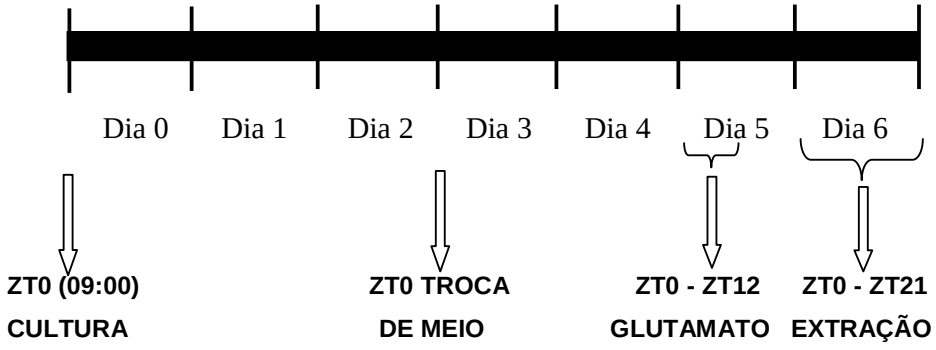
As garrafas contendo as células de retina foram mantidas em regime de 12 h de claro e 12 h de escuro (12C:12E) por 3 dias. No ZT0 do quarto dia o fotoperíodo foi desligado, e a extração do RNA total das culturas (duas garrafas a cada 3 h) ao longo de 24 h teve início no ZT0 do sexto dia. Cada experimento foi repetido duas a três vezes.



Protocolos de expressão de melanopsinas (*Opn4x e Opn4m*), *Clock*, *Per2*, *N-acetiltransferase* e *tirosina hidroxilase* sob o efeito de glutamato

As garrafas contendo as células de retina foram mantidas em escuro constante. No ZT0 do quinto dia de cultivo, metade das células foi submetida a uma troca de meio contendo glutamato (CALBIOCHEM, E.U.A.) 100 µM (grupo tratado), e outra metade foi submetida a uma troca de meio sem glutamato (grupo controle). Em seguida, no ZT12 do mesmo dia, os dois grupos experimentais foram submetidos a nova troca de meio, ambos sem glutamato.

No ZT0 do sexto dia de cultivo, 12 horas após o fim do tratamento (remoção de glutamato), foi realizada a extração do RNA total, ou do conteúdo protéico total das culturas (duas garrafas a cada 3 h) ao longo de 24 h. Cada experimento foi repetido duas a três vezes.



Extração de RNA, RT-PCR (*reverse transcriptase-polimerase chain reaction*) e quantificação de RNAm de melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*), *Clock*, *N-acetiltransferase* e *tirosina hidroxilase* por PCR quantitativo (tempo real)

O meio foi descartado, e adicionou-se 1 mL de *Tri-Reagent-LS* (Sigma, E.U.A.) diretamente sobre as células. O lisado celular foi transferido para um eppendorf e deixado em repouso por 5 min à temperatura ambiente. Ao lisado celular foram adicionados 200 uL de bromo cloro propano (Sigma, E.U.A.) e, após centrifugação a 12.000 x g por 15 min a 4° C, separou-se a fase superior que contém RNA. O RNA foi precipitado com a adição de 650 uL de isopropanol (Sigma, E.U.A.), por 10 min à temperatura ambiente, e em seguida centrifugado a 12.000 x g por 35 min a 4° C. O sobrenadante foi removido, o RNA lavado com 1,3 mL de etanol 75 % (2X), evaporado à temperatura ambiente e ressuspendido em 10 a 50 µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (H_2O DEPC, Ambion Inc., E.U.A.). Para remoção de eventual contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase conforme instruções do fabricante (turbo*DNA-free*^{TM}, Ambion Inc., E.U.A.). Resumidamente, foi adicionado, a cada amostra, 10 % do volume de *10x DNase I Buffer,* 1 µL de *DNAse I*, seguindo-se incubação de 30 min, a 37° C. Logo após, foram acrescentados 3 µL ou 10 % do volume do reagente de inativação da *DNase*, seguindo-se por incubação de 2 min em temperatura ambiente. Após centrifugação (10.000 x g por 2 min), o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo *eppendorf*. A concentração de RNA foi determinada pela leitura em espectrofotômetro (GeneQuant, GE Healthcare Lifesciences, E.U.A. ou Nanodrop, Nanondrop, E.U.A.) em OD260, sendo 1 µg utilizado para transcrição reversa, como descrito a seguir.

Em tubos de 0,2 mL, foram colocados 1 µL de *primers* randômicos (50 ng/ul, Invitrogen, E.U.A.), 1 µg de RNA, 1 uL dNTPs mix (10 mM, Invitrogen, E.U.A.) em relação ao volume final de 13 µL,corrigido com H_2O DEPC. Essa mistura foi agitada e incubada a 65° C por 5 min. Os tubos foram então colocados em gelo, e a cada um adicionados 4 µL de tampão de PCR 5X

(Applied Biosystems, E.U.A.), 1 μL de DTT 0,1 M (Invitrogen), 1 uL de inibidor de ribonuclease 40 U/ul e 1 μL da enzima *Superscript III* (Invitrogen, E.U.A.), para um volume de 20 μL. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada por 5 min a 25° C, e a seguir por 50 min a 50° C. A reação foi finalizada por uma incubação a 70° C por 15 min. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subseqüentes de PCR quantitativo.

Para os ensaios de PCR em tempo real, foram preparadas soluções contendo os *primers* (300 nM para os genes de interesse, 50 nM para RNA 18S), sondas (200 nM para os genes de interesse, 50 nM para 18S), Supermix 2X (100 mM de KCl, 40 mM de Tris-HCl, 1,6 mM de dNTPS, iTaq DNA polimerase 50 U/mL e 6 mM de $MgCl_2$, BioRad Laboratories, E.U.A. ou Invitrogen, E.U.A.) complementados (de acordo com PERSSON *et al*., 2005) para aumentar as concentrações finais, respectivamente, para 6 mM de $MgCl_2$, 0,4 mM de dNTPS, 0,1 U/mL de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) e H_2O para volume final de 30 μL/poço. Para cada amostra de cDNA foram feitas triplicatas com 1 uL de cDNA por poço. Nos experimentos utilizou-se como normalizador o RNA ribossômico 18S, com *primers* desenhados em região altamente conservada. Dessa forma foi quantificada a expressão dos genes: *Clock, Per2 Opn4x e Opn4m N-acetiltransferase e Tirosina Hidroxilase* (Tabela 1), com as seguintes detecções simultâneas de formação de produto de amplificação de cada gene, uma vez que as sondas foram marcadas com diferentes fluoróforos: *Clock, Opn4x, Opn4m e 18S; N-acetiltransferase, Tirosina Hidroxilase e 18S; Per2 e 18S.* Todos os ensaios foram realizados em um termociclador iCycler (BioRad Laboratories, E.U.A.), nas seguintes condições: 1 ciclo a 95°C por 7min; 40 ciclos de 95°C por 30 s, seguidos por 55° C por 30 s.

Tabela 4. Seqüências dos *primers* e *probes* para *Gallus gallus* (desenhados pelo programa Primer Express, Applied Biosystems e sintetizados pela IDT, E.U.A.) utilizados nos ensaios de PCR quantitativo

RNA 18S	***Forward primer***: 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' ***Backward primer***: 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3' **Sonda:** 5'-TexasRed-TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC-BlackHole2-3'
Opn4x	***Forward primer***: 5'-ATTATTCCACTTCCATGACAAAAAGA-3' ***Backward primer***: 5'-CAGCTTCGAGGAACTCTGTAGATG -3' **Sonda:** 5'-/56-FAM/CAATCTGCTGGATTTGGAAGG GCTTAG C/3BHQ_1/-3'
Opn4m	***Forward primer***: 5'-TTAGAACAGCCATTGCAACATATG-3' ***Backward primer***: 5'-ATAACTGCTAAAGGATCGTGACTC-3' **Sonda:** 5'-/5Cy5/ACCCTGCCTTGGATTCCTGCTGAG/3BHQ_2/3'
Clock	***Forward primer***: 5'-AACCGCAACAGTTCCTACAGA -3' ***Backward primer***: 5'-GGAAAGCAGCAGAGAGGATAA-3' **Sonda:** 5'-/5HEX/ATCCAGCTTACTTCAGGGGAATCAG/3BHQ_2/3'
Per2	***Forward primer***: 5'- AGCAAATGCAGAAACTACAACCA-3' ***Backward primer***: 5'- CAACAGTCTTTGGCAGTCCACCTT-3' **Sonda:** 5'-/56-FAM/AGCTTATTGAAGTTCATCCATGGATCCAGC/3BHQ_1/-3'
NAT	***Forward primer***: 5'-CGAGATCGAGAGGGAAGC-3' ***Backward primer***: 5'-GGATCTCATCCAGGTGCAGC -3' **Sonda:** 5'-/5Cy5/TCATCTCCGTCTCCGGTGACTGCC /3BHQ_2/-3'
TH	***Forward primer***: 5'- GACATTTGAAGCTAAAATCCACCA-3' ***Backward primer***: 5'-CCAGTTCAGCAGTCCCTTCAC -3 **Sonda:** 5'-/5HEX/TTGGAGACAAGACTCAGCCGA AAG CC/3BHQ_1/-3'

A análise dos dados foi feita pela comparação entre os valores de fluorescência nos diferentes ciclos, obtidos nas porções de crescimento geométrico das curvas passando-se uma reta limiar que cruza essas porções. Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (C_T), foi encontrado o ΔC_T que é a diferença entre os valores médios do gene de interesse e do RNA 18S. A seguir, foram subtraídos os valores médios dos poços de menor expressão no escuro constante dos valores médios encontrados para os poços ou, nos experimentos com glutamato, os valores médios de menor expressão dos poços provenientes de células não tratadas foram subtraídos dos valores encontrados nos poços contendo cDNA de células tratadas com glutamato, obtendo-se o $\Delta\Delta C_T$. Esse valor foi colocado

como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$), obtendo-se assim o número de vezes que o gene estava expresso nos vários ZTs, em relação ao ZT de menor expressão no escuro, ou ao ZT de menor expressão nas células não tratadas (controle).

Determinação da presença da proteína melanopsina OPN4x por ensaio imunocitoquímico

Anticorpos anti-melanopsina OPN4x de galinha imunopurificados (Mel1 e Mel 2, Bethyl Laboratories, E.U.A., gentilmente cedidos por Dr. Artesan Natejan) foram desenvolvidos em coelhos inoculados com 20 e 16 aminoácidos, respectivamente de uma seqüência intramembrânica (SSSLRQKRDLLPDSYSCSEE) e da seqüência C-terminal (LSSSTEFLEAVEKFLS) da melanopsina OPN4x de *Gallus gallus,* conjugadas com a proteína *keyhole limpet* hemocianina.

As células de retina foram semeadas em lâminas imediatamente após o procedimento de obtenção das culturas e, após um período de seis dias em estufa a 40^0 C em atmosfera umidificada com 5 % de CO_2 sob 14 h de claro (~450 lux) por 10 h de escuro, foram processadas como descrito a seguir. Às 09:00h (ZT0) da manhã do sexto dia de cultivo, as células foram fixadas em 4 % de paraformaldeído em PBS, a 4º C durante 1 h. Após lavagem em PBS (10 min, 3x), sítios não específicos foram bloqueados com 3 % de soro de jumento (Sigma, E.U.A.) em PBS durante 30 min. Após lavagens em PBS (10 min, 3x), as lâminas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo primário Mel2 na concentração 1:2000. Após lavagens em PBS (10 min, 3x), as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho, conjugado a Cy3 (feito em jumento, Jackson Laboratories, E.U.A.) na diluição 1:500 em tampão de incubação, durante 1 h, protegidas de luz, à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em PBS (10 min, 3x), montadas em meio aquoso Vectashield contendo DAPI (Vector Laboratories, E.U.A.), cobertas com lamínulas e seladas com esmalte transparente. O tampão de incubação utilizado para diluição dos anticorpos primário e secundário contém 1 % de albumina de soro bovino, 0,25 % de carragenina

lambda e 0,3 % de Triton-X-100 (Sigma, E.U.A.). As imagens foram obtidas em fotomicroscópio de fluorescência Zeiss Axiophot, digitalizadas e coloridas utilizando-se Adobe Photoshop.

Western Blot

Após a lise celular com 500 µL de tampão de RIPA (*Radio Immuno Precipitation Assay buffer*; 150 mM de cloreto de sódio, 1 % de Triton X-100, 0,5 % de deoxicolato de sódio, 0,1 % de SDS, 50 mM de Tris-HCl, todos Sigma, E.U.A.), contendo inibidor de protease (Roche, E.U.A.), a solução foi centrifugada a 14.000 x g por 5 min a 4° C. O sobrenadante foi removido para um *eppendorf* e a concentração de proteínas foi determinada através do kit BCA (*bicinchoninic acid method*) (Pierce, E.U.A.), de acordo com o protocolo do fabricante. As soluções contendo 60 µg de proteína, 10 µL de *NuPAGE® LDS Sample Buffer* 4x (Invitrogen, E.U.A.), 1,6 µL de *NuPAGE® Sample Reducing Agent* 10x (Invitrogen, E.U.A.) foram completadas com água para 40 µL. A proteína foi desnaturada por aquecimento a 95° C por 3 min. A câmara interna da cuba de eletroforese foi preenchida com 200 mL de tampão de corrida 1x (*NuPAGE® SDS MOPS Running Buffer*, 20x, Invitrogen, E.U.A.), contendo 500 µL de *NuPAGE® Antioxidant* (Invitrogen, E.U.A.). A câmara externa da cuba foi preenchida com 600 mL de tampão de corrida 1x (*NuPAGE® SDS MOPS Running Buffer*, 20x, Invitrogen, E.U.A.). 10 µL do marcador de peso molecular (*Novex® Sharp Protein Standard*, Invitrogen, E.U.A.) e 40 µL de solução de proteína foram aplicados por poço em gel *NuPAGE® 10 % Bis-Tris Gel* (1,5 mm, 10 poços, Invitrogen, E.U.A.). A eletroforese foi realizada a 200 V (início com 100 a 125 mA) por 30 min.

Após a eletroforese, foi realizada transferência a seco para membranas de Nitrocelulose (*iBlot GelTransfer Stacks Nitrocelulose*, Invitrogen, E.U.A.) em *iBlot Dry Blotting System* (Invitrogen, E.U.A.). O gel foi removido do cassete e posicionado entre um papel de filtro e a membrana e o sanduíche foi posicionado no aparelho. A transferência foi realizada a 20 V por 7 min (Programa 3).

Os passos descritos a seguir foram realizados utilizando-se o *kit* de

detecção cromogênico *WesternBreeze® Chromogenic Kit–Anti-Rabbit* (Invitrogen, E.U.A.). A membrana foi lavada 2x em 20 mL de água por 5 min, sob agitação. Os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados por 1 h em 10 mL da solução de bloqueio (2 mL de *Blocker/Diluent part A* + 3 mL *Blocker/Diluent part B* + 5 mL de água MilliQ), sob agitação. A membrana foi lavada 2x em 20 mL de água por 5 min, sob agitação. A solução de anticorpos primários foi preparada com 2 mL de *Blocker/Diluent part A* + 1 mL *Blocker/Diluent part B* + 7 mL de água MilliQ + anticorpo contra β-ACTINA (1:1000, Abcam, E.U.A. ou Cell Signaling, E.U.A.) + anticorpo contra N-ACETILTRANSFERASE (1:500, Lifespan Biosciences, E.U.A.) + anticorpo contra OPN4x (Mel 2, 1:500), ou com 2 mL de *Blocker/Diluent part A* + 1 mL *Blocker/Diluent part B* + 7 mL de água MilliQ + anticorpo contra β-ACTINA (1:1000 Abcam, E.U.A. ou Cell Signaling, E.U.A.) + anticorpo contra CLOCK (1:1000, Lifespan Biosciences, E.U.A.) + anticorpo contra TIROSINA HIDROXILASE (1:500, Lifespan Biosciences, E.U.A.) A membrana foi incubada *overnight* na solução de anticorpos primários, a 4° C, sob agitação.

A membrana foi então lavada 4x em 20 mL da solução de lavagem (10 mL de *Antibody Wash Solution* 16x + 150 mL de água MilliQ) por 5 min, sob agitação e 3x em 20 mL de água por 2 min, sob agitação. A membrana foi, a seguir, incubada em 10 mL da solução de anticorpo secundário por 60 min, sob agitação, lavada 4x em 20 mL da solução de lavagem por 5 min, sob agitação e 3x em 20 mL de água por 2 min, sob agitação. A membrana foi incubada em 10 mL do substrato cromogênico até o aparecimento das bandas roxas (aproximadamente 60 min, sob agitação) e depois lavada 3x em 20 mL de água por 2 min. Após secagem sobre superfície plástica, a membrana foi escaneada e a imagem digitalizada foi analisada através do programa Scion Image (Scion Corporation, E.U.A.).

Viabilidade celular

As células foram otidas e tratadas ou não conforme o protocolo de tratamento com glutamato. No ZT0 do sexto e sétimo dia de cultivo, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS), e soltas do frasco de cultivo com auxílio de 1 mL de TrypLExpress (Gibco, U.S.A). Após coleta das células em tubo de centrífuga, foi adicionado meio de cultura para inativar a ação da TrypLExpress; em seguida elas foram lavadas novamente com PBS, centrifugadas, e o *pellet* celular foi ressuspendido em 500 μL de PBS. Foram adicionados 50 μL de solução de iodeto de propídio (IP, Sigma, E.U.A.) (20 μg por mL em PBS) e as células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur, E.U.A.). O IP é um composto fluorescente altamente solúvel em água que não é capaz de atravessar membranas intactas, detectando assim as células com perda de integridade de membrana. O IP liga-se ao DNA intercalando-se entre as bases. A fluorescência foi detectada no canal FL2 (fluorescência laranja-avermelhada – 585/42 nm). Dez mil eventos foram adquiridos por amostra em histogramas. Os histogramas foram analisados através do programa *Cell Quest*.

Fragmentação de DNA

A análise da fragmentação de DNA foi realizada por citometria de fluxo de acordo com o método descrito por Nicolletti e colaboradores (1991). As células foram tratadas e coletadas conforme descrito no item acima. O precipitado de células foi ressuspendido em 200 μL de uma solução hipotônica contendo iodeto de propídio (20 μg/mL, Sigma, E.U.A.), citrato de sódio (0,1 %, Sigma, E.U.A.) e Triton X-100 (0,1 %, Sigma, E.U.A.). Os tubos foram cobertos com papel alumínio e incubados por 2 h a 4° C. A fluorescência foi detectada e analisada através da curva de incorporação de PI ao núcleo.

Análise estatística

Para determinar os níveis de significância das possíveis diferenças, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA ONE-WAY para resultados em escuro constante ou 12 h claro por 12 h escuro, ou TWO-WAY para os restantes), seguida ou não por teste de Tukey ou Bonferroni, respectivamente. A diferença foi considerada significativa quando $p<0,05$. Os gráficos apresentam os valores de expressão de cada gene ao longo de 24 h calculados em porcentagem em relação ao menor valor na condição de escuro constante, ou ao controle sem glutamato.

Além da análise por ANOVA, analisamos a ritmicidade pelo *software* COSANA (BENEDITO-SILVA, 2003), modificação do método COSINOR, que utiliza uma estimativa não linear dos mínimos quadrados (NELSON *et al*., 1979; CORNÉLISSEN *et al*., 1980). Para todos os dados experimentais foi ajustada uma função cosseno: $yi = M + A\cos((360/T)\ ti + \varphi) + ei$. Antes do ajuste, todos os dados foram normalizados. Para determinar a significância de cada curva ajustada para cada gene em cada experimento, um teste de razão de proximidade foi utilizado como comparação para uma hipótese de amplitude 0 (uma reta). O ajuste periódico foi considerado significativo quando o teste de proximidade *p* foi menor que 0,05.

Para os experimentos de viabilidade celular e fragmentação de DNA foi utilizado teste *t* não pareado.

RESULTADOS

Características da cultura

Nossos resultados mostram que, no sexto dia de cultivo, é possível observar nas culturas os corpos celulares e também projeções axonais ou dendríticas estabelecendo provavelmente conexões sinápticas entre as células da retina (Fig. 1A e 1B). A presença de células com características de fotorreceptores também foi constatada em nossas culturas, mas em quantidade muito pequena em relação aos demais tipos celulares multipolares. As características das células fotorreceptoras incluem a identificação de gotículas lipídicas no segmento interno, e corpo celular polarizado (HAQUE *et al.,* 2003).

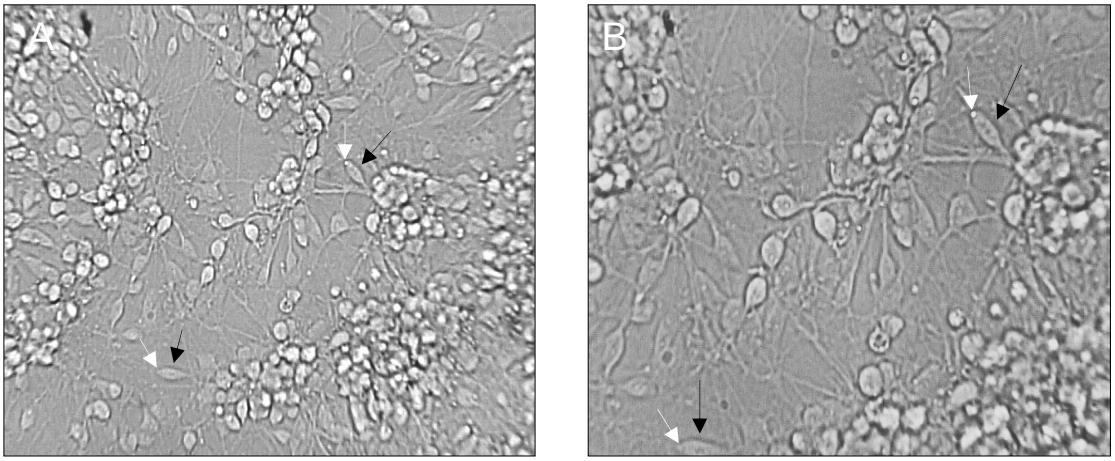


Figura 1. Cultura de retina no sexto dia de cultivo. Fotos obtidas em microscópio invertido, digitalizadas pelo programa Image Pró-Plus. (A) As setas pretas indicam células com características de células fotorreceptoras, como corpo celular polarizado e gotículas lipídicas (setas brancas). Aumento 200x. (B) As setas pretas indicam células com características de células fotorreceptoras, como corpo celular polarizado e gotículas lipídicas (setas brancas). Aumento 320x

Expressão gênica

Clock

Como o gene *Clock* é um componente do mecanismo molecular circadiano endógeno de vertebrados que oscila ritmicamente em relógios periféricos, nossa hipótese era que a expressão desse gene apresentaria oscilações circadianas mesmo que as culturas fossem mantidas em escuro constante. Quando as culturas foram mantidas nessa condição, a produção do RNA mensageiro (RNAm) deste gene apresentou o menor valor no ZT12, e atingiu um pico máximo no ZT21, não apresentando variação nos outros ZTs analisados (Fig. 2). Não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano, nem visualmente, nem pela análise por COSANA (p=0,559).

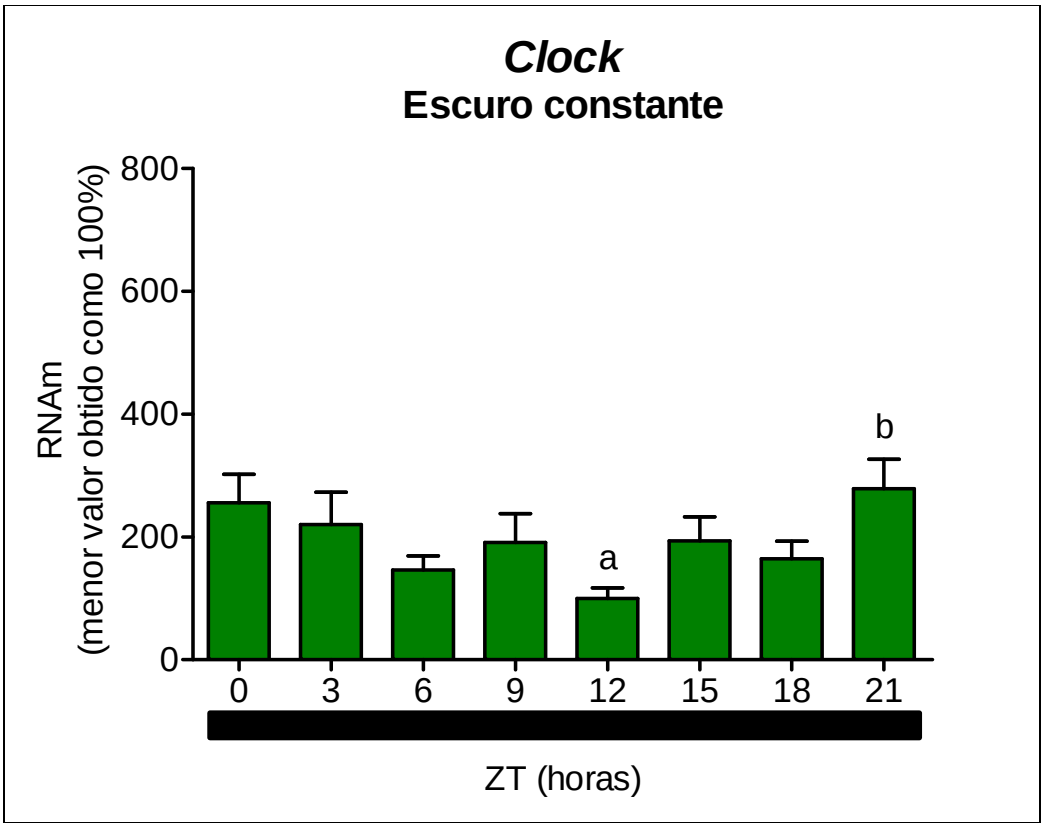


Figura 2. Expressão de *Clock* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Clock* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor, ZT12, que

corresponde a 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação à (b) (n=6-8 culturas primárias).

Em regime 12C:12E, a produção do RNAm do gene *Clock*, apresentou o menor valor no ZT3, que corresponde à fase clara, e se manteve constante até que, no ZT15 que corresponde à fase escura, aumentou cerca de cinco vezes. Um aumento de 3 a 4 vezes perdurou até o final da análise, e é possível notar que essa taxa foi mantida até que a luz se acendesse no ZT0 (Fig. 3).

Nessa condição é possível identificar um padrão de expressão circadiano, tanto visualmente, como pela análise rítmica (p=0,049, Fig. 6).

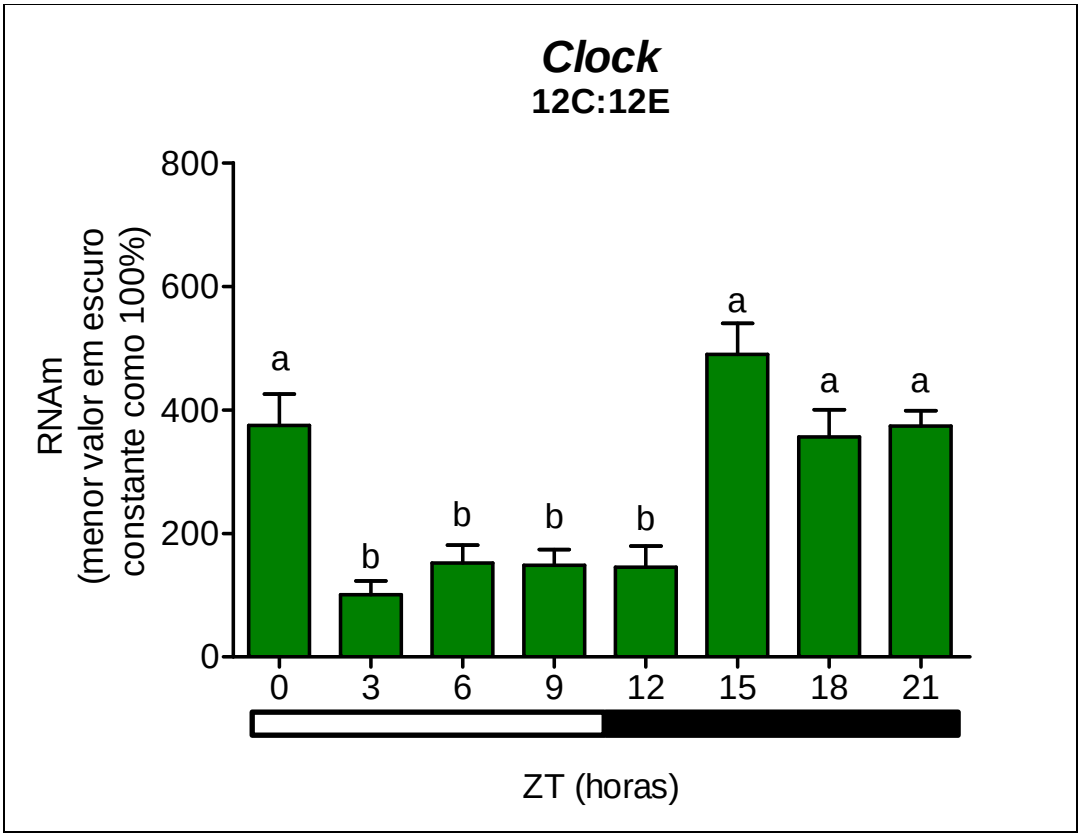


Figura 3. Expressão de *Clock* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Clock* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor em escuro constante, que corresponde a 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b) (n=6-8 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E por três dias, e em seguida em escuro constante por mais três dias, a produção do RNAm de *Clock* teve seu menor valor no ZT12, mesmo ZT onde a produção deste RNAm foi mínima quando as células foram mantidas em escuro constante. Porém, ao contrário do que aconteceu em escuro constante, o maior valor de expressão foi atingido no ZT3, o que corresponde à fase clara subjetiva, em relação ao fotoperíodo em que as células foram pré-incubadas (Fig. 4). Não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano, nem visualmente, nem pela análise rítmica (p=0,171).

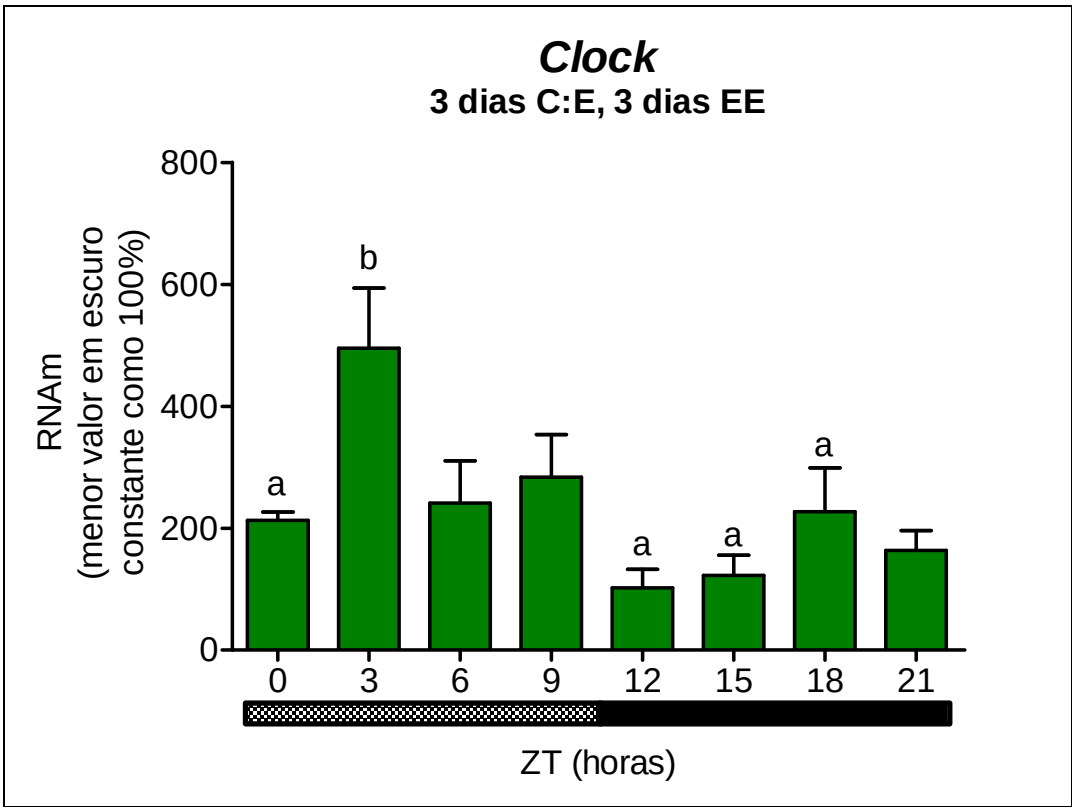


Figura 4. Expressão de *Clock* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E por três dias seguidos de mais três dias em escuro constante. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Clock* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor em escuro constante, que corresponde a 100 %. (n=3-4 culturas primárias). (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b) (n=3-4 culturas primárias).

A seguir, as células foram mantidas em escuro constante, e tratadas ou não com 100 µM de glutamato por 12 h a partir do ZT0 do quinto dia *in vitro* tendo os dois grupos (tratado e controle) o meio de cultivo trocado no ZT0, e no ZT12. Nessas condições, a expressão do gene *Clock* no grupo controle apresentou o menor valor de expressão no ZT3, e atingiu o máximo no ZT21. O grupo tratado apresentou o menor valor no ZT15, e atingiu o valor máximo no ZT0. É possível notar que o tratamento estimulou a produção deste RNAm no ZT0 e no ZT3 e que, a partir do ZT12, o tratamento inibiu a produção em relação ao grupo controle (Fig. 5). Não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano visualmente em ambos os grupos (Fig.6), contudo a análise rítmica indicou a presença de um padrão de expressão circadiano no grupo tratado (p=0,04) e ausência de ritmo para o grupo controle (p=0,168).

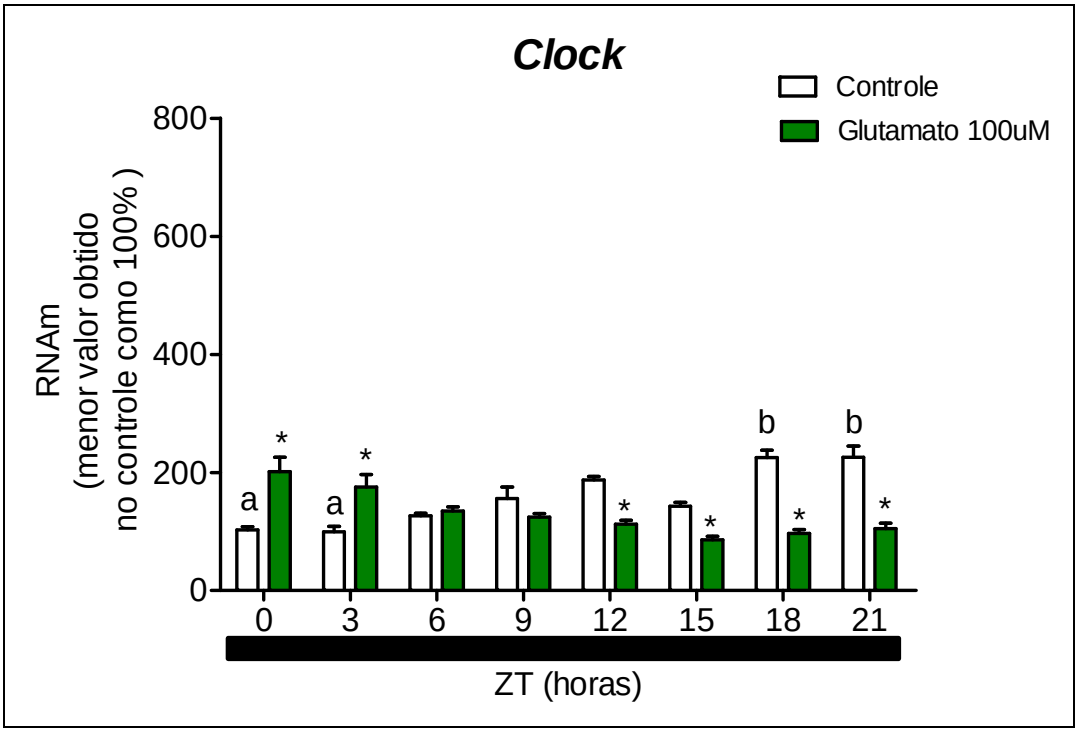


Figura 5. Expressão de *Clock* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante, e tratadas com 100 µM de glutamato por 12 h no quinto dia. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Clock* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle, ZT0, que corresponde a 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b). (*) indica que $p < 0,05$, em relação ao respectivo controle. (n=3-4 culturas primárias).

Nos protocolos experimentais onde foi constatada variação na produção do RNAm do gene *Clock* entre os horários analisados por ANOVA ONE WAY, a análise rítmica também foi aplicada, e embora tenha havido variação significativa entre os grupos de ZTs no protocolo de escuro constante, a análise por COSANA não indicou a presença de um padrão de expressão circadiano pois p=0,559 . Já no protocolo 12C:12E, a análise rítmica evidenciou um padrão de expressão circadiano (p=0,049), com acrofase no ZT18,4, amplitude de 162,13 e mesor de 267,51 (Fig. 6). No protocolo de 3 dias C:E, 3 dias EE, não foi possível evidenciar um padrão de expressão circadiano (p=0,171). Já no protocolo experimental onde as células foram tratadas ou não com glutamato, não foi encontrado um padrão circadiano para o grupo controle (p=0,168). Embora o pós-teste de Tukey não tenha indicado diferença significativa entre os diferentes ZTs do grupo tratado, a análise ANOVA foi significativa (p<0,05), sendo assim, este grupo foi submetido à análise por COSANA, evidenciando um padrão de expressão circadiano, pois p=0,04 com acrofase no ZT2,38, amplitude igual a 43,04 e mesor igual a 124,20. Estes valores são inferiores aos encontrados para o protocolo 12C:12E (Fig. 6).

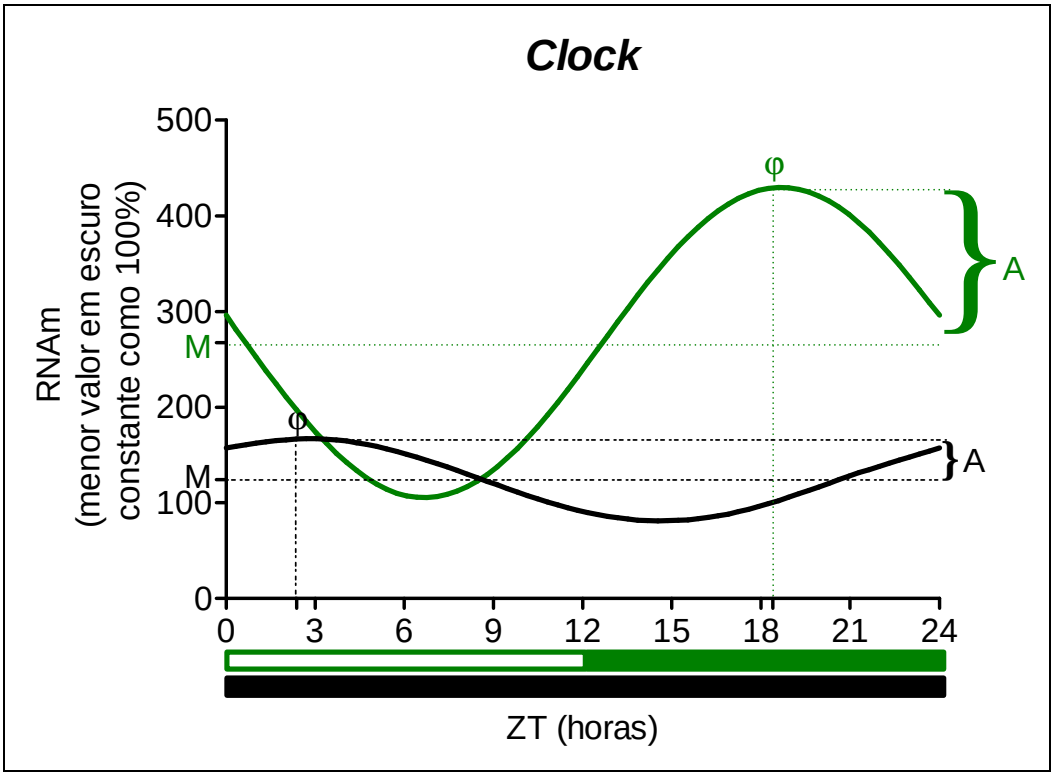


Figura 6. Curva ajustada pelo *software* COSANA para os valores de expressão de *Clock* em fotoperíodo 12C:12E, e em escuro constante tratadas com 100 µM de glutamato. (-) Representa a curva ajustada para os valores em 12C:12E. (-) Representa a curva ajustada para os valores do grupo tratado com 100 µM de glutamato. (φ) Representa a acrofase em 12C:12E. (φ) Representa a acrofase do grupo tratado com 100 µM de glutamato. (M) Representa o mesor em 12C:12E. (M) Representa o mesor do grupo tratado com 100 µM de glutamato (A) Representa a amplitude em 12C:12E (A) Representa a amplitude do grupo tratado com 100 µM de glutamato. O ZT24 corresponde ao ZT0 representado novamente para uma melhor visualização da análise rítmica.

Per2

Assim como *Clock*, *Per2* também é um componente do mecanismo molecular circadiano endógeno de vertebrados, portanto era esperado que a expressão desse gene apresentasse oscilações circadianas, com fase diferente da de *Clock*, mesmo que as culturas fossem mantidas em escuro constante. Quando as culturas foram mantidas nessa condição, a produção do RNAm deste gene apresentou o menor valor no ZT3, um pico no ZT 15, atingindo um pico máximo no ZT21. Não houve variação significativa nos outros ZTs analisados (Fig. 7). Não foi possível identificar um padrão circadiano de expressão, nem visualmente, nem pela análise rítmica (p=0,549).

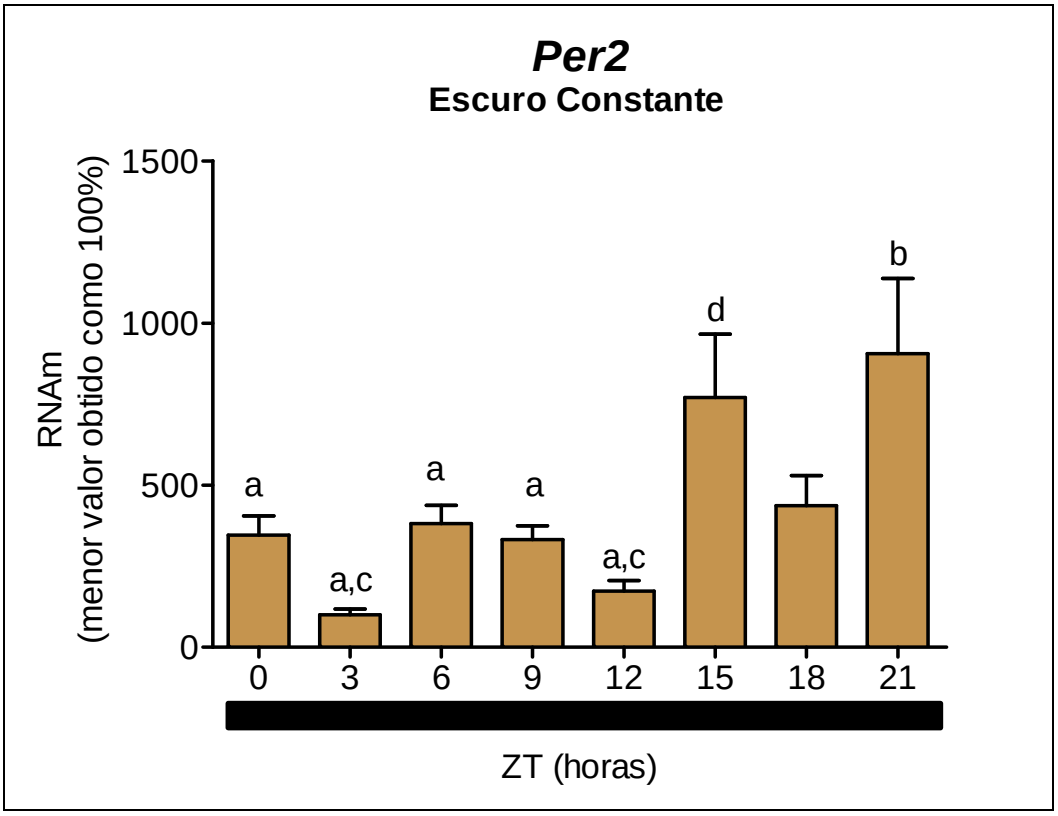


Figura 7. Expressão de *Per2* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Per2* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor, ZT3, que corresponde a 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b), e (c) indica que $p < 0,05$ em relação a (d) (n=6-8 culturas primárias).

Em regime 12C:12E, a produção do RNAm de *Per2* apresentou o menor valor no ZT6, que corresponde à fase clara e se manteve constante, até que no ZT15, que corresponde à fase escura, aumentou cerca de 7 vezes. Os valores começaram a cair novamente nos ZTs seguintes, e é possível notar que esse valor foi reduzido drasticamente após o acender da luz (Fig. 8). Nessa condição é possível identificar um padrão de expressão circadiano visualmente, porém a análise rítmica não confirma essa tendência (p=0,1).

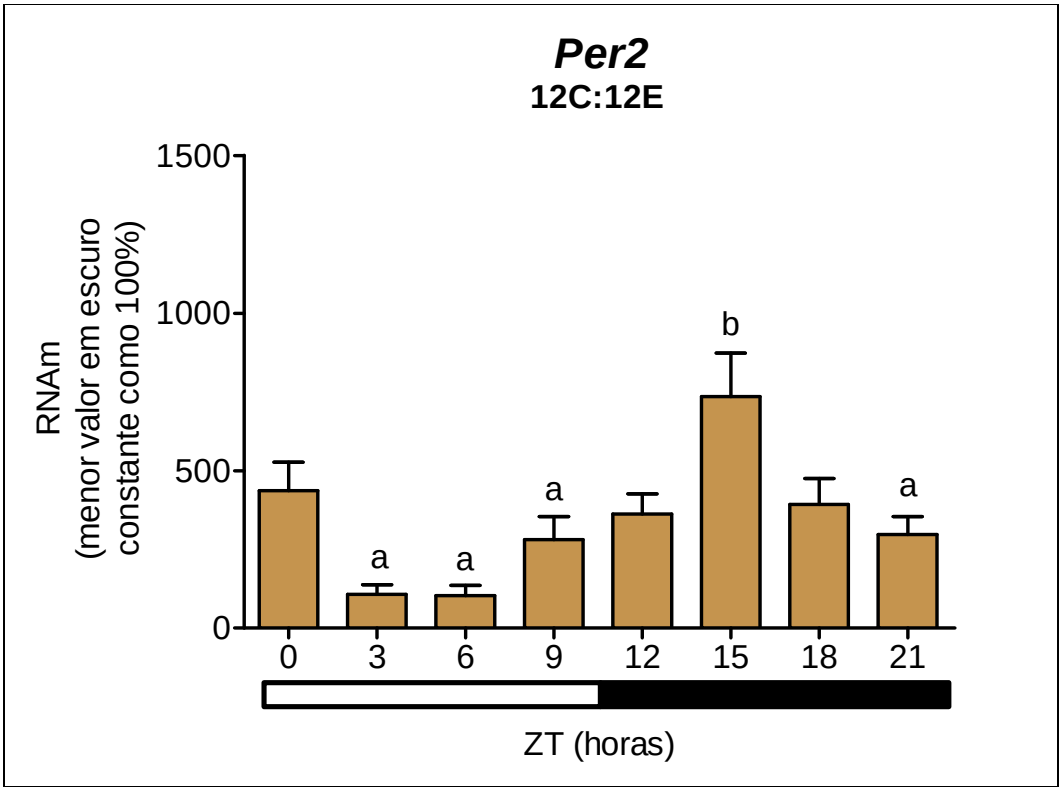


Figura 8. Expressão de *Per2* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Per2* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor de escuro constante, que corresponde a 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b) (n=6-8 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E por três dias, e em seguida em escuro constante por mais três dias, a produção do RNAm de *Per2* teve seu menor valor aparente no ZT6, diferente do ZT onde a produção deste RNAm foi mínima quando as células foram mantidas em escuro constante. Porém, ao contrário do que aconteceu em escuro constante, não foi encontrada diferença significativa entre os ZTs, nem na fase clara subjetiva, relativa ao fotoperíodo em que as células foram pré-incubadas, nem na escura subjetiva (Fig. 9). Por não ter sido encontrada diferença entre os ZTs, não foi realizada a análise por COSANA.

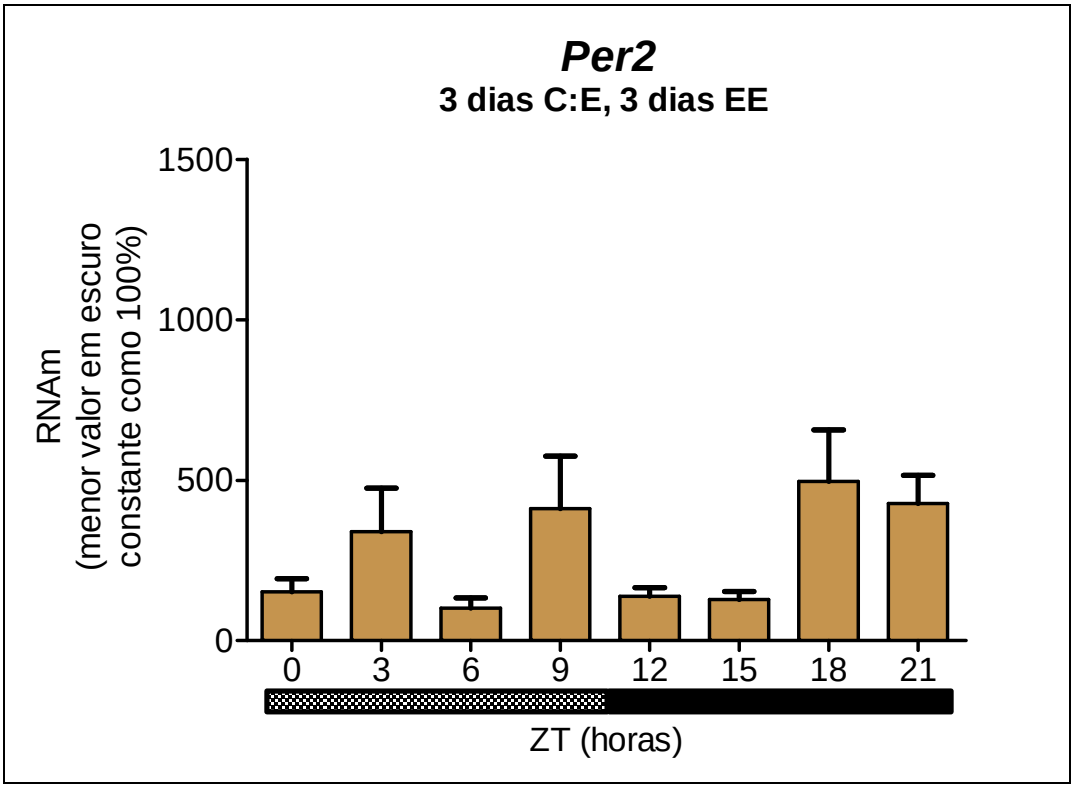


Figura 9. Expressão de *Per2* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E por três dias, seguidos de mais três dias em escuro constante. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Per2* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor em escuro constante, que corresponde a 100 % (n=3-4 culturas primárias).

Nas células mantidas em escuro constante, e tratadas ou não com 100 µM de glutamato por 12 h, a expressão do gene *Per2* não apresentou diferenças, nem entre os ZTs de cada grupo, nem entre os grupos, e houve uma drástica redução na amplitude de expressão, em relação aos demais protocolos experimentais (Fig. 10). Sendo assim, não foi realizada a análise por COSANA.

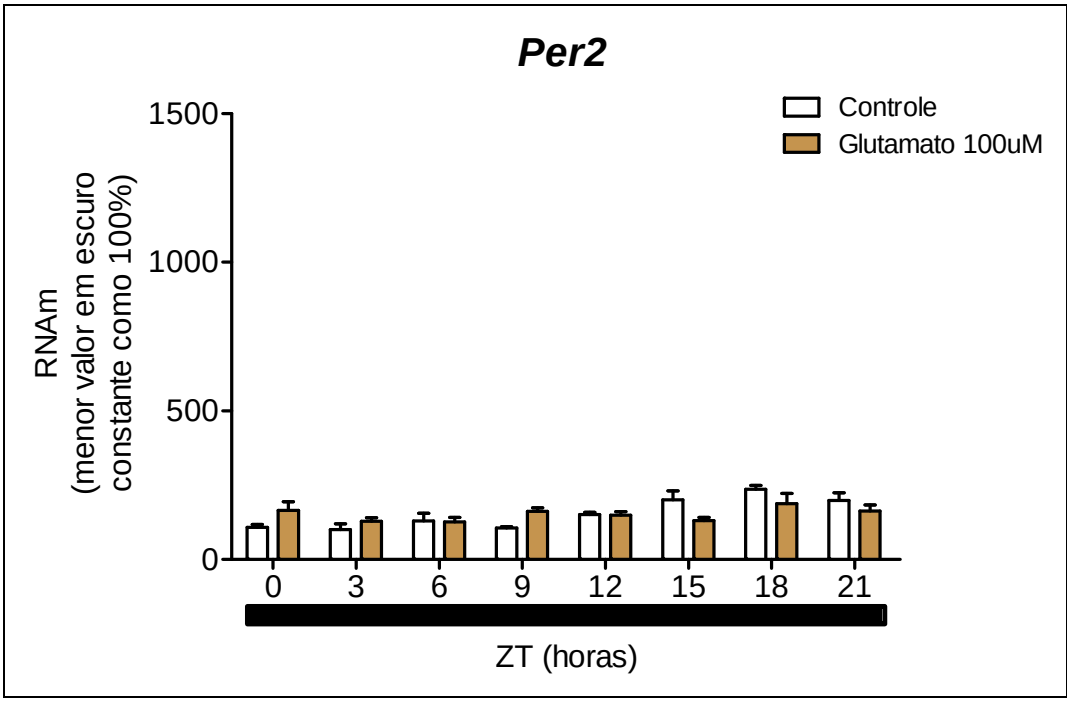


Figura 10. Expressão de *Per2* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante, e tratadas com 100µM de glutamato por 12 horas no quinto dia. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, + SE) do gene *Clock* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle, ZT9, que corresponde a 100 % (n=3-4 culturas primárias).

Opn4x

Em condições de escuro constante, a expressão da melanopsina ortóloga de *Xenopus leavis, Opn4x,* não apresentou diferenças estatísticas significativas entre o menor valor aparente, ZT6, e os demais horários analisados (Fig. 11).

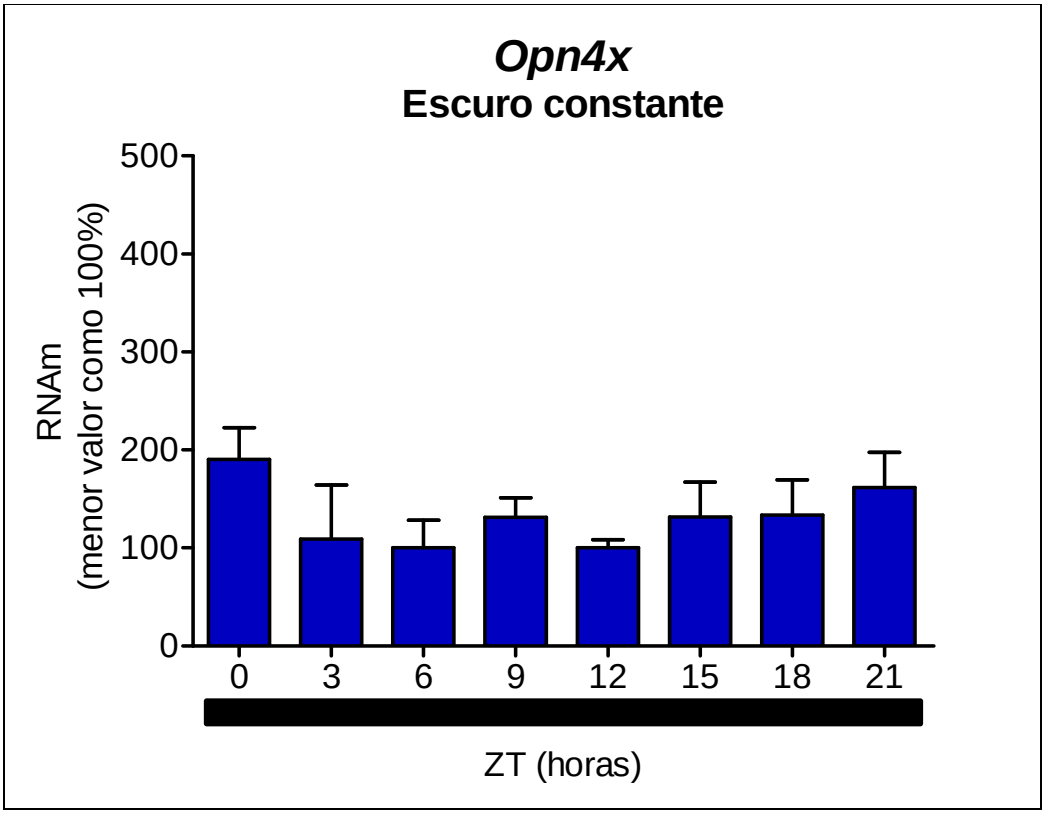


Figura 11. Expressão de *Opn4x* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Opn4x* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor, ZT6, em escuro constante, que corresponde a 100% (n=6-8 culturas primárias).

Em regime 12C:12E, a produção do RNAm de *Opn4x* apresentou um valor elevado no ZT0, decrescendo para o menor valor no ZT3, que corresponde à fase clara. Os valores mantiveram-se constantes até que, no ZT15, que corresponde à fase escura, aumentaram cerca de três vezes, voltando a cair nos ZTs seguintes (Fig. 12). Não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano nem visualmente, nem pela análise rítmica (p=0,518).

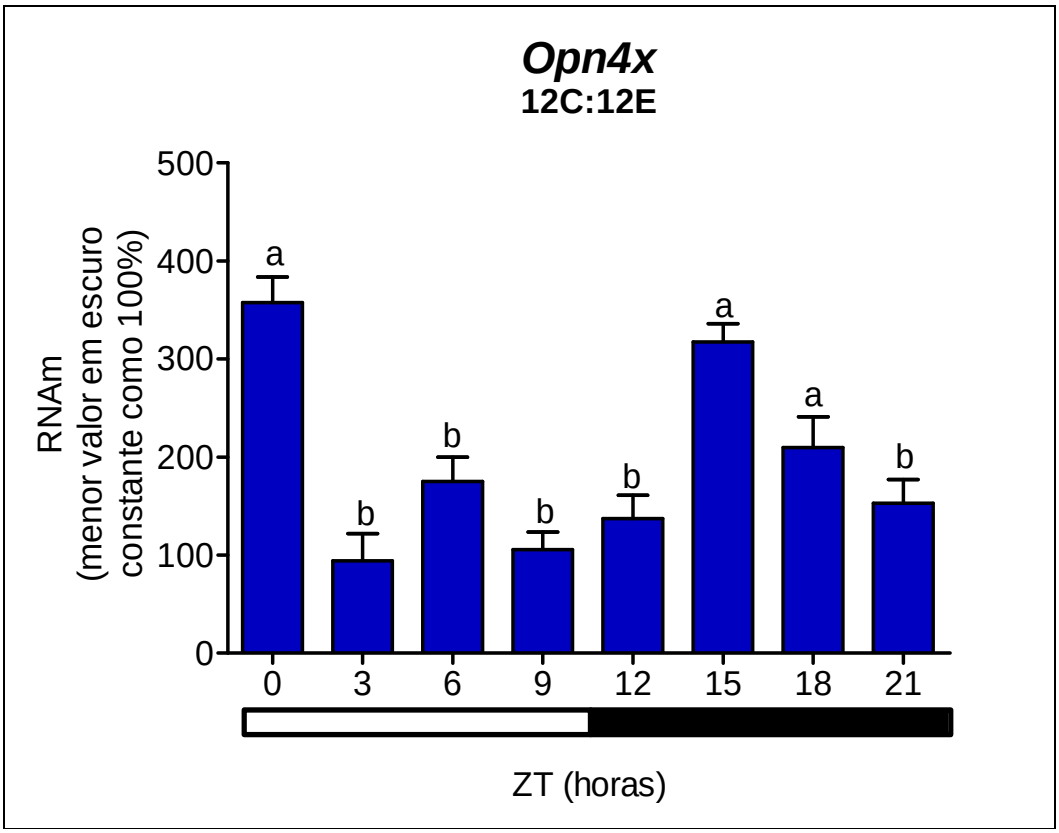


Figura 12. Expressão de *Opn4x* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Opn4x* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor de escuro constante, que corresponde a 100%. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b) (n=6-8 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E por três dias, e em seguida em escuro constante por mais três dias, a produção do RNAm de *Opn4x* teve seu menor valor no ZT12, diferente do ZT onde a produção deste RNAm foi mínima quando as células foram mantidas em escuro constante. Porém, ao contrário do que aconteceu em escuro constante, foi possível identificar um pico de expressão no ZT3, o que corresponde à fase clara subjetiva, relativamente ao fotoperíodo em que as células foram pré-incubadas (Fig. 13). Não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano, nem visualmente, nem pela análise rítmica (p=0,737).

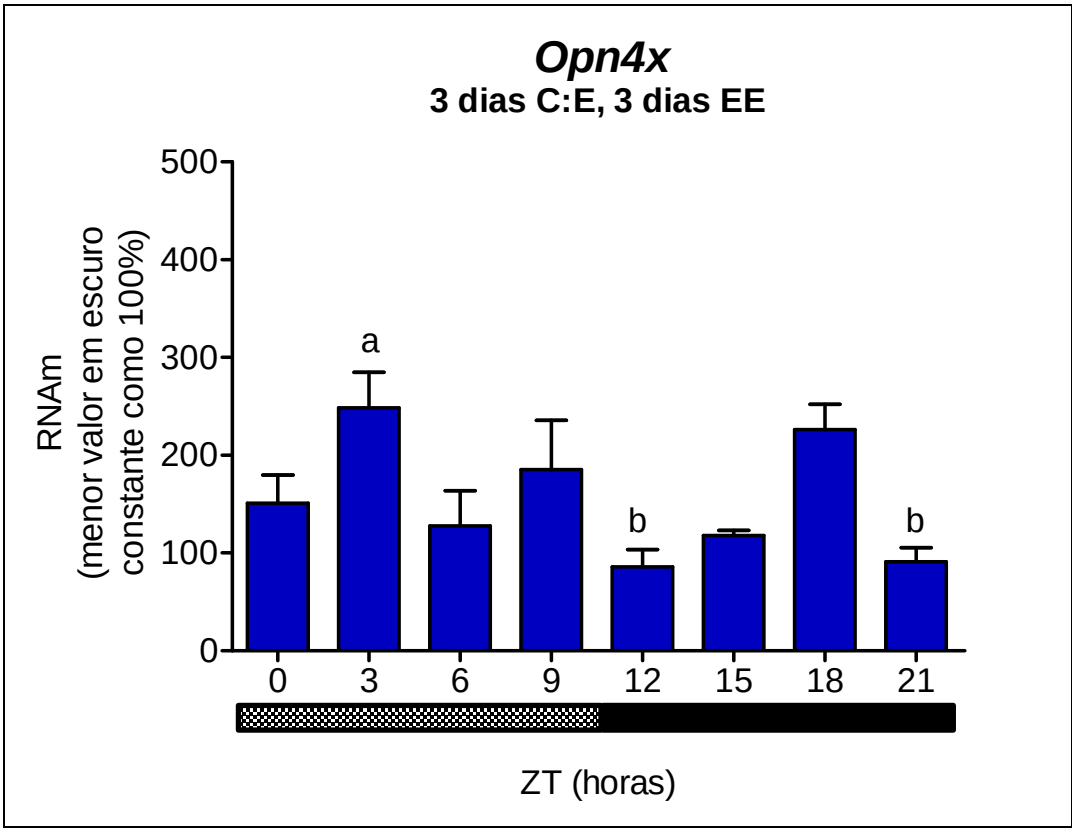


Figura 13. Expressão de *Opn4x* em fotoperíodo 12C:12E por três dias, seguidos de mais três dias em escuro constante. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± SE) do gene *Opn4x*normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor em escuro constante, que corresponde a 100%. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b) (n=3-4 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em escuro constante, e tratadas ou não com 100 µM de glutamato por 12 h, a expressão do gene *Opn4x* não apresentou diferenças entre os ZTs de cada grupo. Entretanto, nota-se que o tratamento com glutamato reduziu a produção deste RNAm no ZT21 (Fig. 14). No grupo controle é possível identificar visualmente uma variação circadiana, embora não se tenha realizado a análise rítmica devido à falta de diferenças significativas entre os ZTs.

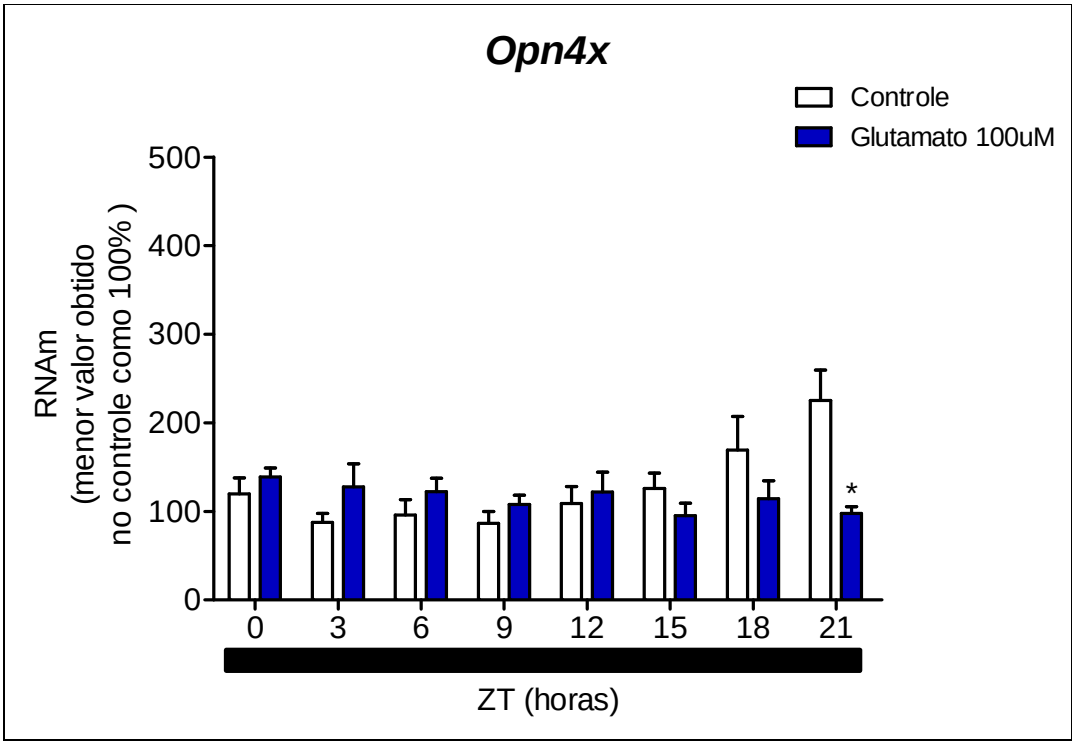


Figura 14. Expressão de *Opn4x* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante, tratadas ou não com 100 µM de glutamato por 12 horas no quinto dia. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Clock* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle, ZT9, que corresponde a 100%. (*) indica que p <0,05, em relação ao respectivo grupo controle. (n=3-4 culturas primárias).

Opn4m

Quando as culturas foram mantidas em escuro constante, a produção do RNAm de *Opn4m* apresentou um valor inicial elevado no ZT0, cerca de dez vezes maior que o menor valor ZT9, e não apresentou diferenças nos ZTs seguintes (Fig. 15). O perfil de expressão apresentado pelas células sugere visualmente a existência de um padrão de expressão circadiano, e a análise rítmica embora não seja significativa, apresenta um valor de p muito próximo de ser significativo (p=0,059).

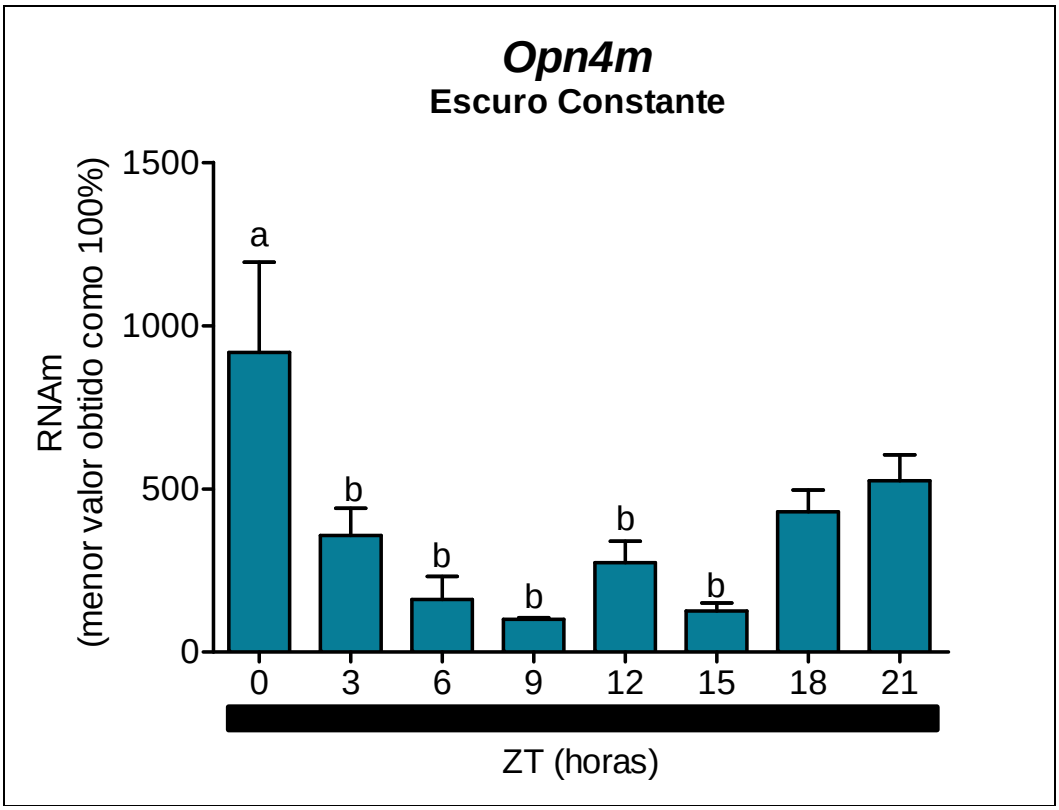


Figura 15. Expressão de *Opn4m* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor, ZT12, que corresponde a 100%. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b) (n=3-4 culturas primárias).

Em regime 12C:12E, a produção do RNAm de *Opn4m* apresentou o menor valor no ZT3, que corresponde à fase clara e se manteve constante, até que no ZT15, que corresponde à fase escura, aumentou cerca de cinco vezes. Este aumento perdurou até o final da análise, e é possível notar que essa taxa foi mantida até que a luz se acendesse no ZT0 (Fig. 16). Nessa condição é possível identificar um padrão de expressão circadiano, tanto visualmente como pela análise rítmica (p=0,035).

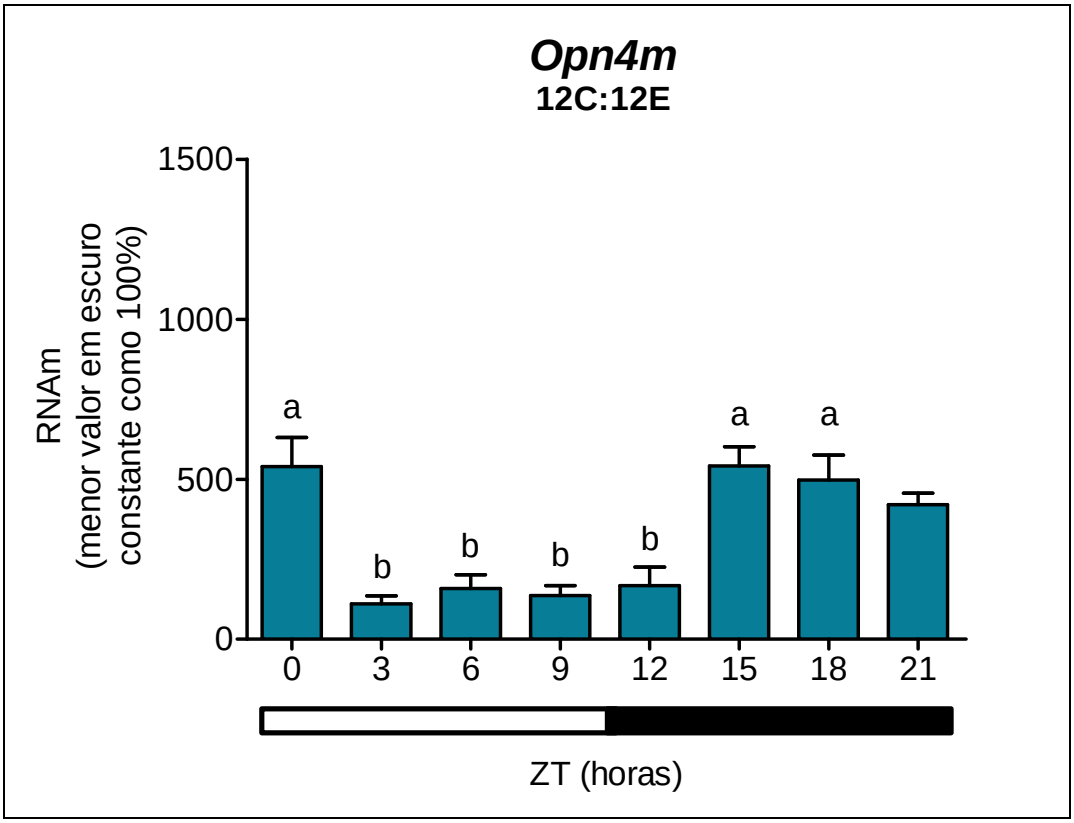


Figura 16. Expressão de *Opn4m* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± SE) do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor de escuro constante, que corresponde a 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b) (n=6-8 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E por três dias, e em seguida em escuro constante por mais três dias, a produção do RNAm de *Opn4m* teve seu menor valor aparente no ZT6, diferente do ZT onde a produção deste RNAm foi mínima quando as células foram mantidas em escuro constante. Porém, ao contrário do que aconteceu em escuro constante, não foi encontrada diferença significativa entre os ZTs. Nem na fase clara subjetiva, em relação ao fotoperíodo em que as células foram pré-incubadas, nem na escura subjetiva (Fig. 17). Por não ter sido encontrada diferença entre os ZTs, não foi realizada a análise por COSANA.

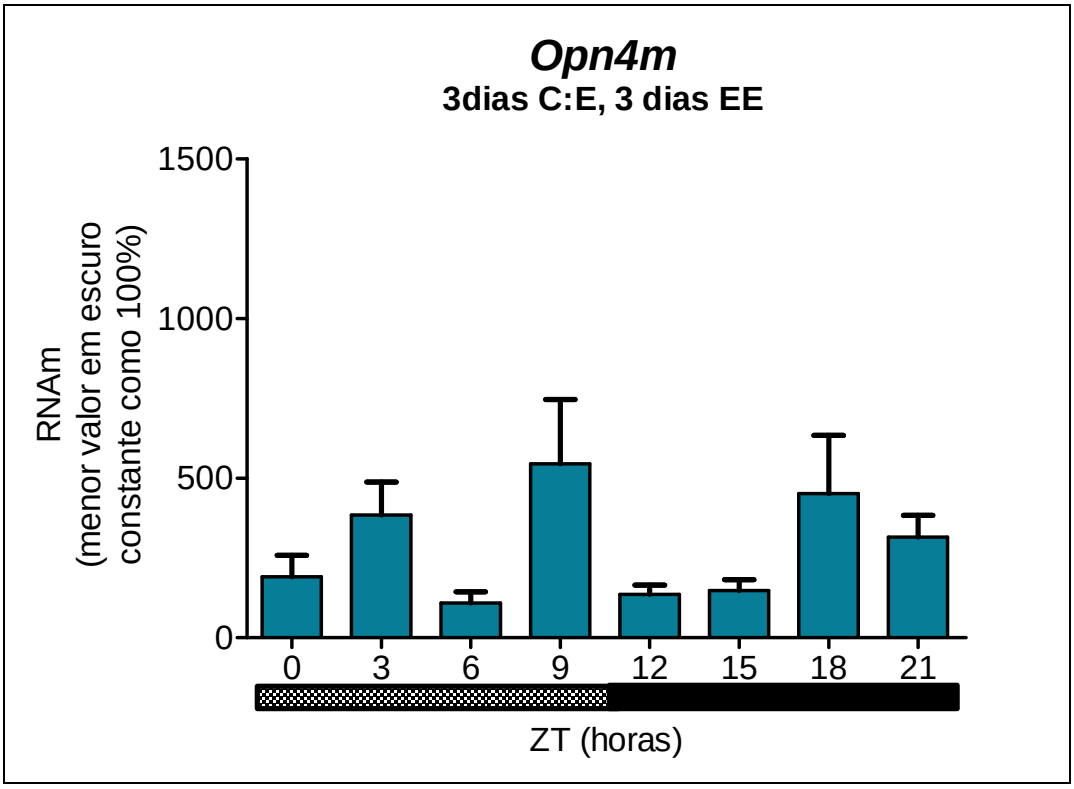


Figura 17. Expressão de *Opn4m* em fotoperíodo 12C:12E por três dias, seguidos de mais três dias em escuro constante. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor em escuro constante, considerado como 100 %. (n=3-4 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em escuro constante, e tratadas ou não com 100 μM de glutamato por 12 h a expressão do gene *Opn4m* apresentou diferenças, entre ZTs no grupo controle, mas não no grupo tratado. Entretanto, nota-se que o tratamento com glutamato reduziu a produção deste RNAm nos ZTs 18 e 21 (Fig. 18). Embora visualmente identifique-se uma variação circadiana no grupo controle, não foi possível confirmá-la pela análise rítmica.

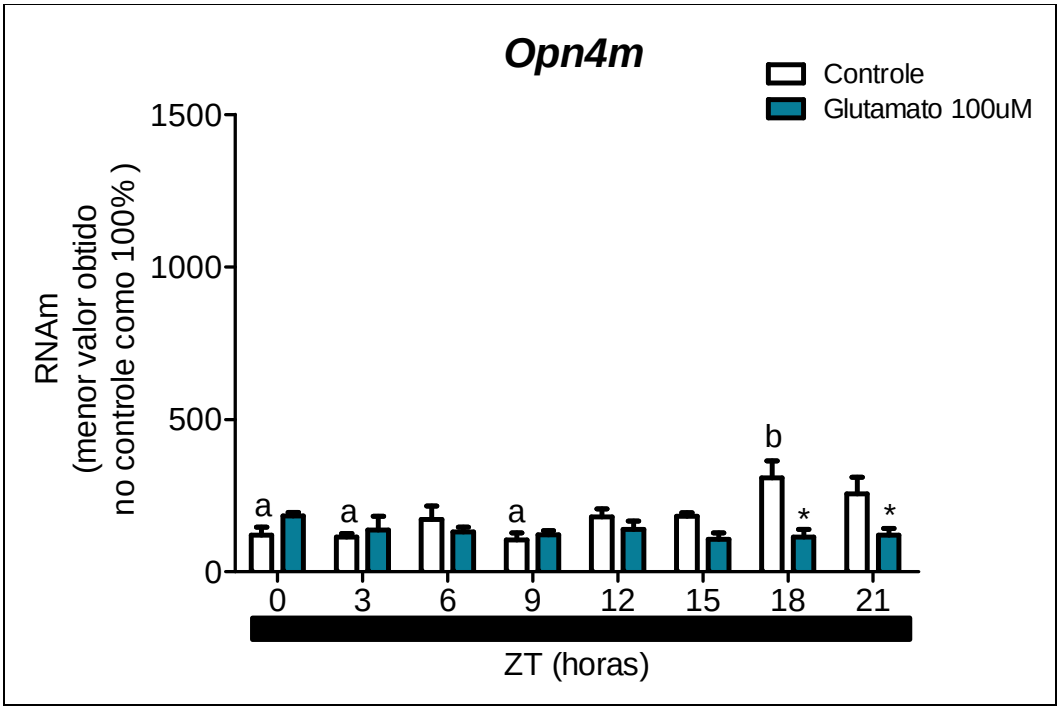


Figura 18. Expressão de *Opn4m* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante, e tratadas com 100μM de glutamato por 12 horas no quinto dia. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle, ZT0, que corresponde a 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b). (*) indica que $p < 0,05$, em relação ao respectivo controle (n=3-4 culturas primárias).

Nos protocolos experimentais onde foi constatada variação na produção do RNAm de *Opn4m* entre os horários analisados por ANOVA ONE WAY, a análise por COSANA também foi aplicada. Embora tenha havido variação entre ZTs no protocolo de escuro constante, a análise rítmica não indicou a presença de um padrão de expressão circadiano, pois p=0,059. Já no protocolo 12C:12E, a análise rítmica evidenciou um padrão de expressão circadiano (p=0,035), com acrofase no ZT19,11, amplitude de 221,57 e mesor de 321,58 (Fig. 19). Já no protocolo experimental onde as células foram tratadas ou não com glutamato, não foi encontrado um padrão circadiano para o grupo controle (p=0,104), e como não houve variação entre os ZTs no grupo tratado, não foi aplicada a análise por COSANA.

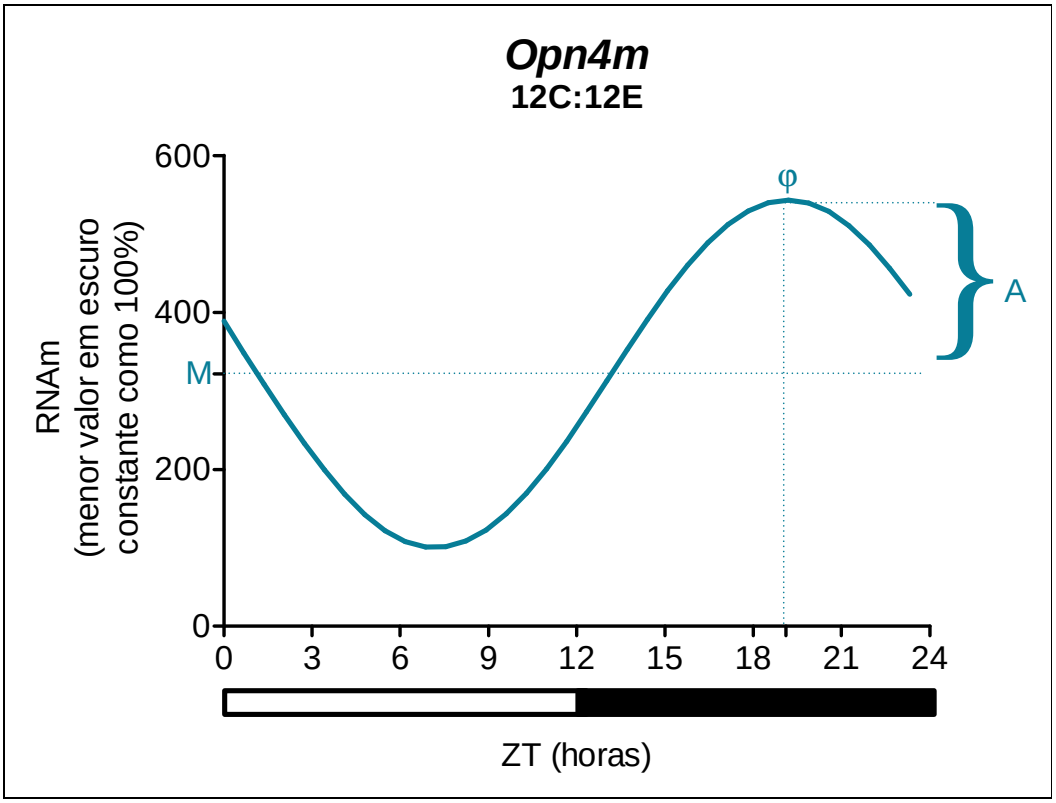


Figura 19. Curva ajustada pelo *software* COSANA para os valores de expressão de *Opn4m* em fotoperíodo 12C:12E. (-) Representa a curva ajustada para os valores em 12C:12E. (φ) Representa a acrofase em 12C:12E. (M) Representa o mesor em 12C:12E. (A) Representa a amplitude em 12C:12E. O ZT24 corresponde ao ZT0 representado novamente para uma melhor visualização da análise rítmica.

N-acetiltransferase

Quando as culturas foram mantidas em escuro constante, a produção do RNAm de *N-acetiltransferase* apresentou um valor elevado no ZT0 em comparação aos demais ZTs. O menor valor foi encontrado no ZT18 (Fig. 20). Não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano, nem visualmente, nem pela análise rítmica (p=0,191).

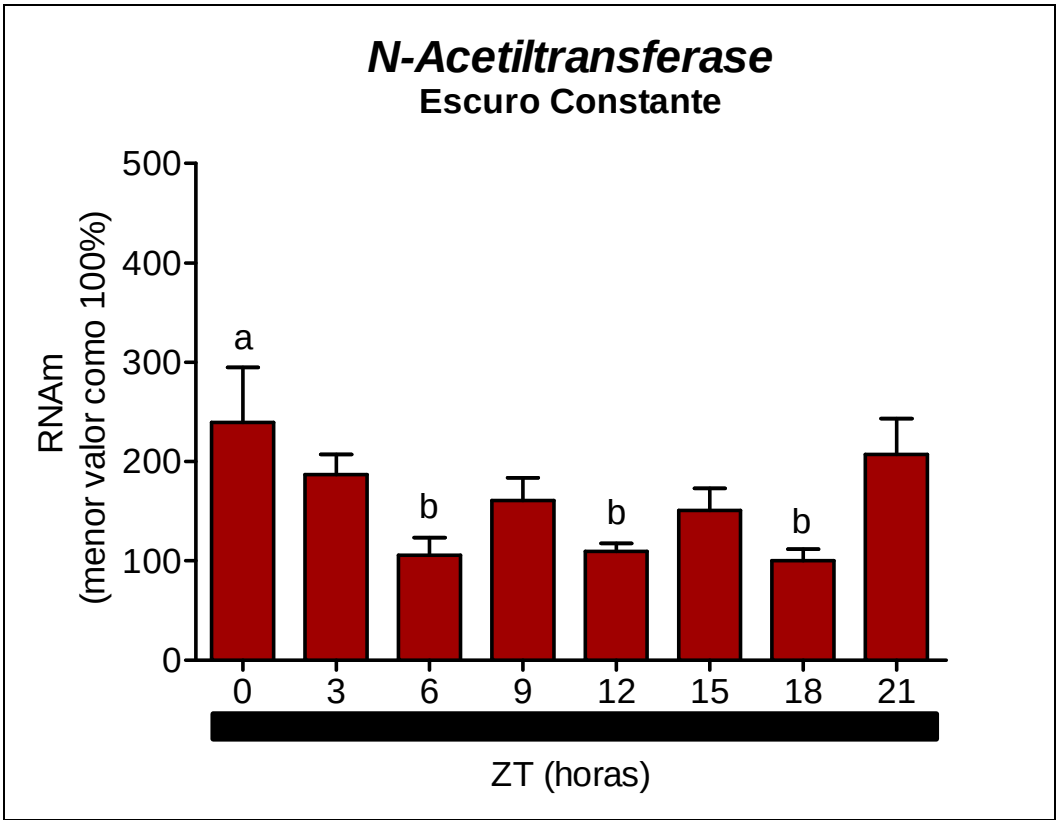


Figura 20. Expressão de *N-acetiltransferase* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *N-acetiltransferase* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor, ZT18, considerado como 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b) (n=6-8 culturas primárias).

Em regime 12C:12E, a produção do RNAm de *N-acetiltransferase* apresentou o menor valor no ZT12, que corresponde ao início da fase escura, aumentou cerca de duas vezes nos ZTs seguintes da fase escura, e atingiu seu valor máximo no início da fase clara, até que no ZT6, voltou a decrescer (Fig. 21). Embora haja uma aparente variação circadiana, a análise por COSANA não confirmou o ritmo, pois p=0,083.

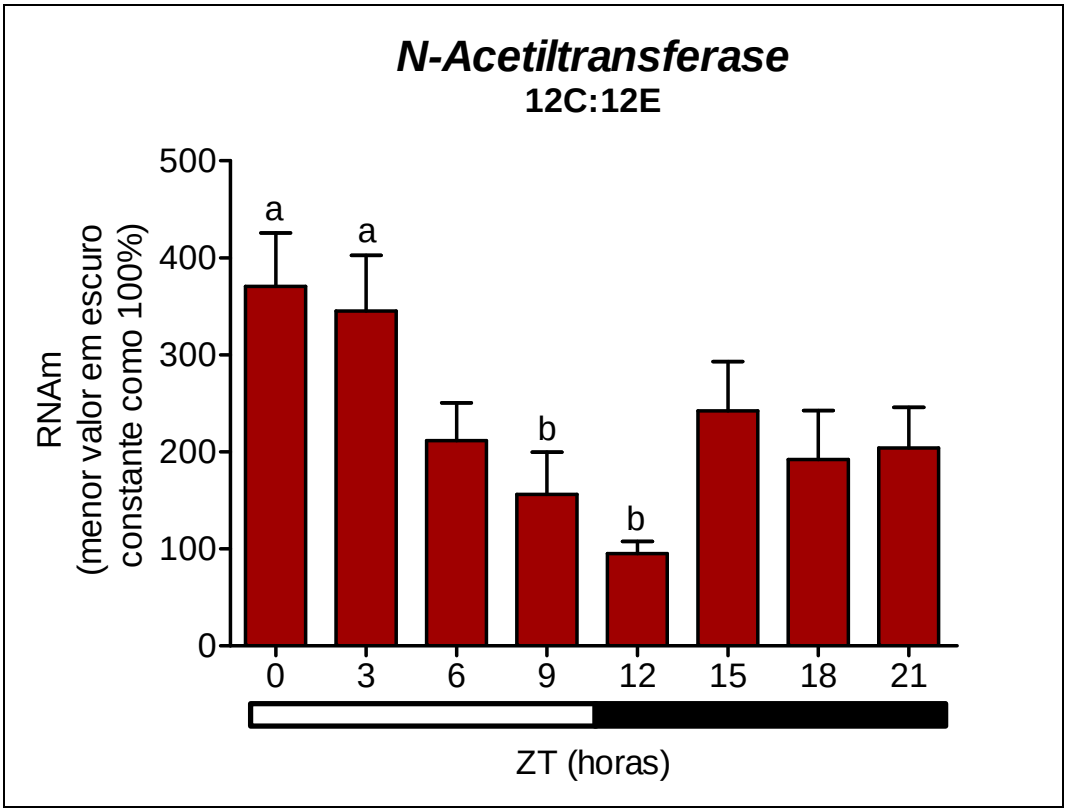


Figura 21. Expressão de *N-acetiltransferase* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *N-acetiltransferase* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor em escuro constante, considerado como 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b) (n=6-8 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E por três dias, e em seguida em escuro constante por mais três dias, a produção do RNAm da *N-acetiltransferase* teve seu menor valor aparente no ZT15, diferente do ZT onde a produção deste RNAm foi mínima quando as células foram mantidas em escuro constante. Porém, ao contrário do que aconteceu em escuro constante, não foi encontrada diferença significativa entre os ZTs. Nem na fase clara subjetiva, relativamente ao fotoperíodo em que as células foram pré-incubadas, nem na escura subjetiva (Fig. 22). Embora visualmente os resultados sugiram uma expressão rítmica, não foi aplicada a análise por COSANA, por não terem sido encontradas diferenças entre os ZTs.

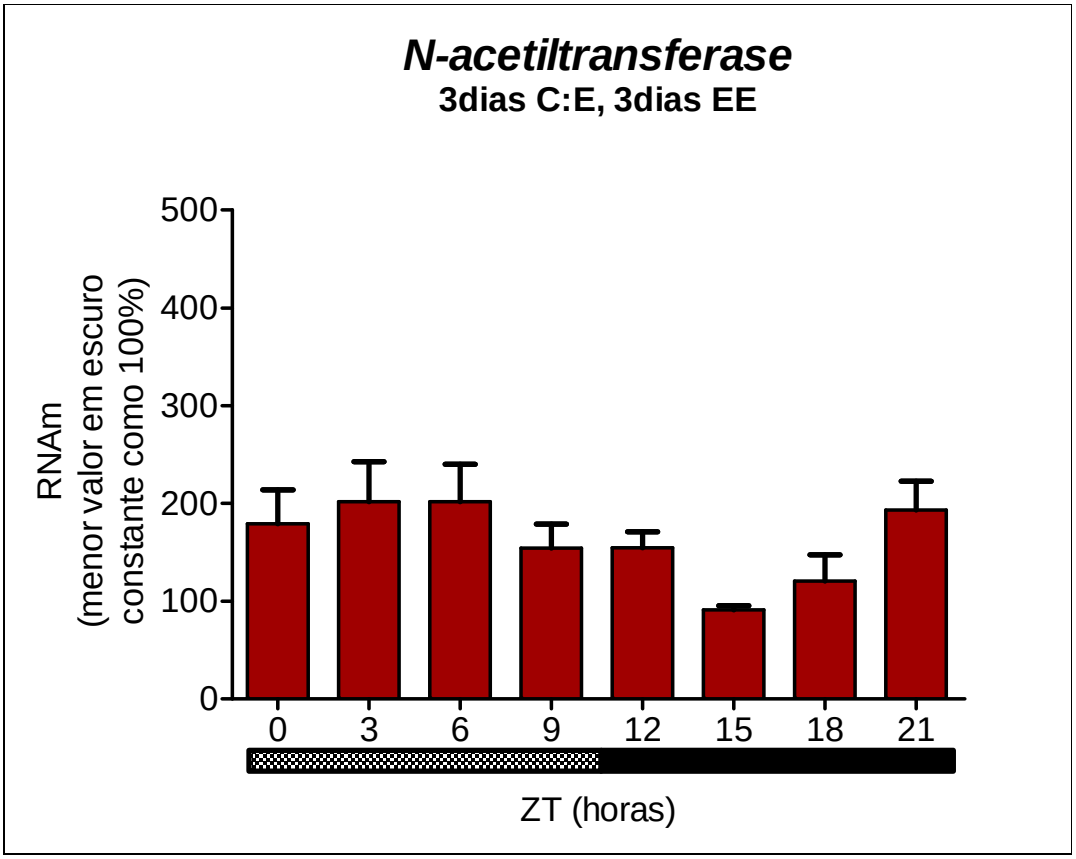


Figura 22. Expressão de *N-acetiltransferase* em fotoperíodo 12C:12E por três dias, seguidos de mais três dias em escuro constante. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *N-acetiltransferase* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor em escuro constante, que corresponde a 100 % (n=3-4 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em escuro constante, e tratadas ou não com 100 μM de glutamato por 12 h, a expressão do gene *N-acetiltransferase* não apresentou diferenças entre ZTs no grupo controle, nem no grupo tratado (Fig. 23). Sendo assim não aplicamos a análise por COSANA nem para o grupo tratado, nem para o grupo controle. O tratamento com glutamato também não alterou significativamente os níveis de RNAm.

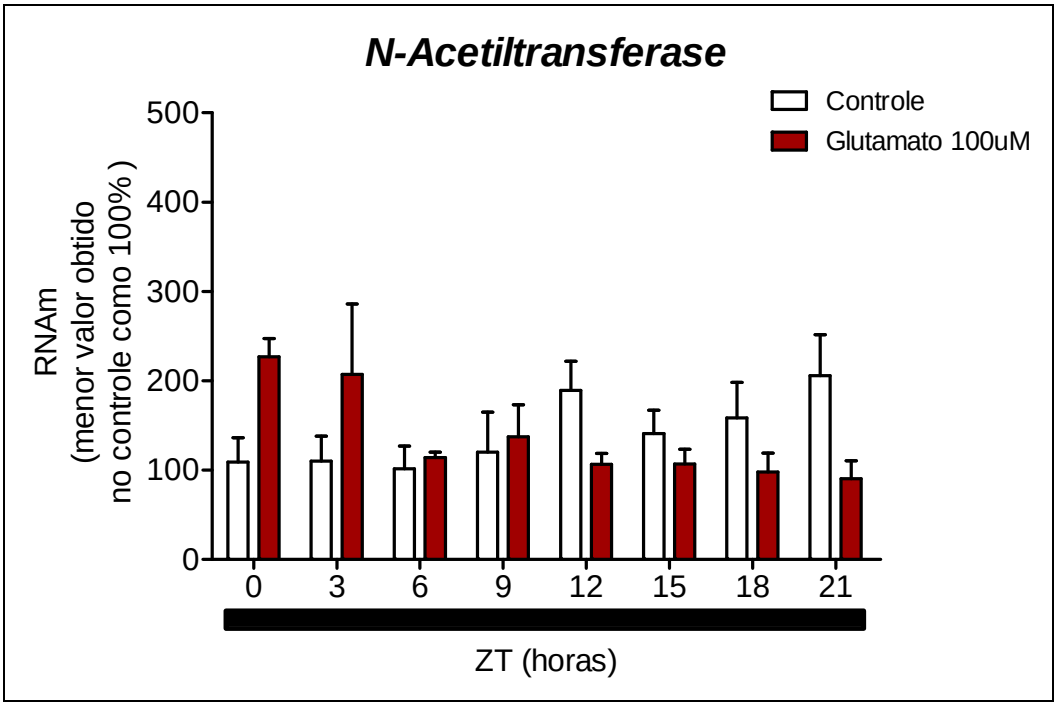


Figura 23. Expressão de *N-acetiltransferase* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante, e tratadas com 100μM de glutamato por 12 horas no quinto dia. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *N-acetiltransferase* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle, ZT6, que corresponde a 100 % (n=3-4 culturas primárias).

Tirosina Hidroxilase

Quando as culturas foram mantidas em escuro constante, a produção do RNAm de *Tirosina Hidroxilase* não apresentou variação entre os ZTs (Fig. 24). Sendo assim, não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano, visualmente, nem aplicamos a análise rítmica.

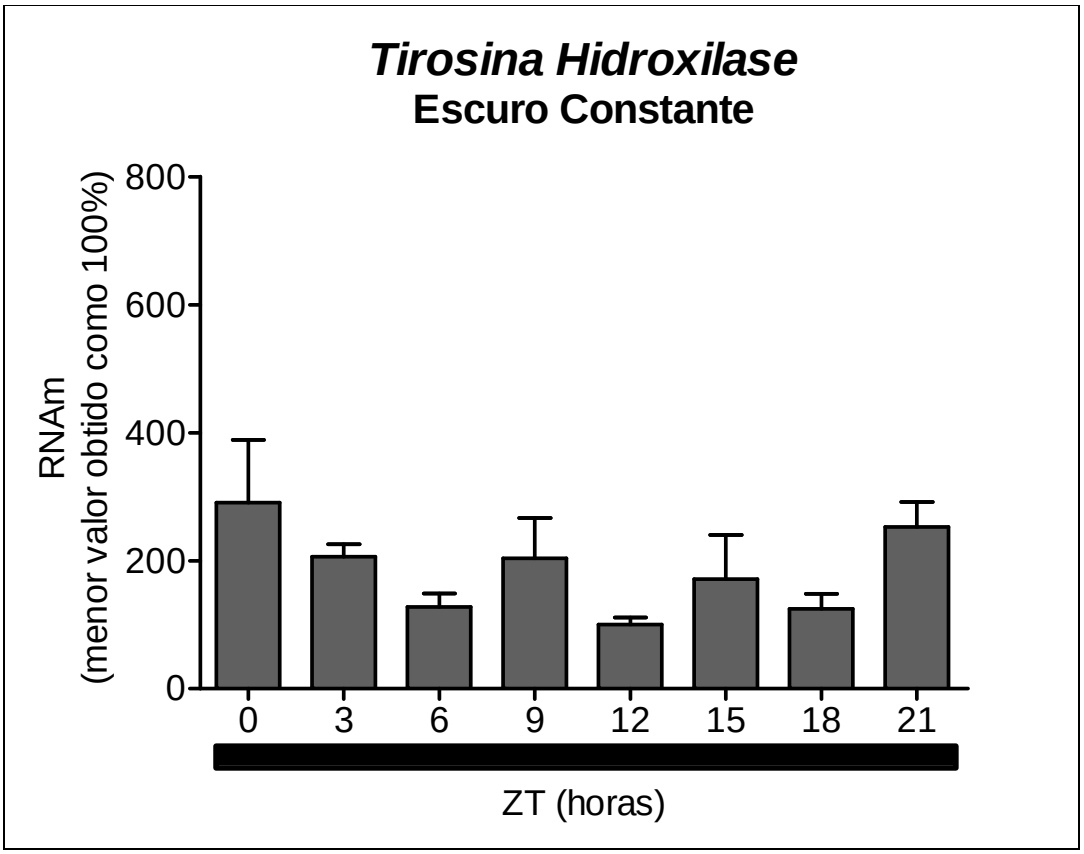


Figura 24. Expressão de *Tirosina Hidroxilase* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Tirosina Hidroxilase* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor, ZT12, que corresponde a 100 % (n=6-8 culturas primárias).

Em regime 12C:12E, a produção do RNAm de *Tirosina Hidroxilase* apresentou um valor elevado de expressão no ZT0 (quando a luz acendeu) em relação aos demais ZTs, e começou a cair drasticamente nos ZTs seguintes, até atingir o menor valor no ZT12, que corresponde ao início fase escura, aumentando cerca de cinco vezes nos ZTs seguintes da fase escura (Fig. 25). Foi possível identificar um padrão de expressão circadiano visualmente, e a análise por COSANA confirmou a existência de ritmo, pois p=0,045.

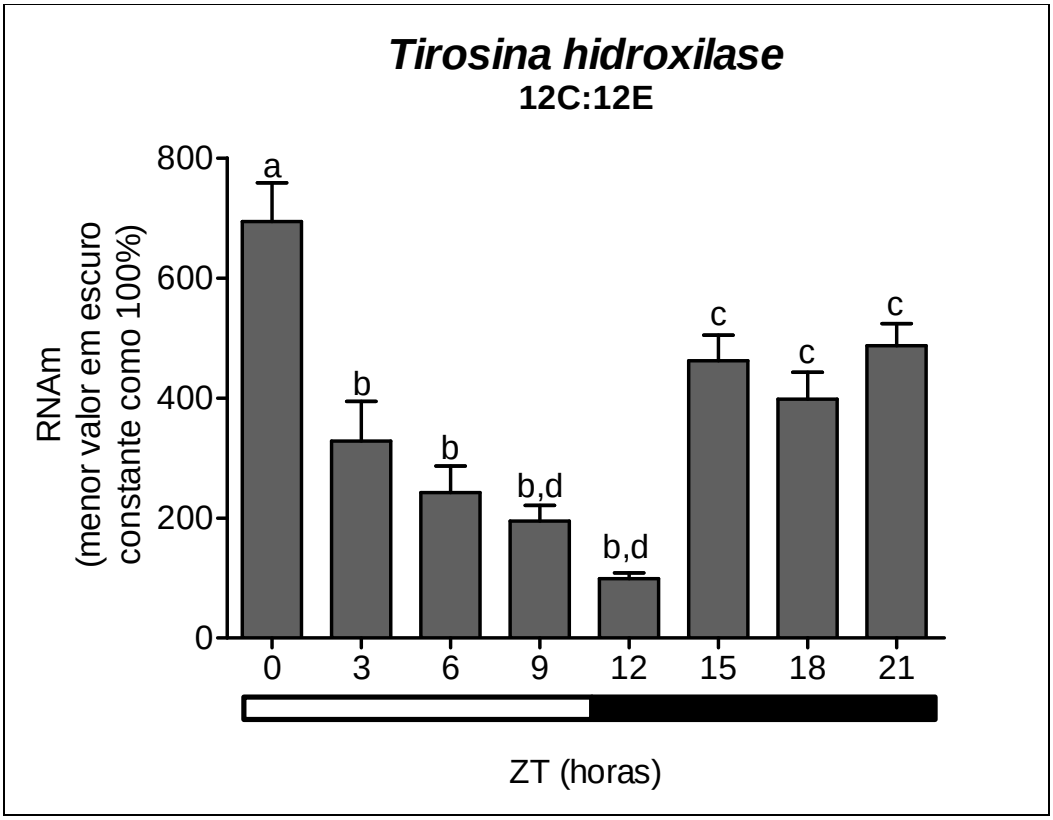


Figura 25. Expressão de *Tirosina Hidroxilase* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Tirosina Hidroxilase* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor em escuro constante, ZT12, que corresponde a 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b), e (c) indica que $p < 0,05$ em relação a (d) (n=6-8 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E por três dias, e em seguida em escuro constante por mais três dias, a produção do RNAm de *Tirosina Hidroxilase* teve seu menor valor no ZT15, diferente do ZT onde a produção deste RNAm foi aparentemente mínima quando as células foram mantidas em escuro constante. Porém, ao contrário do que aconteceu em escuro constante, foi possível identificar um pico de expressão no ZT3, o que corresponde à fase clara subjetiva, relativamente ao fotoperíodo em que as células foram pré-incubadas (Fig. 26). Não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano, nem visualmente, nem pela análise rítmica (p=0,356).

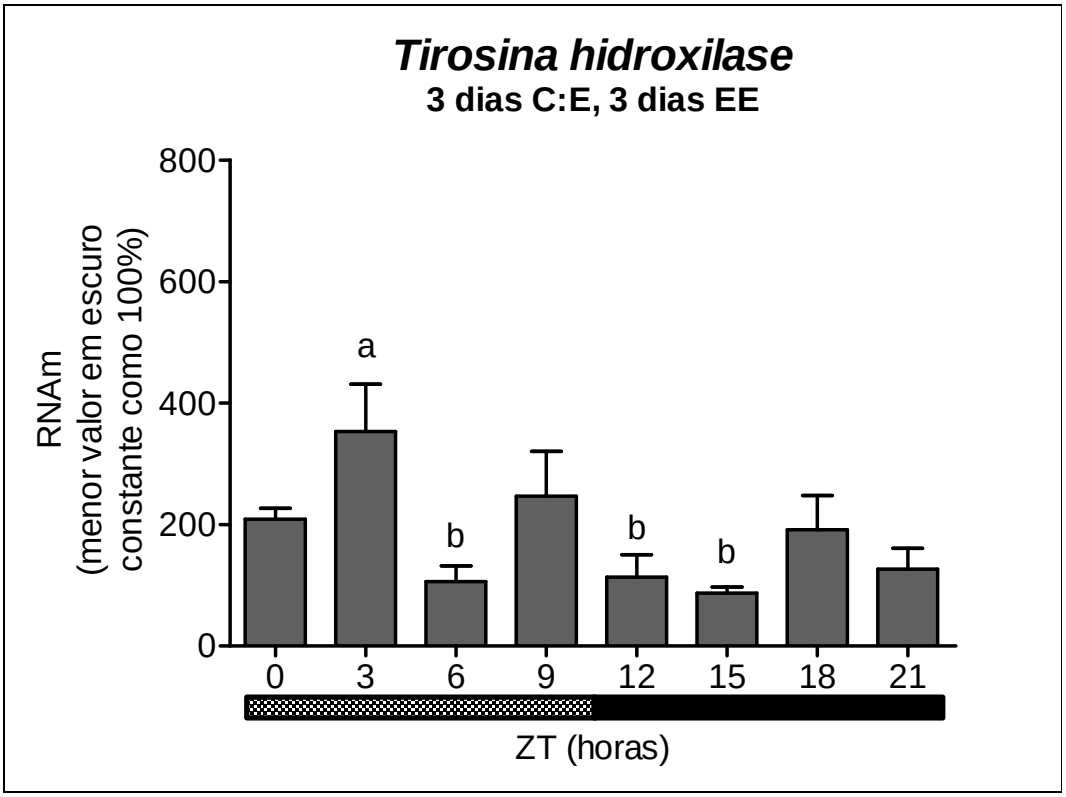


Figura 26. Expressão de *Tirosina Hidroxilase* em fotoperíodo 12C:12E por três dias, seguidos de mais três dias em escuro constante. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Tirosina Hidroxilase* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor em escuro constante, ZT15, que corresponde a 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b) (n=3-4 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em escuro constante, e tratadas ou não com 100 μM de glutamato por 12 h, a expressão do gene *Tirosina Hidroxilase* não apresentou diferenças entre ZTs no grupo controle, nem no grupo tratado, porém é possível notar que o tratamento com glutamato reduziu significativamente a produção deste RNAm do ZT6 ao ZT21 (Fig. 27). Não foi possível identificar padrão de expressão circadiano nem para o grupo tratado, nem para o grupo controle.

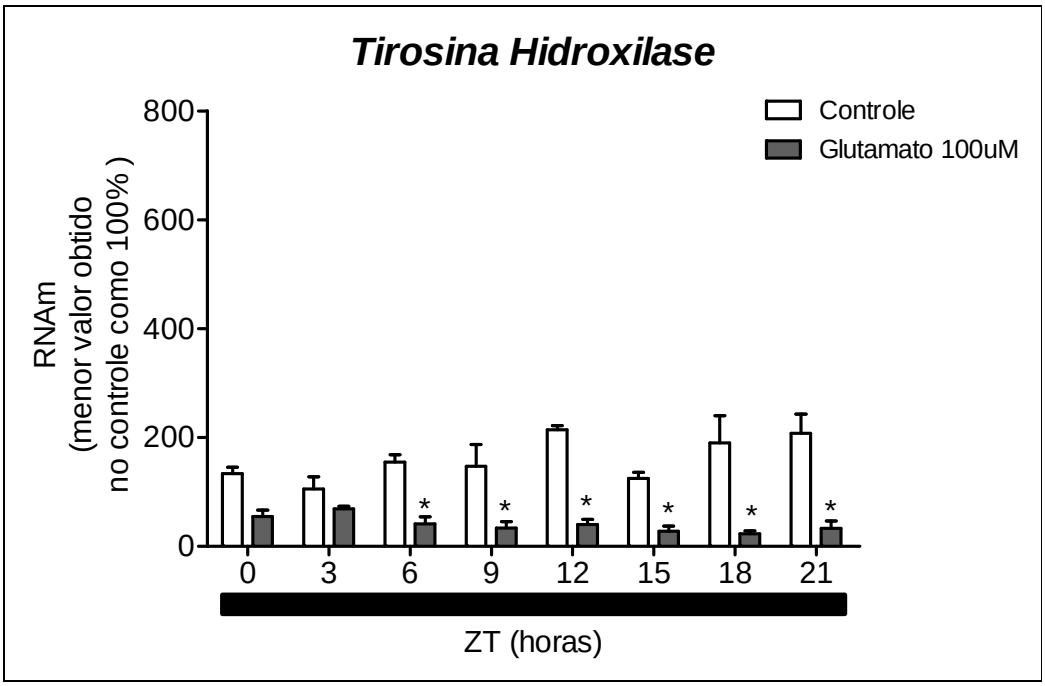


Figura 27. Expressão de *Tirosina Hidroxilase* em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante, e tratadas com 100 μM de glutamato por 12 h no quinto dia. Cada barra representa os valores de transcrição (% média, ± EPM) do gene *Tirosina Hidroxilase* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle, ZT3, que corresponde a 100 %. (*) indica que p <0,05, em relação ao respectivo controle. (n=3-4 culturas primárias).

Nos protocolos experimentais onde foi constatada variação na produção do RNAm do gene *Tirosina Hidroxilase* entre os horários analisados por ANOVA ONE WAY, a análise por COSANA também foi aplicada. No protocolo 12C:12E, a análise rítmica evidenciou um padrão de expressão circadiano com p=0,045, acrofase no ZT 21,48, amplitude de 210,37 e mesor de 363,34 (Fig. 28). No protocolo de 3 dias C:E, 3 dias EE, não foi possível evidenciar um padrão de expressão circadiano, pois p=0,356. Já no protocolo experimental onde as células foram tratadas ou não com glutamato, não houve variação entre os ZTs nos dois grupos, sendo assim, não foi aplicada a análise por COSANA.

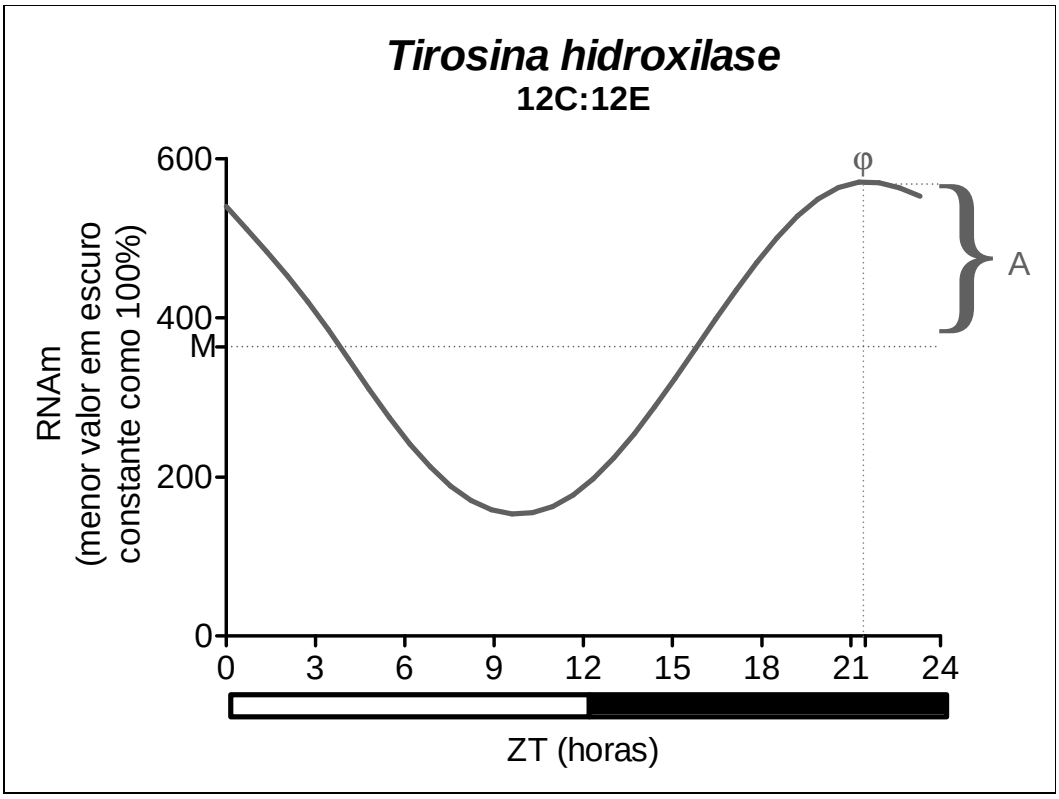


Figura 28. Curva ajustada pelo *software* COSANA para os valores de expressão de *Tirosina Hidroxilase* em fotoperíodo 12C:12E. (-) Representa a curva ajustada para os valores em 12C:12E. (φ) Representa a acrofase em 12C:12E. (M) Representa o mesor em 12C:12E. (A) Representa a amplitude em 12C:12E. O ZT24 corresponde ao ZT0 representado novamente para uma melhor visualização da análise rítmica.

Um resumo dos resultados de quantificação de RNA mensageiro, obtidos para os diversos genes, está apresentado na Tabela 5. Podemos resumidamente notar que ciclo claro-escuro e glutamato foram capazes de sincronizar a expressão de *Clock*, conferindo-lhe um ritmo significativo. O ciclo claro-escuro sincronizou *Per2* (análise visual), *Opn4m* (significativamente), *NAT* (análise visual) e *TH* (significativamente). Glutamato inibiu a expressão de *Opn4x* e *Opn4m,* e mais drasticamente de *TH,* mas não apresentou efeito algum sobre o RNAm de *Per2* e *NAT.*

Tabela 5. Ritmicidade ou arritmicidade do conteúdo de RNAm nos diferentes protocolos

RNAm	**ESCURO CONSTANTE**	**12C:12E**	**3 d 12C:12E + 3 d EE**	**CONTROLE**	**TRATADO GLUTAMATO**
Clock	Arrítmico, com variação	Rítmico	Arrítmico, com variação	Arrítmico, com variação	Rítmico
Per2	Arrítmico, com variação	Arrítmico (ritmo aparente)	Arrítmico, sem variação	Arrítmico, sem variação	Arrítmico, sem variação, sem efeito
Opn4x	Arrítmico, sem variação	Arrítmico, com variação	Arrítmico, com variação	Arrítmico (ritmo aparente)	Arrítmico, inibição
Opn4m	Arrítmico (ritmo aparente)	Rítmico	Arrítmico, sem variação	Arrítmico (ritmo aparente)	Arrítmico, Inibição
N-acetil-transferase	Arrítmico, com variação	Arrítmico (ritmo aparente)	Arrítmico, sem variação	Arrítmico, sem variação	Arrítmico, sem variação, sem efeito
Tirosina hidroxilase	Arrítmico, sem variação	Rítmico	Arrítmico, sem variação	Arrítmico, sem variação	Arrítmico, sem variação, forte inibição

Expressão protéica

Ensaio Imunocitoquímico

A presença de células imunopositivas ao anticorpo anti-OPN4x mel 2 foi confirmada em culturas de retina no sexto dia de cultivo (Figs. 29A e 29B). Nas imagens com filtro para DAPI, nas quais o núcleo de todas as células aparece marcado, é possível notar a presença de células imuno-negativas ao anticorpo anti-OPN4x.

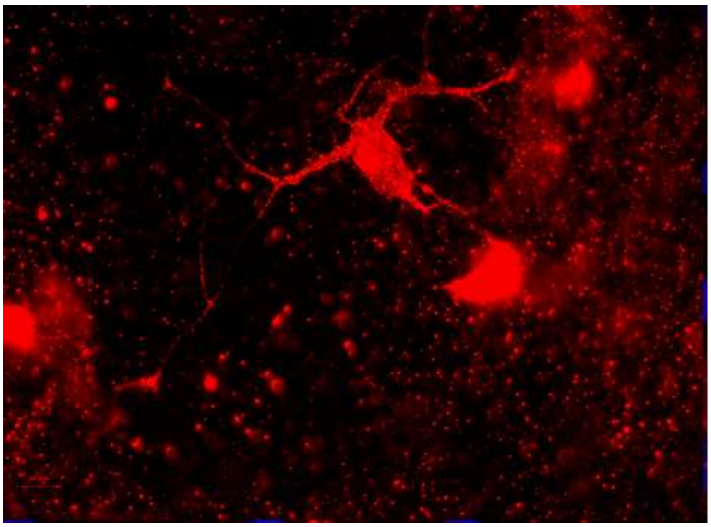


Figura 29A. Células de cultura de retina de *Gallus gallus* imunopositivas ao anticorpo anti-melanopsina na concentração 1:2000. Aum. 400x

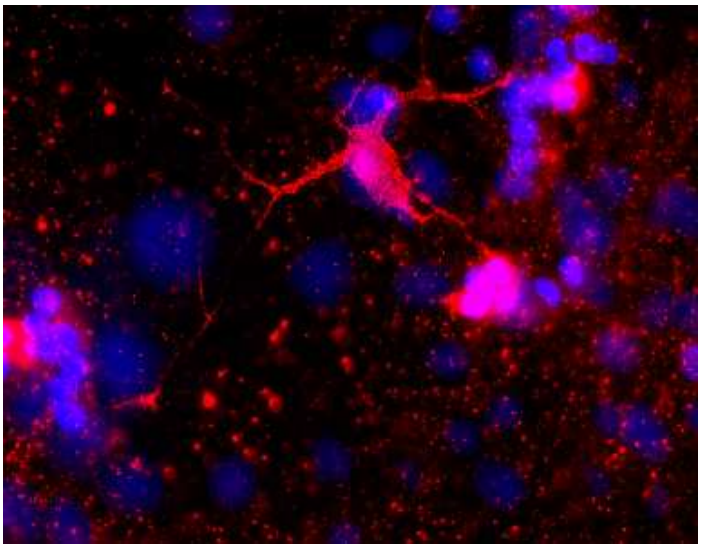


Figura 29B. Células de cultura de retina de *Gallus gallus* imunopositivas ao anticorpo anti-melanopsina na concentração 1:2000 com filtro para DAPI. Aum. 400x.

Western Blot

CLOCK

Quando as culturas foram mantidas em escuro constante, a concentração da proteína CLOCK não apresentou variação entre ZTs (Fig. 30). Não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano visualmente, e a análise rítmica não foi aplicada.

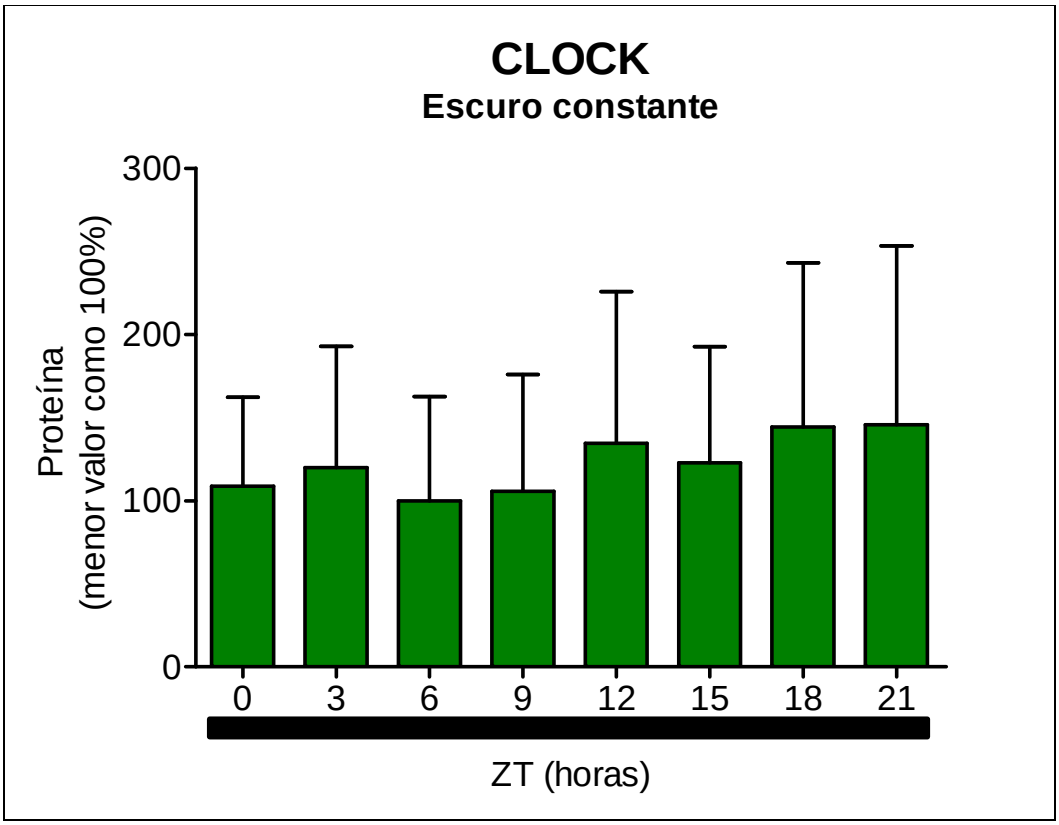


Figura 30. Expressão de CLOCK em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante. Cada barra representa a quantidade da proteína (% média, ± EPM) normalizada pela quantidade de β-ACTINA em 40 µg de proteína total, expressa em relação ao menor valor, que corresponde a 100 % (n=3 culturas primárias).

Em regime 12C:12E, a concentração da proteína CLOCK apresentou o maior valor aparente no ZT21, que corresponde à fase escura, e de acordo com a análise estatística, não houve variação entre os ZTs (Fig. 31).

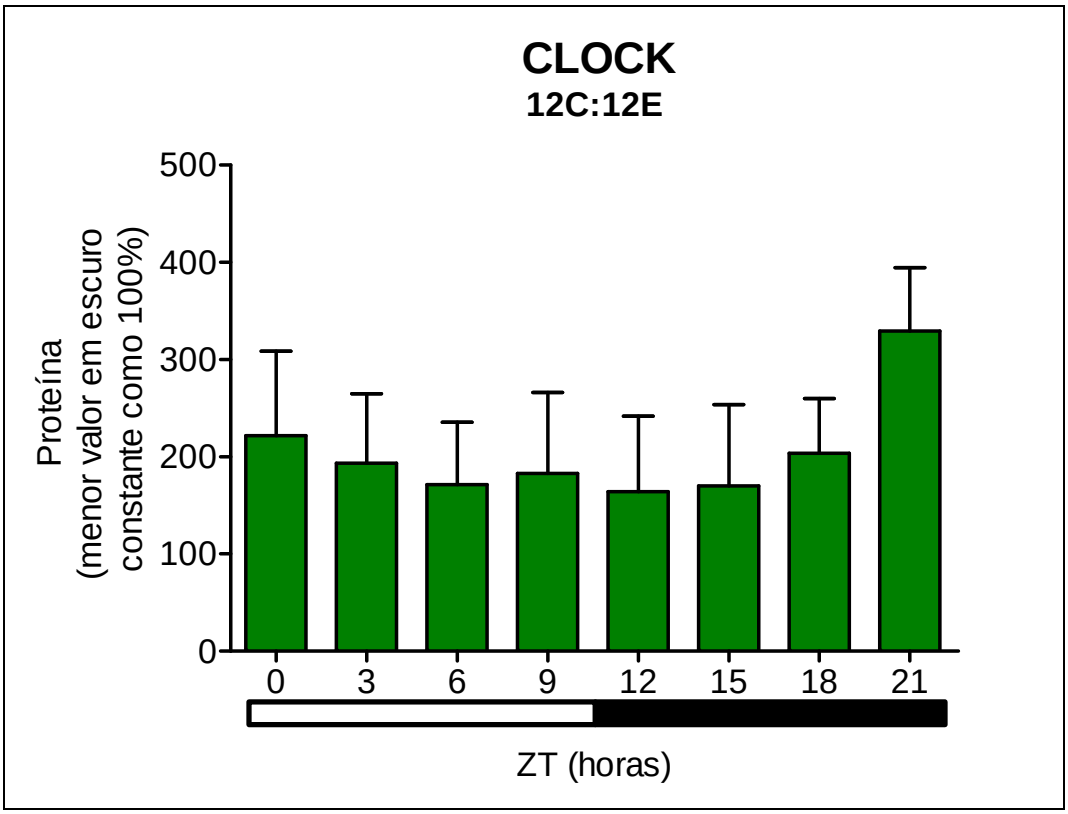


Figura 31. Expressão de CLOCK em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa a quantidade da proteína (% média, ± EPM) normalizada pela quantidade de β-ACTINA em 40µg de proteína total, expressa em relação ao menor valor em escuro constante, que corresponde a 100 % (n=3 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em escuro constante, e tratadas ou não com 100 µM de glutamato por 12 h, a concentração da proteína CLOCK no grupo controle apresentou o menor valor de expressão no ZT0, e atingiu o máximo no ZT18. O grupo tratado também apresentou o menor valor no ZT0, porém este atingiu o valor máximo no ZT21. É possível notar que o tratamento inibiu significativamente a produção da proteína nos ZTs 0, 9 e 18 em relação ao grupo controle (Fig. 32). Embora seja possível identificar visualmente um padrão de expressão circadiano, o ritmo não foi confirmado pela análise por COSANA para o grupo controle, p=0,168 ou para o grupo tratado, p =0,658.

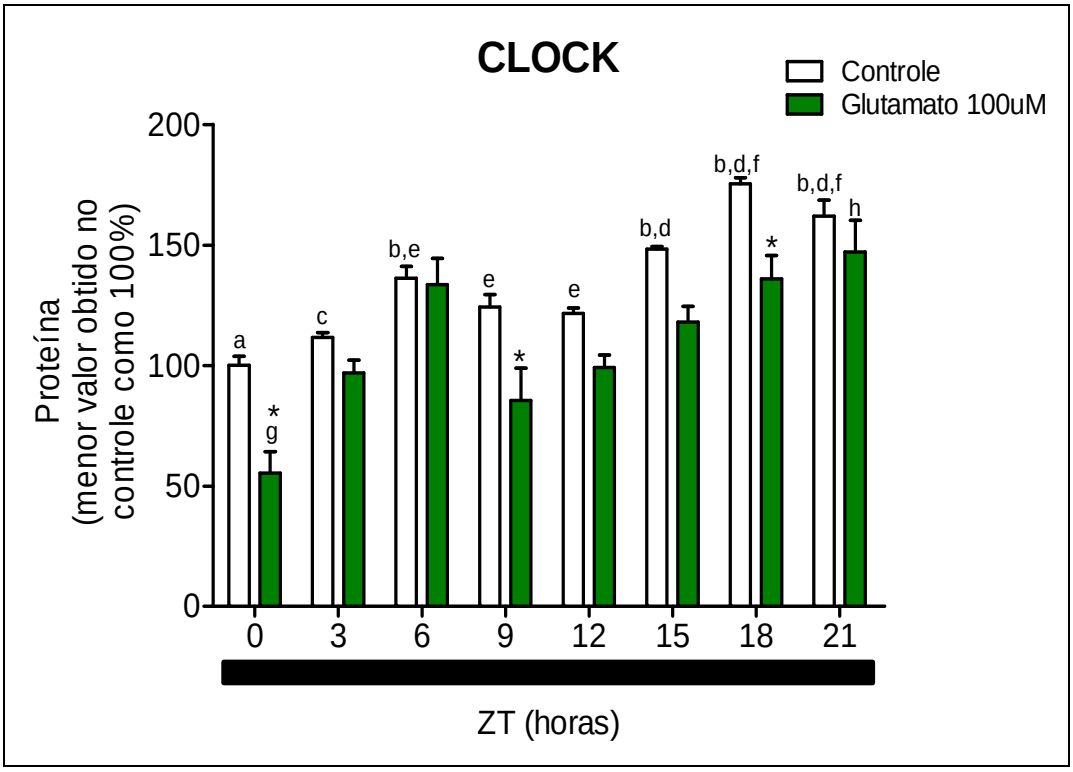


Figura 32. Expressão de CLOCK em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante, e tratadas com 100µM de glutamato por 12 horas no quinto dia. Cada barra representa a quantidade da proteína (% média, ± EPM) normalizada pela quantidade de β-ACTINA em 40µg de proteína total, expressa em relação ao menor valor do grupo controle, que corresponde a 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b), (c) indica que $p < 0,05$ em relação a (d), (e) indica que $p < 0,05$ em relação a (f), (g) indica que $p < 0,05$ em relação a (h), (*) indica que $p < 0,05$, em relação ao respectivo controle (n=3 culturas primárias).

OPN4x

Embora seja visível uma variação na concentração da proteína OPN4x quando as culturas foram mantidas em escuro constante, não foi possível fazer uma análise estatística, pois o *n* amostral aqui apresentado é de apenas 2 (Fig. 33).

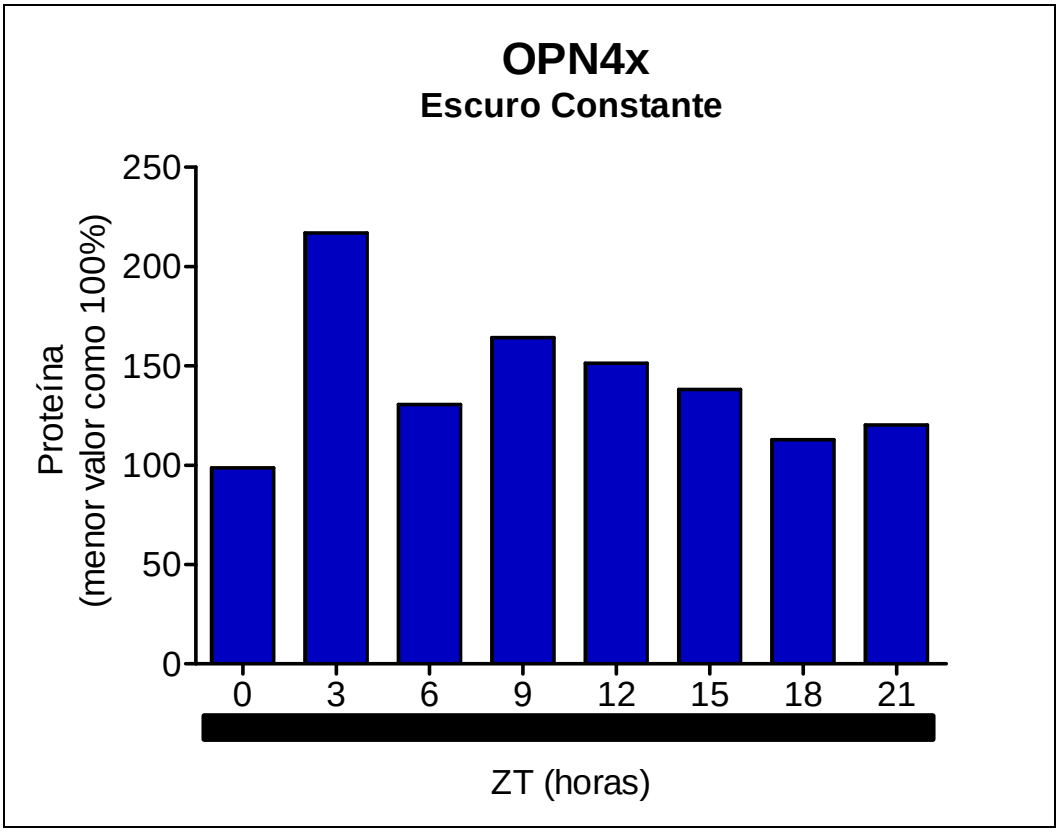


Figura 33. Expressão de OPN4X em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante. Cada barra representa a quantidade da proteína (% média, ± EPM) normalizada pela quantidade de β-ACTINA em 40µg de proteína total, expressa em relação ao menor valor, que corresponde a 100 % (n=2 culturas primárias).

Em regime 12C:12E, a concentração da proteína OPN4x, apresentou o maior valor aparente no ZT21, que corresponde à fase escura mas, de acordo com a análise estatística, não houve variação entre os ZTs (Fig. 34).

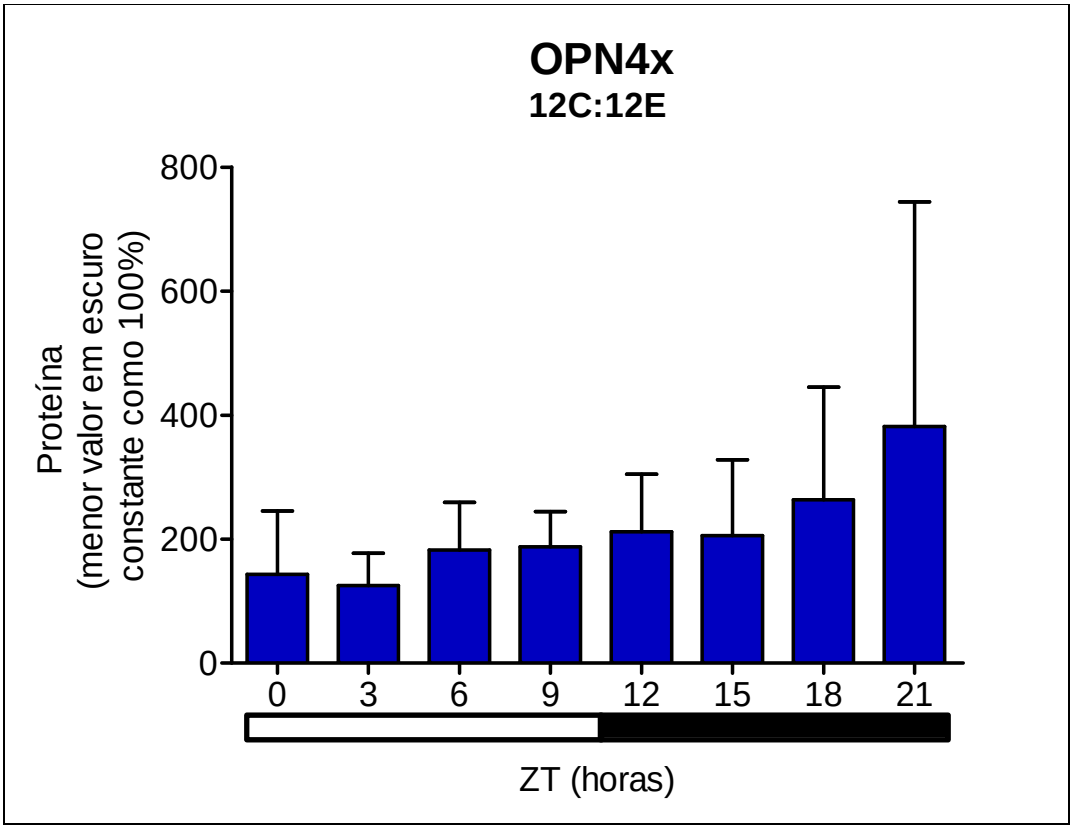


Figura 34. Expressão de OPN4X em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa a quantidade da proteína (% média, ± EPM) normalizada pela quantidade de β-ACTINA em 40µg de proteína total, expressa em relação ao menor valor em escuro constante, que corresponde a 100 % (n=3 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em escuro constante, e tratadas ou não com 100 µM de glutamato por 12 h, a concentração da proteína OPN4x no grupo controle apresentou o menor valor de expressão no ZT3, e atingiu o máximo no ZT0. O grupo tratado apresentou o menor valor no ZT0, e este atingiu o valor máximo logo em seguida no ZT3. O tratamento inibiu significativamente a produção da proteína nos ZTs 0 e 18 em relação ao grupo controle (Fig. 35). Não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano visualmente para o grupo controle ou para o grupo tratado. A análise por COSANA confirmou a ausência de ritmicidade para as células tratadas com glutamato, pois p =0,992.

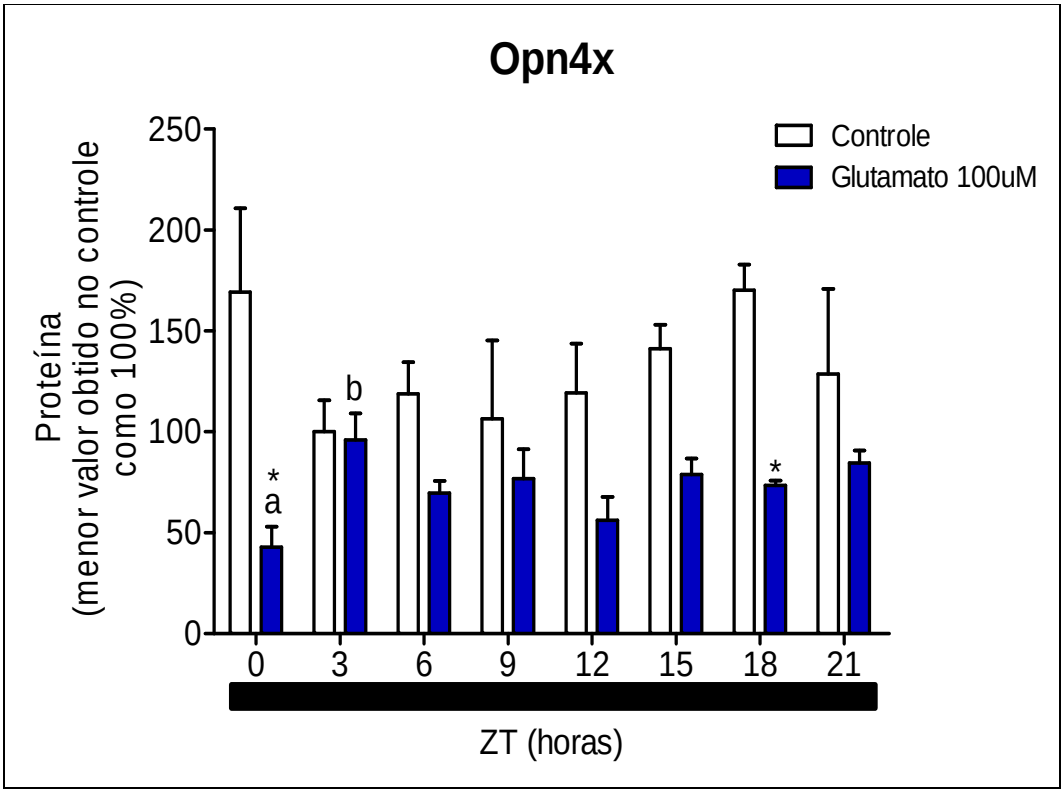


Figura 35. Expressão de OPN4x em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante, e tratadas com 100 µM de glutamato por 12 h no quinto dia. Cada barra representa a quantidade da proteína (% média, ± EPM) normalizada pela quantidade de β-ACTINA em 40µg de proteína total, expressa em relação ao menor valor do grupo controle, que corresponde a 100 %. (a) indica que $p < 0,05$ em relação a (b). (*) indica que $p < 0,05$, em relação ao respectivo controle (n=3 culturas primárias).

TIROSINA HIDROXILASE

Embora seja visível uma variação na concentração da proteína TIROSINA HIDROXILASE quando as culturas foram mantidas em escuro constante, não foi possível aplicar-se estatística, pois o *n* amostral aqui apresentado é de apenas 2 (Fig. 36).

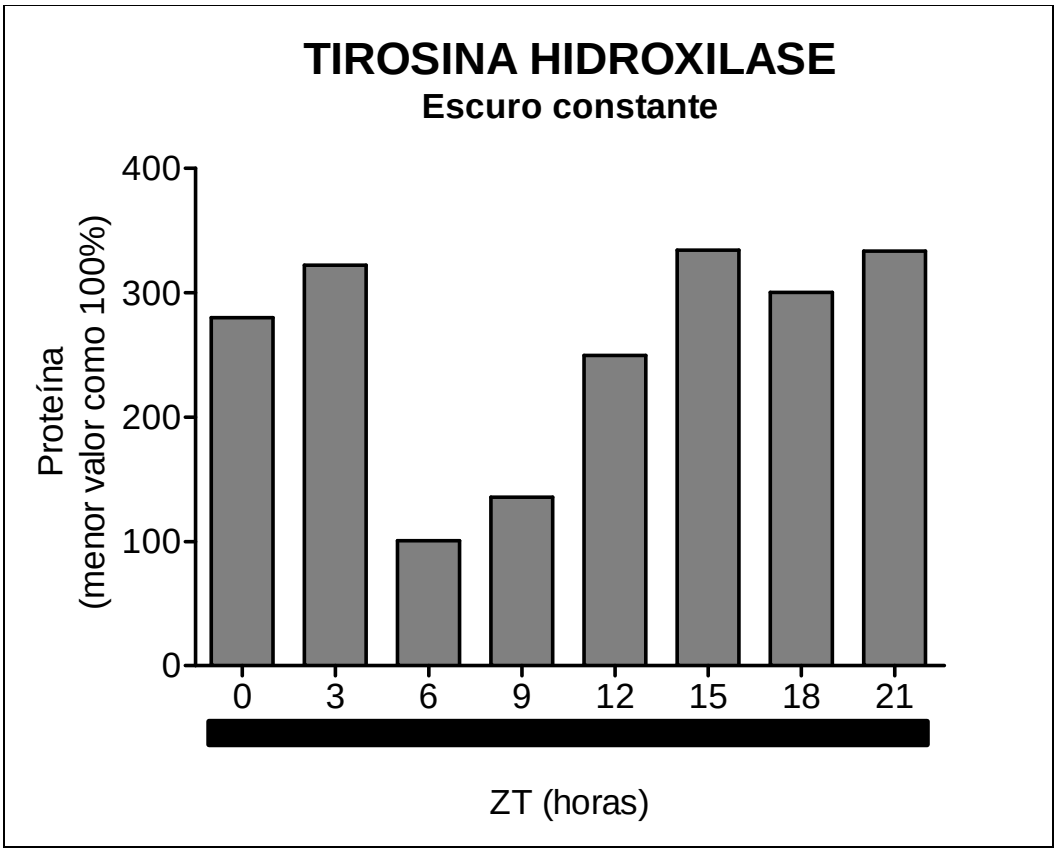


Figura 36. Expressão de TIROSINA HIDROXILASE em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante. Cada barra representa a quantidade da proteína (% média, ± EPM) normalizada pela quantidade de β-ACTINA em 40µg de proteína total, expressa em relação ao menor valor, que corresponde a 100 % (n=2 culturas primárias).

Em regime 12C:12E, a concentração da proteína TIROSINA HIDROXILASE apresentou o maior valor aparente no ZT15, que corresponde à fase escura mas, de acordo com a análise estatística, não houve variação entre os ZTs (Fig. 37).

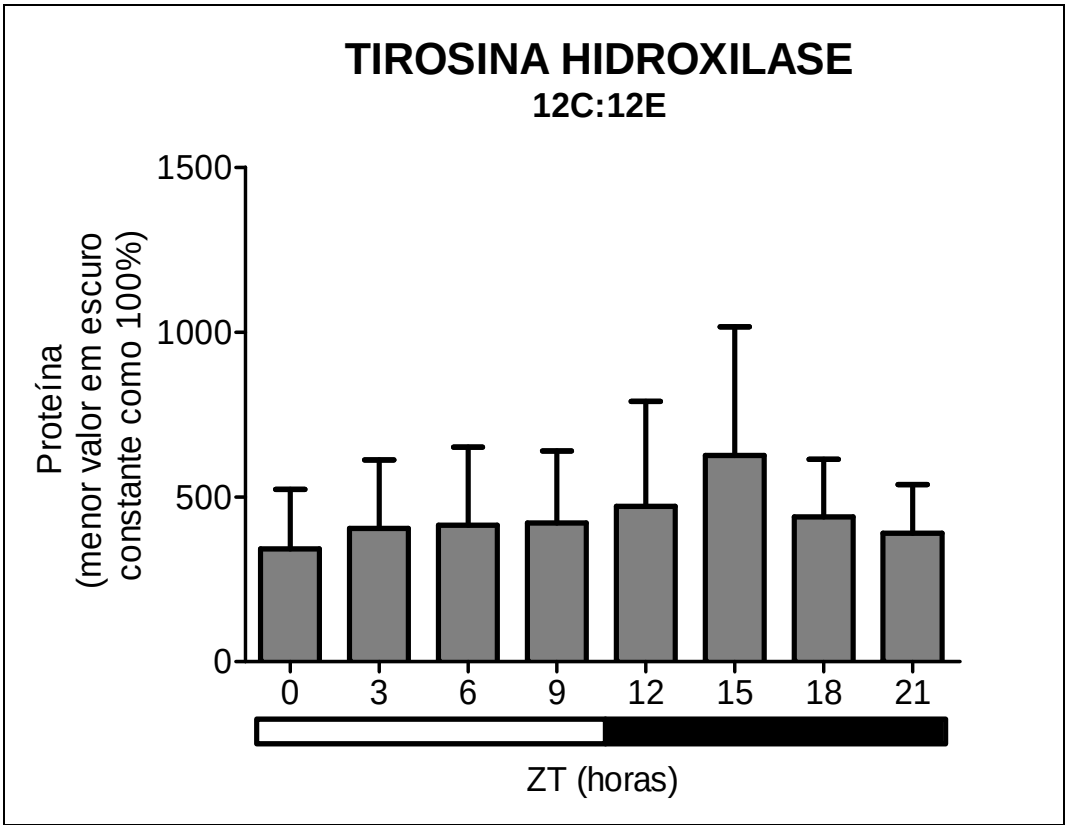


Figura 37. Expressão de TIROSINA HIDROXILASE em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E. Cada barra representa a quantidade da proteína (% média, ± EPM) normalizada pela quantidade de β-ACTINA em 40µg de proteína total, expressa em relação ao menor valor em escuro constante, que corresponde a 100 % (n=3 culturas primárias).

Quando as células foram mantidas em escuro constante, e tratadas ou não com 100 μM de glutamato por 12 h, a concentração da proteína TIROSINA HIDROXILASE no grupo controle apresentou o menor valor aparente de expressão no ZT3, e atingiu o máximo no ZT0. O grupo tratado apresentou o menor valor aparente no ZT15, e atingiu o valor máximo no ZT3. De acordo com a análise estatística, não houve variação entre os ZTs (Fig. 38). Sendo assim, não aplicamos análise rítmica para os grupos. Estatisticamente também não houve diferenças na expressão da proteína entre as células controle e as tratadas com glutamato.

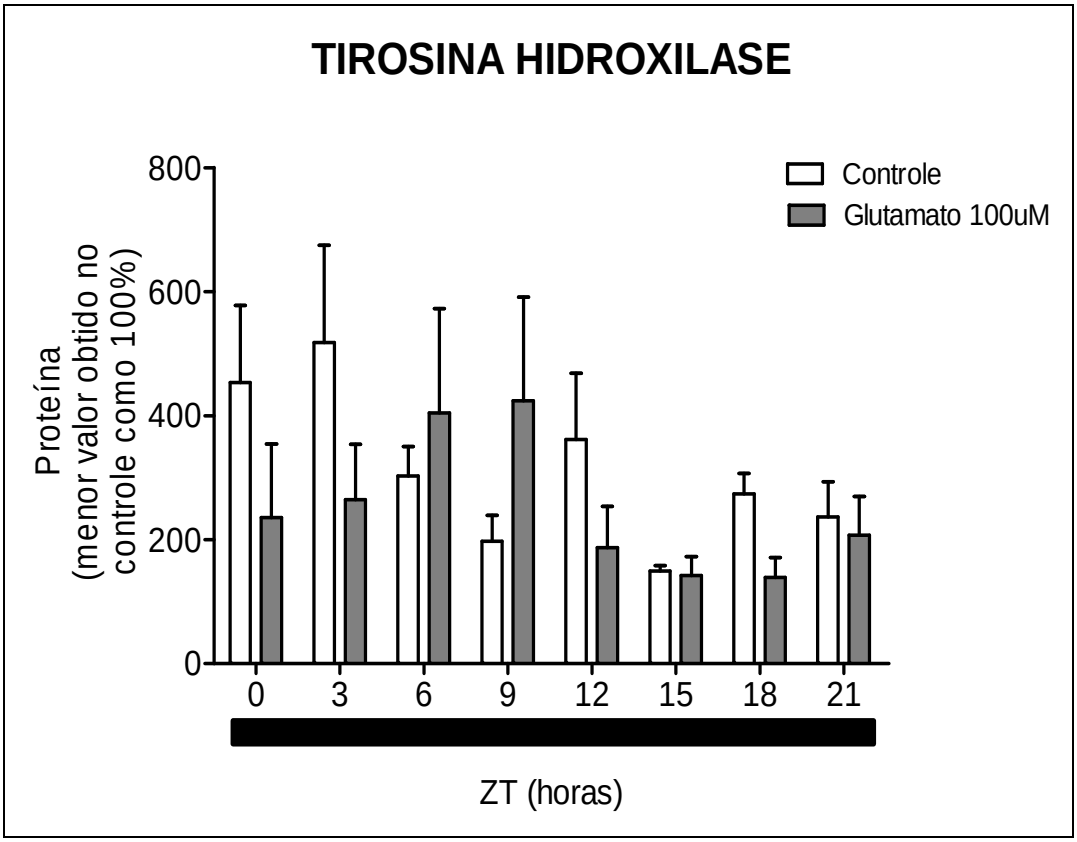


Figura 38. Expressão de TIROSINA HIDROXILASE em culturas de células de retina de embriões de galinha mantidas em escuro constante, e tratadas com 100μM de glutamato por 12 horas no quinto dia. Cada barra representa a quantidade da proteína (% média, ± EPM) normalizada pela quantidade de β-ACTINA em 40μg de proteína total, expressa em relação ao menor valor do grupo controle, que corresponde a 100 % (n=3 culturas primárias).

OPN4m

Os únicos anticorpos anti-melanopsina de *Gallus gallus* descritos na literatura são os anticorpos feitos por Arjun Natesan, gentilmente cedidos para nosso laboratório. Estes anticorpos foram fabricados contra a OPN4x, antes da descoberta da OPN4m. Comparando-se as sequências dessas duas proteínas, verificamos que a sequência intermembrânica contra a qual o anticorpo Mel 1 foi feito, assim como a sequência C-terminal para a qual o anticorpo Mel 2 foi feito, são totalmente diferentes (Fig. 39). Dessa forma, temos absoluta certeza de que, tanto a análise imunocitoquímica, como a por *Western Blot*, detectaram exclusivamente OPN4x. Na falta de anticorpos contra OPN4m disponíveis, foi-nos impossível realizar estudos sobre essa proteína neste trabalho.

```
NP_989956  1    MDLNMGTQPHSVTKS------------EIPDHVLYTVGTCVLVIGSIGIIGNLLVLYAFYSNKKLRTPQNFFIMNLAVSD  68
AAX73255   1    MDL----PPRAPTKMTVKDVRGAFPTVDVPDHAHYTIGTVILIVGITGTLGNFLVIYAFCRSRTLQKPANIFIINLAVSD  76

NP_989956  69   FLMSASQAPICFVNSLHREWILGDIGCDLYAFCGALFGITSMMTLLAISVDRYLVITKPLRSIQWTSKKRTIQIIAAVWL  148
AAX73255   77   FLMSITQSPVFFTNSLHKRWIFGEKGCELYAFCGALFGITSMITLMVIALDRYFVITKPLASVRVMSKKKALIILVGVWL  156

NP_989956  149  YSLGWSVAPLLGWSSYVPEGLMISCTWDYVTYSPANRSYTMILCCCVFFIPLIIILHCYLFMFLAIRSTGRDVQKLGSCS  228
AAX73255   157  YSLAWSLPPFFGWSAYVPEGLLTSCSWDYMTFTPSVRAYTMLLFCFVFFIPLIAIIYSYVFIFEAIKKANKSVQTFGCKH  236

NP_989956  229  RKSFLSQS---MKNEWKLAKIAFVVIIVYVLSWSPYACVTLIAWAGRGNTLTPYSKSVPAVIAKASAIYNPIIYAIIHPR  305
AAX73255   237  GNRELQKQYHRMKNEWKLAKIALIVILLYVISWSPYSVVALVAFAGYSHVLTPFMNSVPAVIAKASAIHNPIIYAITHPK  316

NP_989956  306  YRKTIHNAVPCLRFLIRISKNDLLRGSINESSFRTSLSSHQS-LAGRTKNTC-VSSVSTGEANWSDVELDTVEPAHEKLQ  383
AAX73255   317  YRTAIATYVPCLGFLLRVSPKESRSFSSYPSSRRTTITSQSSETSGLQKGKRRLSSISDSESGCTDTETDITSMISRPAS  396

NP_989956  384  PRRSHSFSSSLRQKRDLLPDSYSCSEETEEKVSLSSSYLEKVLGRSAFPSSPVALVTSSLRAASLPVGLNSSSASRGAGS  463
AAX73255   397  SQVSYEMGEDTTQTSDL---------GGKPKVK---SHDSGIFGKAVVDADEIPMVEINDTEHSA-----TSTCKTSEKC  459

NP_989956  464  DISQMKTEESHNNGGLDSIVS------NTVPQIIIIPTSETNLFQEEPEEEETELFHFHDKKNNLLDLEGLSSSTEFLEA  537
AAX73255   460  NVEEIQRSESLSGIGLREGESRRRTSASQIPSIIITYSNVQGV--ELPSGYSAGFLHPKNKSH----IQNKSSNS-----  528

NP_989956  538  VEKFLS  543
AAX73255        ------
```

Figura 39. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas OPN4x (NP_98995.6) e OPN4m (AAX7325.5). (▭) Sequência de aminoácidos utilizada como epitopo para a fabricação do anticorpo anti-melanopsina Mel 1. (▭) Sequência de aminoácidos utilizada como epitopo para fabricação do anticorpo anti-melanopsina Mel 2.

PER2

A análise da expressão de *Per2* foi incluída recentemente, após a apresentação de nossos resultados na 10th Gordon Research Conference on ***PINEAL Cell Biology- Mechanisms of Circadian rhythmicity and Melatonin Action***, seguindo a sugestão do Dr. Hashidul Haque, do grupo do Dr. Mike Iuvone. Assim sendo, devido ao curto tempo, não foi possível realizar os ensaios de análise protéica com esse gene.

N-ACETILTRANSFERASE

Na padronização dos ensaios de *Western Blot*, utilizando proteína extraída no ZT0 de retinas de pintos recém-eclodidos mantidos por sete dias em fotoperíodo 12C:12E, a identificação de uma banda correspondendo ao peso molecular da N-ACETILTRANSFERASE foi quase imperceptível. Em nenhum de nossos experimentos com culturas de células embrionárias foi possível identificar a presença de tal banda. Esses resultados podem ser devidos tanto à ausência de expressão da proteína nessa fase embrionária, como à baixa eficiência do anticorpo.

Um resumo dos resultados de análise protéica, obtidos para CLOCK, OPN4x e TH, está apresentado na Tabela 6. A grande variabilidade inter-ensaios nos resultados de quantificação protéica sugere uma menor precisão para esse método, quando comparado a PCR quantitativo.

Tabela 6. Ritmicidade ou arritmicidade do conteúdo protéico nos diferentes protocolos

PROTEÍNA	ESCURO CONSTANTE	12C:12E	CONTROLE	TRATADO GLUTAMATO
CLOCK	Arrítmico	Arrítmico (ritmo aparente)	Arrítmico	Arrítmico (ritmo aparente)
OPN4x	Arrítmico	Arrítmico (ritmo aparente)	Arrítmico (ritmo aparente)	Arrítmico, inibição
TIROSINA HIDROXILASE	Arrítmico, (ritmo aparente)	Arrítmico	Arrítmico	Arrítmico, (ritmo aparente)

Viabilidade celular e fragmentação de DNA

Embora o número amostral seja pequeno (n=3), é possível notar que 12 horas após o término do tratamento com 100 µM de glutamato houve uma singela redução na viabilidade das células em cultura (Figs. 40, 41 e 42). A redução na viabilidade celular apresentada não teve relação com a fragmentação de DNA nessas condições, pois as células controle apresentaram maior fragmentação do que as células tratadas (Figs. 43 e 44).

Trinta e seis horas após o término do tratamento, a viabilidade das células no grupo controle foi significativamente menor que no grupo tratado (Figs. 45 e 46). Nessas condições, não houve diferença na fragmentação do DNA (Figs. 47 e 48).

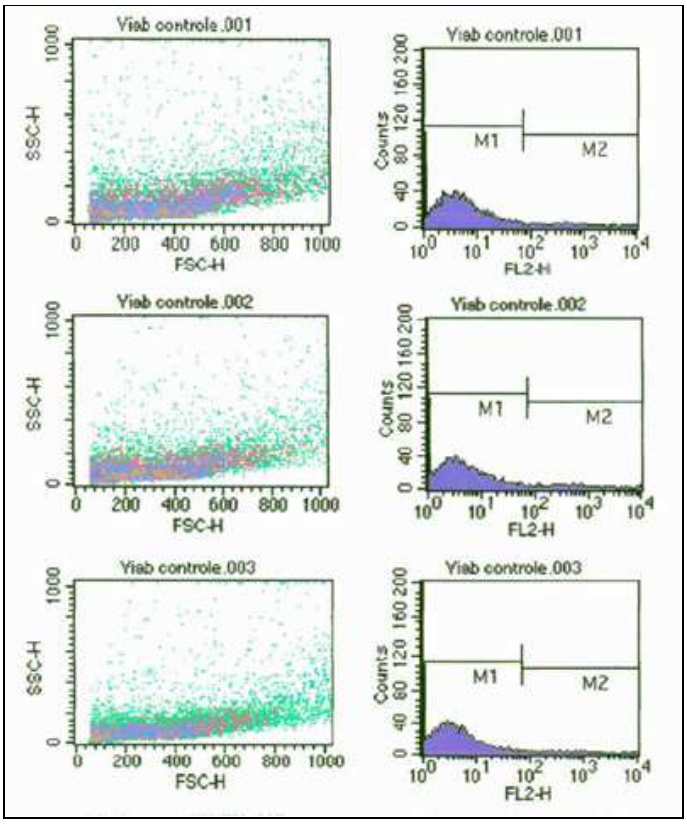


Figura 40. Análise por citometria de fluxo de células de retina de embriões de galinha na ausência de glutamato. As células foram obtidas no ZT0 do sexto dia, 12 h após o término do tratamento. Os pontos plotados nos gráficos da esquerda representam tamanho relativo (FSC) das células e granulosidade (SSC). Os histogramas à direita mostram a intensidade de fluorescência no canal FL-2 emitida pelas células. As células com a membrana íntegra encontram-se em M1.

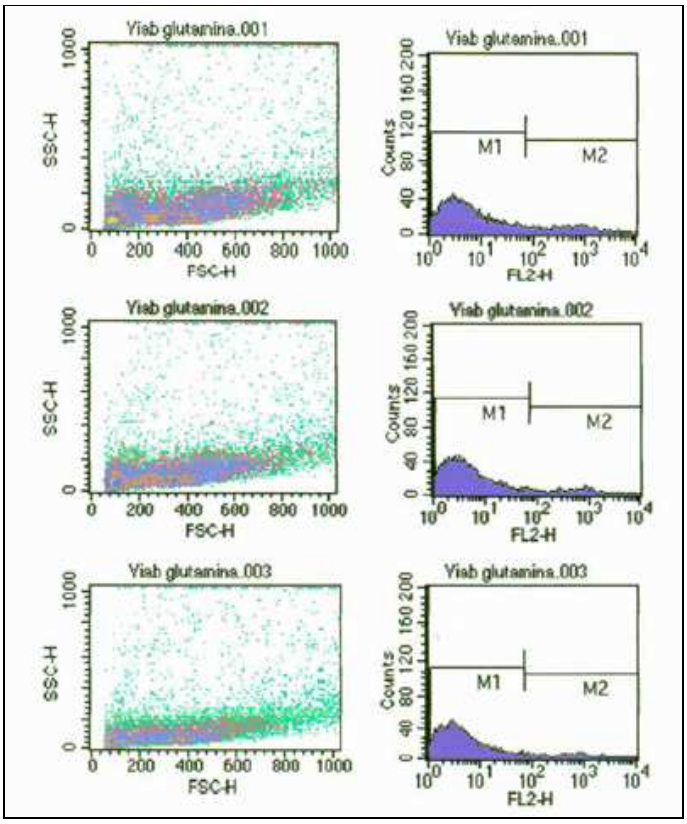


Figura 41. Análise por citometria de fluxo de células de retina de embriões de galinha tratadas com 100 µM de glutamato por 12 h. As células foram obtidas no ZT0 do sexto dia, 12 h após o término do tratamento. Os pontos plotados nos gráficos da esquerda representam tamanho relativo (FSC) das células e granulosidade (SSC). Os histogramas à direita mostram a intensidade de fluorescência no canal FL-2 emitida pelas células. As células com a membrana íntegra encontram-se em M1.

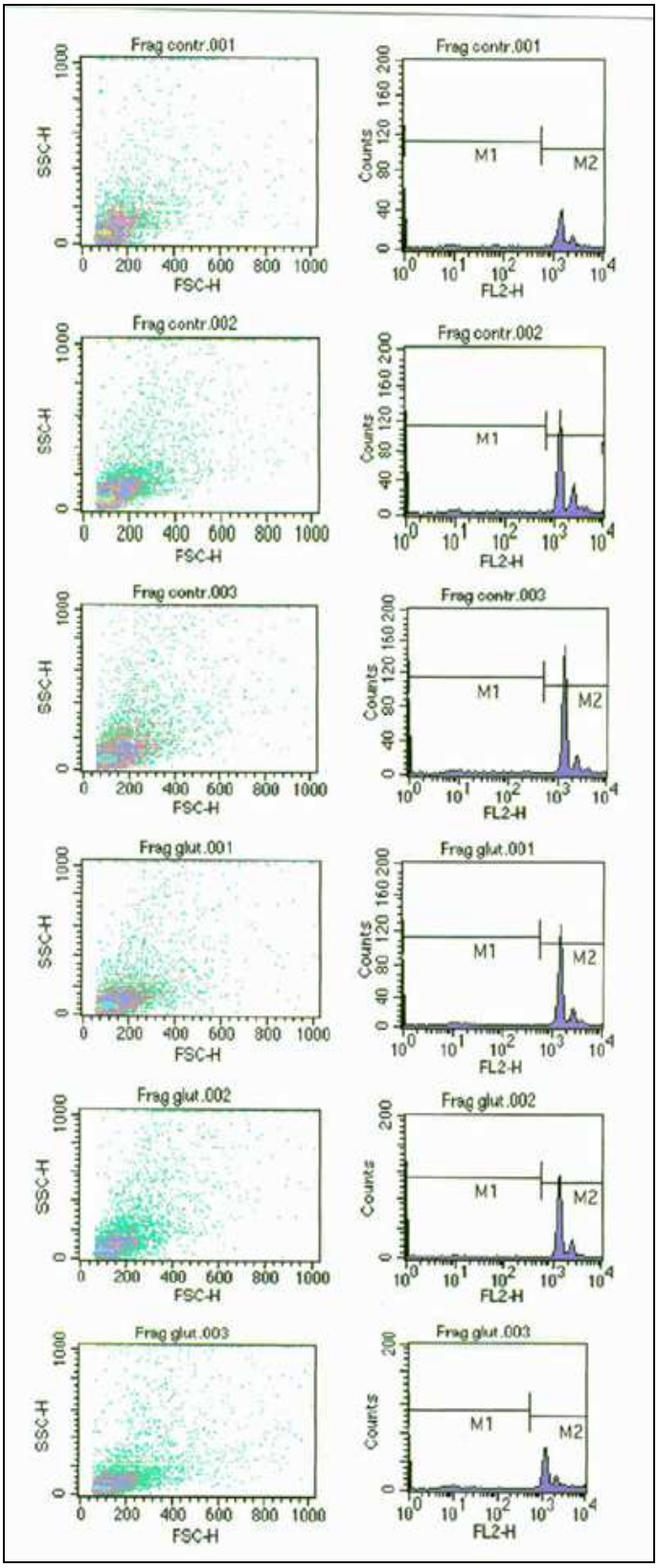


Figura 42. Análise por citometria de fluxo de núcleos de células de retina de embriões de galinha na presença (Frag glut 001-003) e na ausência (Frag glut 001-003) de 100 µM de glutamato por 12 h. As células foram obtidas no ZT0 do sexto dia, 12 h após o término do tratamento. Os pontos plotados nos gráficos da esquerda representam tamanho relativo (FSC) das células e granulosidade (SSC). Os histogramas à direita mostram a intensidade de fluorescência no canal FL-2 emitida pelos núcleos.

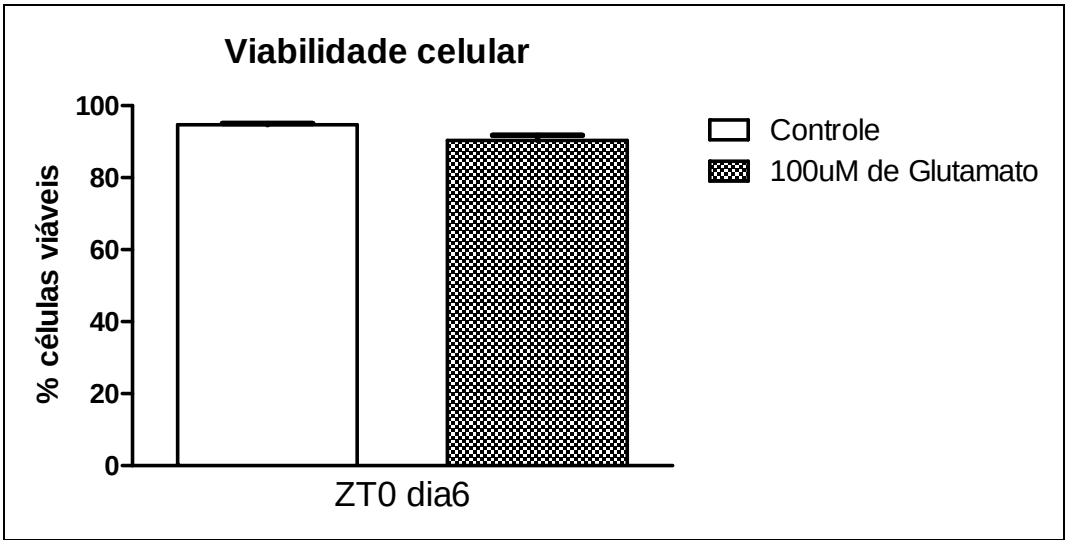


Figura 43. Células de retina de embriões de galinha na presença e na ausência de 100 μM de glutamato por 12 h. As células foram obtidas no ZT0 do sexto dia, 12 h após o término do tratamento. Os valores estão representados em porcentagem média do total (± EPM).

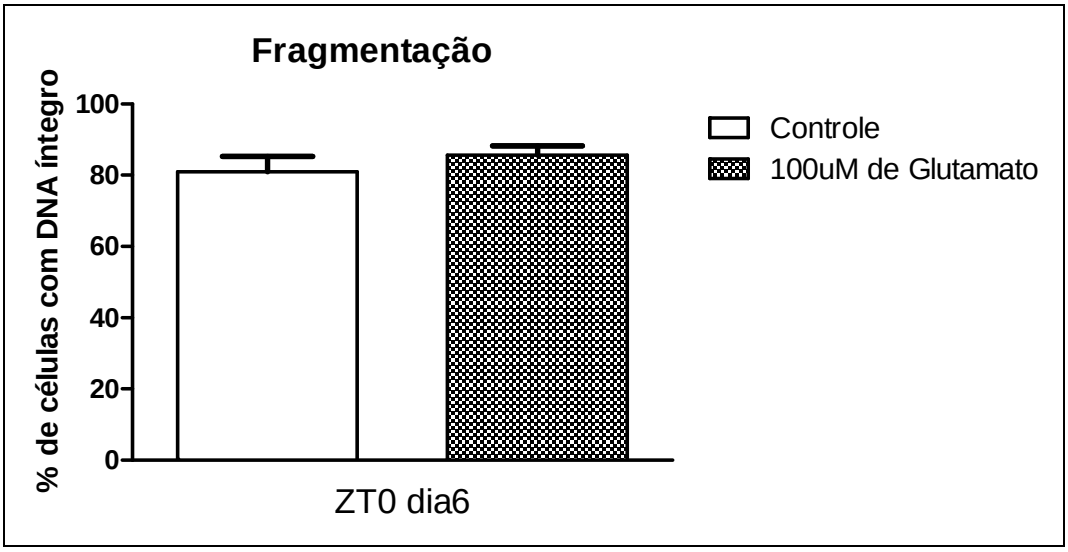


Figura 44. Células de retina de embriões de galinha na presença e na ausência de 100 μM de glutamato por 12 h. As células foram obtidas no ZT0 do sexto dia, 12 h após o término do tratamento. Os valores estão representados em porcentagem média do total (± EPM).

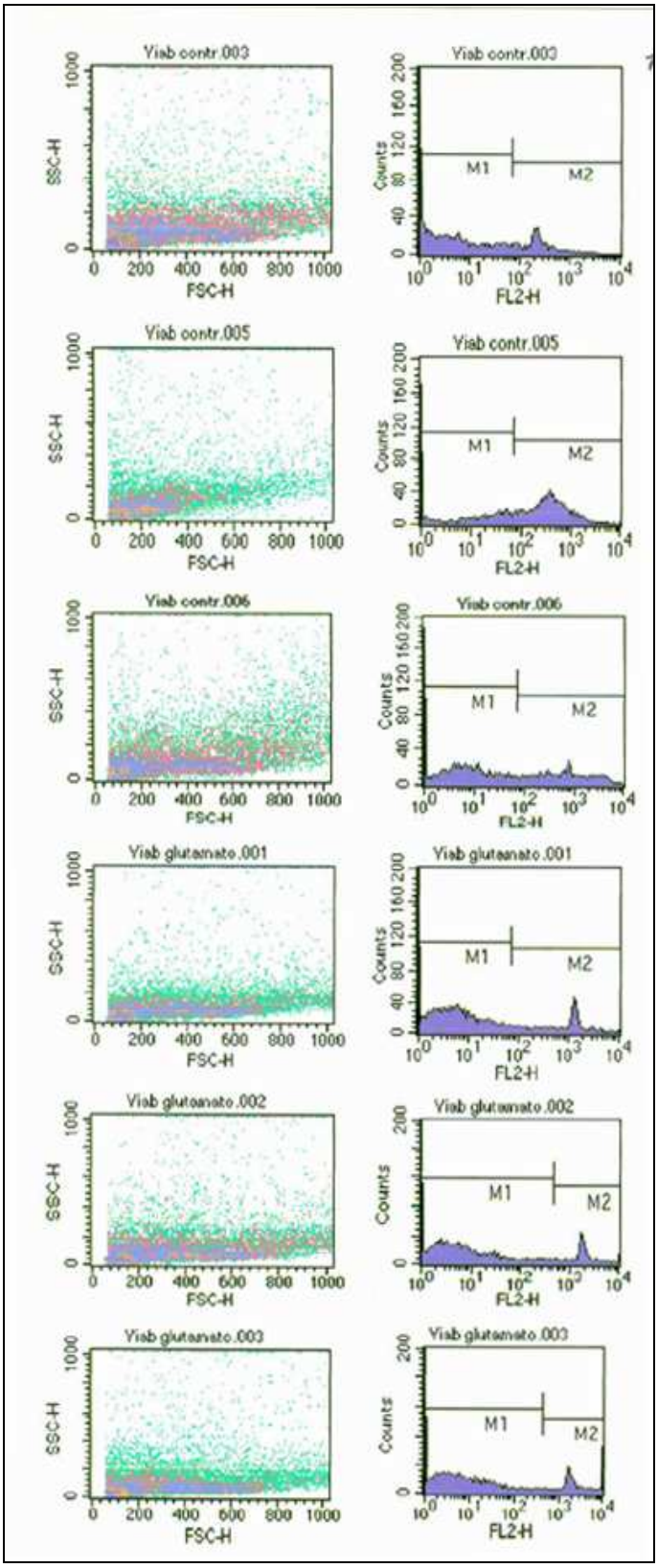


Figura 45. Análise por citometria de fluxo de células de retina de embriões de galinha na presença (Viab glutamato 001-003) e na ausência (Viab contr 003-006) de 100 µM de glutamato por 12 h. As células foram obtidas no ZT0 do sétimo dia, 36 h após o término do tratamento. Os pontos plotados nos gráficos da esquerda representam tamanho relativo (FSC) das células e granulosidade (SSC). Os histogramas à direita mostram a intensidade de fluorescência no canal FL-2 emitida pelas células. As células com a membrana íntegra encontram-se em M1.

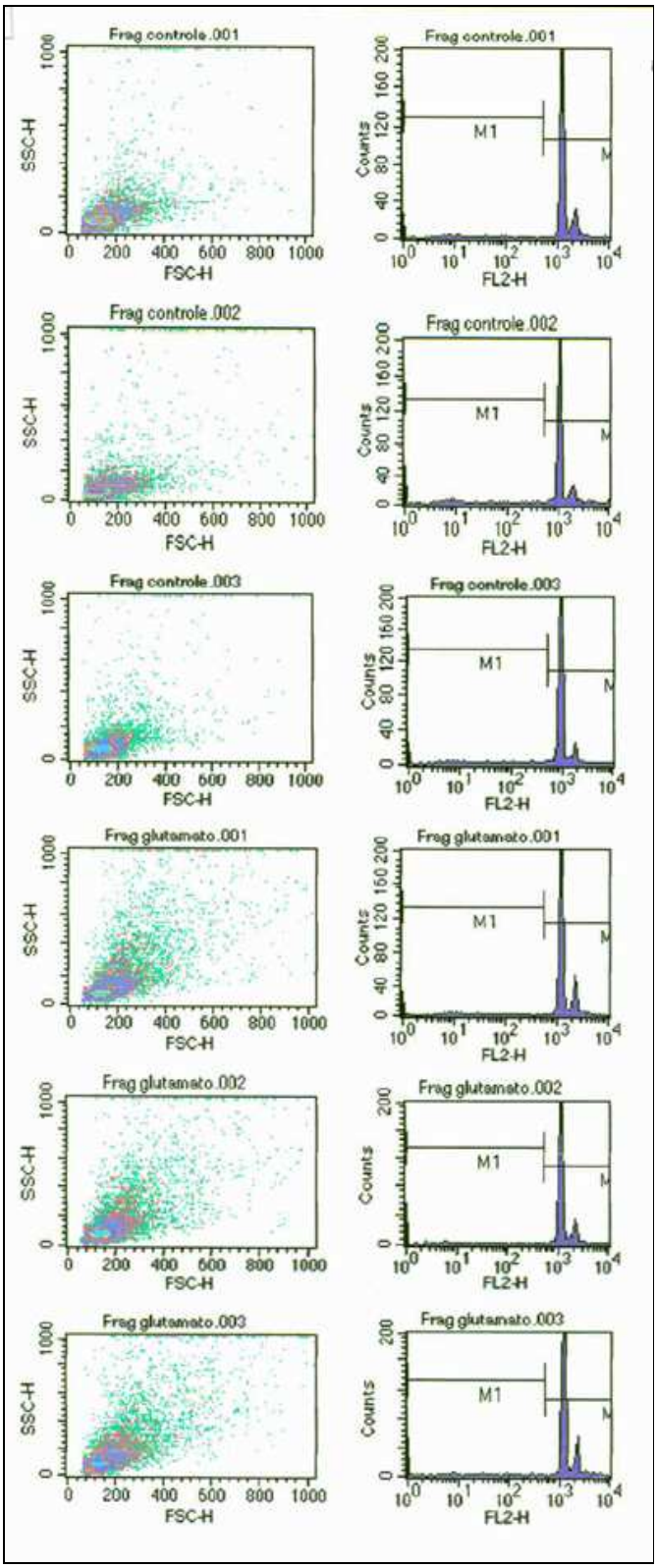


Figura 46. Análise por citometria de fluxo de núcleos de células de retina de embriões de galinha na presença (Frag controle 001-003) e na ausência (Frag glutamato 001-003) de 100 µM de glutamato por 12 h. As células foram obtidas no ZT0 do sétimo dia, 36 h após o término do tratamento. Os pontos plotados nos gráficos da esquerda representam tamanho relativo (FSC) das células e granulosidade (SSC). Os histogramas à direita mostram a intensidade de fluorescência no canal FL-2 emitida pelos núcleos.

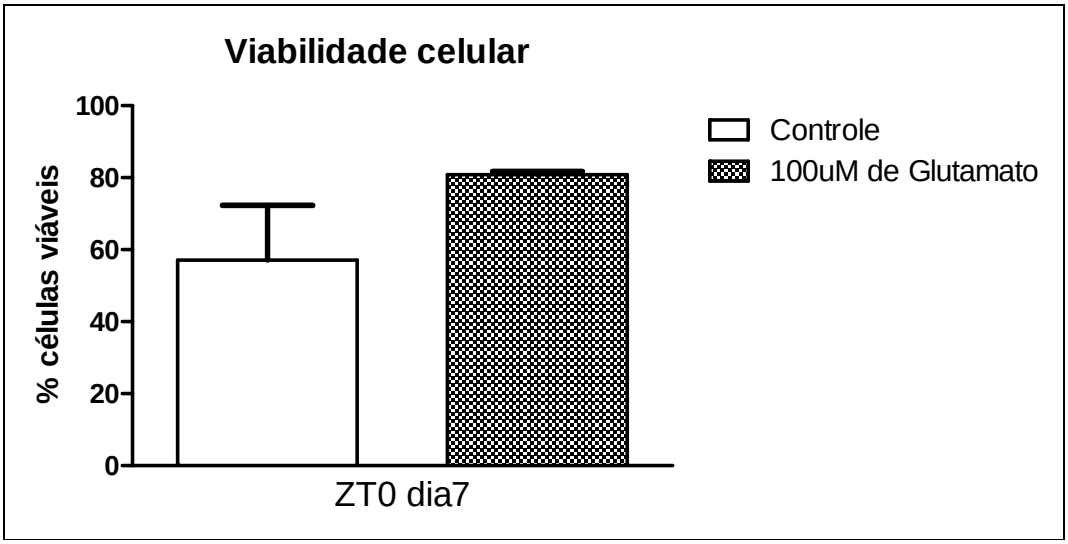


Figura 47. Células de retina de embriões de galinha na presença e na ausência de 100 μM de glutamato por 12 h. As células foram obtidas no ZT0 do sétimo dia, 36 h após o término do tratamento. Os valores estão representados em porcentagem média do total (± EPM).

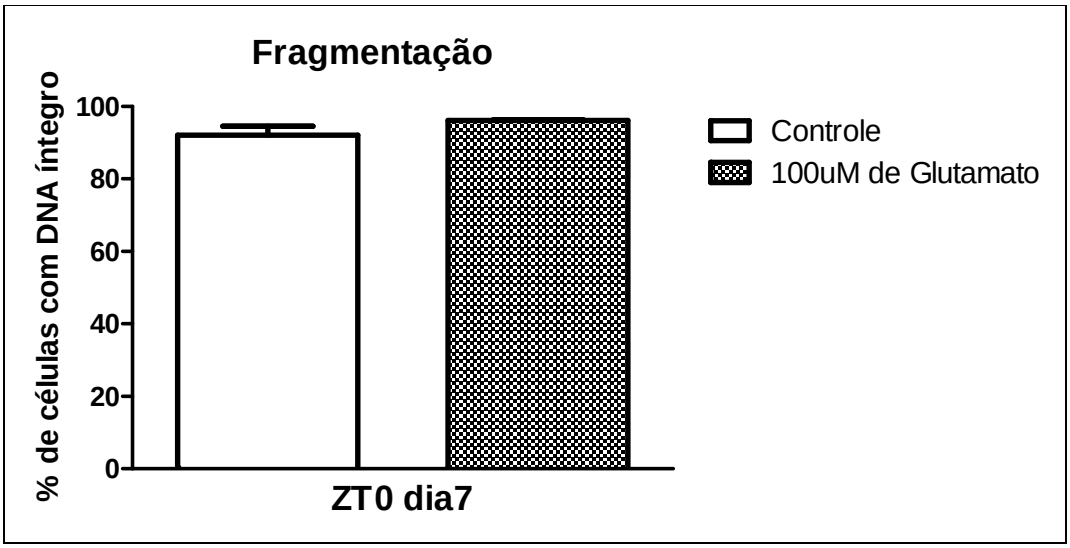


Figura 48. Células de retina de embriões de galinha na presença e na ausência de 100 μM de glutamato por 12 h. As células foram obtidas no ZT0 do sétimo dia, 36 h após o término do tratamento. Os valores estão representados em porcentagem média do total (± EPM).

DISCUSSÃO

Muitos processos rítmicos observados na retina de galinha fornecem evidências para tratar esta estrutura como um sistema circadiano. Dentre esses processos, foram escolhidos para serem analisados neste trabalho: a expressão de fotopigmentos responsáveis pela captação e conversão da informação ambiental em sinais neuroquímicos para ajuste do relógio, a expressão de genes de relógio capazes de governar a fisiologia das células retinianas, e também os ritmos de liberação de neurotransmissores e neuromoduladores capazes de uniformizar e sincronizar os ritmos individuais dos diferentes tipos celulares da retina. Juntos, esses processos compõem a engrenagem de um relógio biológico que faz com que a retina funcione autonomamente como um órgão capaz de se ajustar às diferentes condições ambientais que ocorrem durante as 24 horas do dia.

De acordo com a revisão feita por Green e Besharse, embora ainda não haja um entendimento da importância relativa dos diferentes tipos celulares da retina no controle circadiano deste tecido, os dados existentes possibilitam duas conclusões a respeito. Em primeiro lugar, as células fotorreceptoras possuem todas as propriedades de um relógio circadiano endógeno, e são responsáveis pela liberação de melatonina, a qual poderia governar os ritmos circadianos em outros aspectos da fisiologia da retina. Em segundo lugar, os genes de relógio são amplamente expressos na maioria, se não em todos os tipos celulares. Sendo assim, a ritmicidade circadiana poderia resultar da interação de múltiplos relógios circadianos que residem em diferentes tipos celulares (GREEN; BESHARSE, 2004).

Estudos realizados em culturas de retinas de *Xenopus leavis* submetidas a degradação da camada nuclear interna mostraram que as células fotorreceptoras são capazes de gerar e manter oscilações na produção de melatonina por vários dias *in vitro* (CAHILL; BESHARSE, 1993). Outros laboratórios relataram que culturas de células de retina de embriões de galinha enriquecidas em células fotorreceptoras são capazes de manter oscilações sustentadas na expressão do RNAm de iodopsina (PIERCE *et al*., 1993), e na

atividade da enzima chave da produção de melatonina (IUVONE *et al*., 1997; HAQUE *et al*., 2003; IVANOVA; IUVONE, 2003a, b),

Já a hipótese de que a ritmicidade circadiana se deve a osciladores múltiplos surgiu de estudos que mostraram existir um antagonismo mútuo dos sistemas dopaminérgico e melatoninérgico. A dopamina produzida e liberada pelas células amácrinas e interplexiformes retinianas (DOWLING; EHINGER, 1978) inibe a síntese e liberação de melatonina pelas células fotorreceptoras ativando seus receptores do tipo D_2 (IUVONE; BESHARSE, 1986; CAHILL; BESHARSE, 1991). Em contrapartida, a melatonina produzida nos fotorreceptores inibe a liberação de dopamina (DUBOCOVICH, 1983). Em 1994, Stenkamp e colaboradores mostraram que dopamina e melatonina são capazes de mimetizar o efeito da luz sobre o comprimento de cones e bastonetes em cultura de retina de embriões de galinha enriquecida em células fotorreceptoras. Ainda no mesmo trabalho, os autores relataram que não somente melatonina e dopamina exógenas exercem efeito nestas células, mas que também existe uma fonte endógena de produção de dopamina nessas culturas, que foi atribuída a células imunopositivas para tirosina hidroxilase (STENKAMP *et al*., 1994).

Em 2006, nosso grupo publicou um trabalho mostrando a expressão de melanopsina em células pigmentares e retina de *Gallus gallus.* Demonstrou por ensaio imunocitoquímico a intensa expressão da melanopsina nas células da camada nuclear interna, e em uma pequena população de células ganglionares na retina de *Gallus gallus,* além de mostrar diferenças de expressão em diferentes fases do dia (LIMA *et al*., 2006). Segundo Adler e Hatle (1989), células isoladas da retina de embriões de 6 dias originam culturas predominantemente formadas por células fotorreceptoras, enquanto que células isoladas da retina de embriões de 8 dias originam culturas predominantemente formadas por neurônios multipolares. Em vista de nossos resultados e desse dado da literatura, optamos por utilizar a cultura de retina de embriões de *G. gallus* de oito dias. Além disso, apesar da falta da organização célula-célula das culturas de explantes, a cultura de células dispersas seria, segundo Seigel (1999) mais útil (*more useful*) para análises quantitativas, onde o acesso a células individuais é importante, ou o contato intercelular deve ser limitado. Neste mesmo texto, o autor afirma que a cultura de células dispersas

permite a destruição seletiva dos fotorreceptores por meio de um tratamento com anticorpos anti-opsina (POLITI; ADLER, 1986), o que exclui os fotorreceptores da população final de células. Essa cultura permitiria a análise da função das melanopsinas na fotorrecepção não visual de *G. gallus.*

Cultura

Em 2003, Haque e colaboradores mostraram que células cultivadas por seis dias em fotoperíodo (claro-escuro), em meio com 10 % de soro fetal bovino, não apresentam variação da atividade da enzima N-acetiltransferase. No mesmo trabalho, os autores mostraram que a substituição do meio contendo 10 % de soro fetal bovino, por um meio contendo 1 % de soro, acrescido de 5 µM de NBTI no quarto dia de cultivo imprimia um padrão oscilatório à atividade da enzima N-acetiltransferase ao longo do dia. Sob essas condições otimizadas, foi constatada uma maior sobrevivência das células em geral, e um aumento na proporção de células fotorreceptoras presentes na cultura (HAQUE *et al*., 2003).

No sexto dia de cultivo, dia em que realizamos a extração de RNAm total, as células utilizadas em nossos experimentos encontravam-se bem aderidas ao substrato tratado com poli-D-lisina. Além dos corpos celulares foi possível observar projeções sinápticas entre as células e células com características morfológicas de células fotorreceptoras, indicando estágio pós-mitótico com um grau de diferenciação avançado.

Clock e *Per2*

Na retina de *Xenopus leavis*, o gene *Clock* (ZHU *et al*., 2000) e três homólogos de *Cry* (ZHU; GREEN, 2001) são expressos predominantemente nas células fotorreceptoras. Essa localização de *Cry1* (HAQUE *et al*., 2002) e *Cry2* (BAILEY *et al.,* 2002) também foi relatada em *Gallus gallus.* Em adição, tanto *Cry1,* como Cry2 também são expressos nas células ganglionares da retina de *Gallus gallus.*

Em 1999, o mesmo estudo que analisou a expressão de iodopsina em

galinhas normais e galinhas *rd/rd*, também analisou a expressão do gene *Clock in vivo*. Os resultados obtidos mostraram que quando esses animais são mantidos em 12C:12E por cinco dias logo após a eclosão, existe um ritmo de expressão desse gene que apresenta valores baixos na fase clara, começa a aumentar no fim dessa fase, e atinge seu pico na fase escura. Esse ritmo foi confirmado quando os animais foram mantidos em 12C:12E por três dias logo após a eclosão, em seguida transferidos para escuro constante, demostrando que se trata de um ritmo endógeno (LARKIN *et al*., 1999).

Em 2000, Chong e colaboradores mostraram que a expressão da enzima chave na síntese de melatonina, a NAT, de *Gallus domesticus* pode ser controlada por um mecanismo molecular circadiano que envolve tanto dímeros de cCLOCK/BMAL1, como dímeros de cBMAL1 com um outro fator de transcrição bHLH-PAS, o cMOP4, que origina o dímero cMOP4/cBMAL1 (CHONG *et al*., 2000). Em outro trabalho, os mesmos autores analisaram por PCR quantitativo a expressão de cBMAL1 e cMOP4 na retina de *Gallus domesticus* recém-eclodidos, que foram transferidos para condições cíclicas 12C:12E e então mantidos em condições de escuro constante ou claro constante por 2 dias. Neste experimento, a extração de RNA foi realizada de 4 em 4 horas durante 24 horas no segundo dia de condições constantes. Os autores verificaram que, tanto cBMAL1, quanto cMOP4, apresentam ritmos de expressão robustos na retina de *Gallus domesticus,* que os níveis mais elevados dos dois transcritos foram encontrados no ZT12, e que esse padrão é mantido mesmo após 48 h de claro constante ou escuro constante (CHONG *et al*., 2003).

Recentemente, Chaurasia e colaboradores (2006) analisaram, em culturas de retinas de galinha enriquecidas em fotorreceptores, por PCR em tempo real, a expressão dos genes de relógio responsáveis pela maquinaria do relógio circadiano da retina utilizando o gene da enzima *Hipoxantina fosforibosil transferase (Hprt)* como normalizador. Os autores observaram que culturas mantidas em regime de fotoperíodo 14C:10E desde o início da incubação, quando analisadas no oitavo dia *in vitro,* apresentaram ritmos dos RNAm dos genes: *Clock* com pico de expressão no início da fase escura (ZT16); *Mop4* e *Bmal1* com picos de expressão entre os ZTs 10 e 12 que correspondem ao final da fase clara; *Cry1* com pico de expressão diurno ZTs 4 a 12; *Per2*

também com um pico de expressão diurno no ZT6. Quando as culturas passaram para o regime de escuro constante no nono dia *in vitro*, e as determinações continuaram sendo realizadas a cada quatro horas, foi visto que a expressão de *Clock* se tornou arrítmica, porém a amplitude da expressão (em relação ao ZT de menor expressão do regime de fotoperíodo do oitavo dia *in vitro*) apresentou um aumento. Nos demais genes estudados, as variações rítmicas de expressão continuaram a ocorrer (porém com uma amplitude menor do que as observadas em 14C:10E). Os autores ainda mostraram que um pulso luminoso de 2 horas aplicado no ZT18 do nono dia *in vitro* (DD) foi capaz de aumentar a expressão de *Cry1* e *Per2* (CHAURASIA *et al.,* 2006).

Em nossos resultados em escuro constante, os níveis de RNAm de *Clock* apresentaram variação significativa entre o menor valor ZT12 e o maior valor ZT21, porém esta variação foi muito pequena, e não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano. Este resultado está de acordo com o trabalho de culturas enriquecidas em fotorreceptores que se tornaram arrítmicas em escuro constante. Esse resultado foi confirmado pela ausência de variação também do conteúdo protéico.

Com as células mantidas em regime de 12C:12E, nossos resultados assemelham-se a resultados da literatura (LARKIN *et al*., 1999; CHAURASIA *et al*., 2006), pois vimos que a expressão de *Clock* nestas condições apresenta uma variação circadiana, e que os níveis mais elevados do RNAm são produzidos na fase escura. Porém, essa variação na quantidade de RNAm, não foi acompanhada pela expressão da proteína.

Embora seja notável um pico de expressão de *Clock* na fase clara subjetiva de nossos resultados em 3 dias C:E, 3 dias EE, o padrão de expressão circadiano não foi mantido, o que está de acordo com os dados de Chaurasia e colaboradores (2006).

A expressão do RNAm de *Per2* em escuro constante apresentou dois picos de expressão nos ZTs 15 e 21, mas também não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano para esse gene.

Embora a análise rítmica não tenha identificado um padrão de expressão do RNAm de *Per2* nas células mantidas em 12C:12E, foi possível notar uma tendência a ritmicidade pelo aumento gradual na expressão deste gene no ZT9 que atinge o valor máximo no ZT15, e começa a cair gradualmente nos ZTs

seguintes.

Como citado previamente, Chaurasia e colaboradores (2006) mostraram que sob ciclo claro-escuro, a expressão de *Per2* apresenta ritmo circadiano, o qual é enfraquecido quando as células em seguida são transferidas para escuro constante. De fato, nossos resultados mostram que a tendência à ritmicidade desaparece nessas condições.

Opn4x e *Opn4m*

A manutenção da função e da estrutura do segmento externo dos fotorreceptores depende da produção, na base dessas células, de novas membranas contendo fotopigmentos, e do deslocamento desses discos membranosos em direção ao epitélio retiniano pigmentar, onde os cromóforos são regenerados. Dados de diferentes espécies mostram que a luz e o sistema circadiano das células da retina interagem para regular esses eventos. Além disso, cones e bastonetes renovam seus segmentos externos em horários diferentes do dia. Nos bastonetes, a concentração de RNA mensageiro de rodopsina aumenta antes do início da fase clara, logo antes do horário em que o segmento externo de bastonetes é renovado (KORENBROT; FERNALD, 1989).

Em galinhas, o pico da renovação do segmento externo de cones ocorre logo após o fim da fase clara (YOUNG, 1978). Em 1993, Pierce e colaboradores avaliaram por *Northern Blot* a expressão do fotopigmento predominante de cones na retina de galinha, a iodopsina, *in vivo* e *in vitro*. Nos estudos *in vivo*, os animais foram mantidos em 12C:12E por três semanas, e em seguida foram analisados a cada seis horas por dois dias em regime de 12C:12E, e outros dois dias em escuro constante. Nessas condições, foi encontrado um ritmo de expressão de iodopsina, sendo detectados o aumento da expressão 6 a 7 horas após o início da fase clara, e o pico de expressão 2 horas após o início desse aumento no ZT9. Esse ritmo foi mantido por dois dias em escuro constante, porém no segundo dia em escuro o pico de expressão de iodopsina foi um pouco menor. Nos estudos *in vitro,* culturas de retinas de embriões de seis dias de galinha, enriquecidas em fotorreceptores, foram

mantidas em 12C:12E e analisadas a partir do quinto dia de cultivo de seis em seis horas por 48 horas. Nessas condições também foi encontrado um ritmo de expressão de iodopsina com aumento de expressão no fim da fase clara, e o pico na fase escura. Quando a expressão de culturas mantidas em 12C:12E até o quarto dia, e depois mantidas em escuro constante no quinto e no sexto dia a cada seis horas foi analisada, foi observado um ritmo semelhante ao visto em 12C:12E. Houve um aumento de 2 a 3 vezes no final da fase clara subjetiva, que se manteve no segundo dia em escuro com uma amplitude menor em todos os pontos analisados (PIERCE *et al*.,.1993).

Esses resultados foram confirmados por Larkin e colaboradores (1999) em retina de galinhas normais *in vivo*. Porém, quando a expressão da iodopsina foi investigada em galinhas que sofrem degeneração de células fotorreceptoras *rd/rd*, não foram encontradas variações ao longo do dia. Esse estudo também revelou que ocorre variação na quantidade de RNA mensageiro do gene G3PDH na retina de galinhas normais, e que isso não ocorre com o RNA 18S (LARKIN *et al.,* 1999), confirmando que o RNA18S é um bom normalizador para nossa pesquisa.

Em 2005, um grupo de pesquisadores analisou *in vivo* a expressão de melanopsina (*Opn4x*) em retina de galinha White Leghorn *Gallus domesticus* pela técnica de hibridização *in situ,* e também por PCR em tempo real. A análise foi feita em animais pós-eclodidos mantidos em ciclos de 12C:12E por duas semanas, e transferidos para condições de escuro constante por dois dias, quando foram realizadas as extrações de RNA da retina inteira. Os autores relataram que a expressão de melanopsina na retina de *Gallus gallus* é rítmica com os níveis mais elevados de RNAm no início do dia subjetivo nos ZTs 0-4. A seguir, os níveis de RNAm declinaram para valores mínimos no ZT16. O mesmo padrão foi observado quando a extração foi realizada ainda no primeiro e no segundo dia em escuro constante após as duas primeiras semanas em 12C:12E (CHAURASIA *et al.*, 2005).

No mesmo ano, outro grupo de pesquisadores mostrou que a expressão de *Opn4x* na retina de embriões de galinha tem início no sétimo dia embrionário (TOMONARI *et al*., 2005). Ainda naquele ano, Bailey e Cassone (2005) analisaram a expressão do RNA mensageiro (*Northern Blot*) de *Opn4x* normalizado pelo RNAr 18S em galinhas. Essas foram mantidas em

fotoperíodo 12C:12E por três semanas, e a seguir analisadas a cada 4 horas por dois dias, um em regime de 12C:12E, e outro em escuro constante. Esse trabalho mostrou que a expressão de *Opn4x* aumenta em 12C:12E na fase escura, e que ocorre um singelo aumento de expressão desse gene no início da noite subjetiva de animais analisados em escuro constante.

Nossos resultados mostraram que a cultura de células dispersas não apresentou variação circadiana de RNAm de *Opn4x* ou no conteúdo protéico em escuro constante.

Porém quando estas foram expostas a regime de fotoperíodo 12C:12E, ocorreu uma variação de expressão de *Opn4x*, com os valores mais elevados nos ZTs 0 e 15, o que difere dos dados de Chaurasia e colegas (2005), mas confirma os resultados de Bailey e Cassone (2005) em animais pós-eclodidos e *in vivo.* Não houve diferença estatística na quantidade da proteína OPN4X nessas condições, porém, deve ser ressaltado que o *n* amostral foi pequeno (n=3), e que uma tendência de aumento da concentração dessa proteína pode ser visualizada nos ZTs finais.

Nas culturas mantidas por 3 dias C:E, 3 dias EE, *Opn4x* mostrou um pico de expressão no ZT3, e ausência de padrão circadiano.

Desde a descoberta da *Opn4m* (BELLINGHAM *et al.,* 2006), a expressão desta proteína fotossensível apenas foi estudada com o intuito de localizá-la em cortes transversais de retinas de animais adultos e em células transfectadas. Recentemente foi relatado que a expressão de *Opn4m* na retina de galinhas tem início no décimo dia embrionário por uma pequena população de células da camada nuclear interna (TOMONARI *et al*., 2007). Os mesmos autores mostraram ainda que, assim como para a melanopsina ortóloga de *Xenopus leavis,* que apresenta duas isoformas de transcritos em galinhas (TOMONARI *et al*., 2005; LIMA *et al*., 2006), são encontrados dois transcritos diferentes para a melanopsina ortóloga de mamíferos, que o autor nomeou de *Opn4m-a* e *Opn4m-b* (TOMONARI *et al*., 2007). Nossos resultados são pioneiros em relatar a expressão temporal desta opsina ao longo de 24 horas em células retinianas de um vertebrado não mamífero.

Diferente do que ocorre para *Opn4x,* a expressão de *Opn4m* apresentou uma ampla variação ao longo dos ZTs analisados em escuro constante. Porém, essa variação não foi circadiana.

Quando as culturas foram expostas a regime de fotoperíodo 12C:12E, observamos uma variação circadiana na expressão de *Opn4m,* com os menores valores sendo encontrados durante a fase de claro, e os maiores durante a fase de escuro. Como a função da nova melanopsina *Opn4m* ainda não foi esclarecida, e como a via de transdução de sinal, seja da melanopsina *Opn4x* seja da *Opn4m* em células da retina são pouco conhecidas, nossos resultados podem vir a contribuir para esse esclarecimento. Esse ritmo robusto observado para *Opn4m* pode significar que essa opsina estaria mais comprometida com a percepção circadiana dos estímulos ambientais do que *Opn4x.*

Nossos resultados de 3 dias C:E, 3 dias EE não mostraram variação entre os ZTs. A quantificação protéica não foi realizada para essa condição.

N-acetiltransferase

Dentre os neuromoduladores responsáveis pelo *output* do relógio circadiano, a melatonina é a substância mais conhecida. A atividade enzimática de N-acetiltransferase (determinada pela formação catalítica de N-acetiltriptamina a partir de triptamina e acetilcoenzima A), enzima chave da síntese de melatonina, em homogeneizados de culturas de retina de embriões de galinha, com seis e oito dias de incubação, já havia sido analisada em animais mantidos em 14C:10E a partir do primeiro dia de incubação. Neste estudo, a coleta das amostras das culturas de retina foi realizada no quinto, sexto e sétimo dias sob as mesmas condições fóticas de incubação, ou então em escuro constante a partir do sexto dia *in vitro.* As culturas de embriões de 6 dias de incubação, mantidas por 5 dias em 14C:10E, seguido de dois dias de escuro constante, apresentaram, no quinto dia *in vitro,* um perfil rítmico da atividade enzimática de NAT com os níveis mais altos no ZT20 e mais baixos no ZT10. Porém quando analisadas no sétimo dia *in vitro*, após 48 h de escuro constante, o ritmo de expressão de NAT desapareceu. Nas culturas de retina de embriões com 8 dias de incubação, as quais apresentavam uma porcentagem menor de células que expressam um fenótipo de células fotorreceptoras em relação ao número total de células, a atividade da enzima

NAT mostrou um padrão cíclico, tanto no quinto dia *in vitro* sob condições de 14C:10E, quanto no sexto dia sob condições de escuro constante. Os valores máximos de atividade enzimática foram encontrados em ZT20, e os mínimos em ZT10 (IVANOVA; IUVONE, 2003).

Em 2004, Garbarino-Pico e colaboradores mostraram que a melatonina e sua enzima chave, a NAT, também são sintetizadas nas células ganglionares da retina de galinhas. Neste estudo, os pesquisadores avaliaram a produção de melatonina em pintinhos que foram mantidos até o oitavo dia em fotoperíodo 12C:12E e em seguida passaram para um regime de escuro constante até o décimo dia. As amostras foram coletadas durante 24 horas a partir do oitavo dia quando as retinas foram liofilizadas. Este experimento mostrou que tanto o período de maior síntese de melatonina, quanto o período de maior expressão de NAT ocorrem em anti-fase e com uma amplitude menor em relação à síntese de melatonina e expressão de NAT nos fotorreceptores. Neste mesmo trabalho os autores mostraram por hibridização *in situ* a presença de NAT em cortes transversais de retina inteira obtidos durante o dia subjetivo. Para avaliar melhor a produção de melatonina e de sua enzima chave nas células ganglionares, os autores decidiram analisar culturas enriquecidas em células ganglionares de embriões de 8 dias sincronizadas com uma troca de meio no dia seguinte ao dia de obtenção da cultura e mantidas em escuro constante durante 24 horas. Como resultado desta estratégia experimental, os níveis mais elevados de melatonina, tanto nas células, como no meio de cultivo, ocorreram no ZT8 e, embora não tenha havido uma adaptação prévia a nenhum tipo de condição luminosa, os autores chamaram este ZT8 de fase clara. Nessas condições, a expressão de NAT quando analisada durante três dias consecutivos mostrou picos de expressão nos ZTs 7, 32 e 56 com um intervalo de aproximadamente 24 horas (GARBARINO-PICO *et al.*, 2004).

Em 2006, Contin e colaboradores confirmaram que culturas de células ganglionares de retina de galinha mantidas por 4 dias em 12C:12E, e avaliadas no quinto dia em escuro constante apresentam maior produção de melatonina durante a fase clara. Além disso, os autores demonstraram que a luz diminui a produção de melatonina nessas células que expressam melanopsina (CONTIN *et al.*, 2006).

Nossos resultados com culturas de retina de embriões de galinha em

escuro constante mostraram diferença significativa de expressão de NAT entre os ZTs 0 e os ZTs onde a expressão foi mínima ou próxima do mínimo, fase que corresponde à transição da noite para o dia subjetivo. Estes dados diferem do resultado de atividade enzimática encontrado em animais condicionados a ciclos 14C:10E (IVANOVA; IUVONE, 2003), mas assemelha-se aos resultados das análises feitas em culturas de células ganglionares embrionárias de galinha (CONTIN *et al.*, 2006).

Esse padrão de expressão foi ligeiramente alterado quando as células foram submetidas a fotoperíodo 12C:12E pois, nessa condição, o maior valor de expressão foi mantido no ZT0 quando a luz acende, e começou a cair nos ZTs seguintes indicando inibição da transcrição, seguido de aumento desta taxa na fase escura. Não foi encontrado um padrão rítmico de expressão do RNAm de *NAT* por meio da análise rítmica, entretanto, os menores valores deste transcrito foram encontrados na fase de transição do claro para o escuro, e os maiores valores durante a transição do escuro para o claro.

Embora um padrão de expressão circadiano seja visível em 3 dias C:E, 3 dias EE, a análise estatística não confirma variação entre os ZTs.

A análise da quantidade da proteína N-ACETILTRANSFERASE foi realizada, mas a banda correspondente ao peso molecular desta proteína não foi identificada em nenhum dos protocolos experimentais, embora estivesse presente no controle de retina de pintinho recém-eclodido (resultados não mostrados).

Tirosina Hidroxilase

Outro candidato a neuromodulador circadiano na retina é a dopamina. A síntese de dopamina na retina de *Gallus domesticus* recém-eclodidos, e mantidos por duas semanas em 12C:12E, seguidas de dois dias de claro ou escuro constantes, já havia sido analisada através da dosagem por HPLC de dopamina e de dois de seus metabólitos, o 3,4-ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA). Em condições de 12C:12E, os níveis de dopamina, assim como os níveis de DOPAC e HVA, mostraram-se cíclicos, com os valores mais altos encontrados no ZT12. Ao final das duas primeiras

semanas, e após os dois dias em escuro constante, o conteúdo de dopamina, DOPAC e HVA também se mostrou cíclico, com valores mais altos durante o dia subjetivo. Já em condições de claro constante houve uma progressiva redução dos valores de dopamina, DOPAC e HVA e não foi encontrada uma variação cíclica dessas substâncias (ZAWILSKA *et al*., 2003a, b).

A expressão protéica de TIROSINA HIDROXILASE em culturas de retina de embriões de oito dias de galinha foi confirmada por Stenkamp e colaboradores (1994) por *Western Blot*. Neste trabalho, os autores não encontraram diferenças na quantidade de proteína extraída no claro e no escuro. Esse trabalho revelou ainda que a administração de dopamina às culturas foi capaz de controlar as alterações morfológicas de fotorreceptores, mimetizando o efeito da luz.

Porém, o trabalho do grupo do professor Fernando de Mello em 2001, também em culturas de células dispersas de embriões de galinhas de oito dias, descreve a ausência de células imunopositivas para tirosina hidroxilase nessas culturas, e relata que a expressão desta somente é encontrada quando as culturas são tratadas com forscolina. Ainda neste trabalho, o autor mostra que culturas de células dispersas da retina de embriões de 10 dias já apresentam células imunopositivas para a tirosina hidroxilase (GUIMARÃES *et al.*, 2001).

Nossos resultados indicam que, em regime de escuro constante, não ocorrem variações nos níveis do RNAm de *TH.* Já com as células mantidas em 12C:12E, observamos um padrão rítmico, onde os valores começam altos no ZT0, caem gradualmente até o ZT12 e aumentam em seguida na fase escura. Como nosso alvo pesquisado foi a enzima chave da via de síntese de dopamina, o fato de nossos resultados mostrarem um aumento dessa enzima em fase oposta aos ritmos de dopamina vistos por Zawilska e colaboradores (2003a, b), com maiores valores no ZT12 pode corresponder a uma antecipação da ativação da via de síntese de dopamina. Esta hipótese não foi confirmada pela quantificação protéica da enzima, mas deve-se ressaltar novamente que o *n* amostral foi pequeno (n=3) e que houve extrema variabilidade inter-ensaios.

Tratamento com glutamato

O relógio do NSQ responde de maneira diferenciada aos sinais ambientais responsáveis pelo ajuste da hora circadiana. Durante a fase do relógio que coincide com a noite ambiental, o NSQ apresenta sensibilidade a estímulos ambientais que são capazes de reiniciá-lo. Estes estímulos incluem a luz, e seu neurotransmissor, o glutamato (GILLETE ; MITCHELL, 2002). O sinal luz/glutamato induz a transcrição de genes no NSQ, que também é governada pelo mecanismo molecular do relógio. As respostas a esse estímulo que foram caracterizadas incluem o aumento da transcrição de genes de resposta imediata como *c-fos* (REA, 1989; REA *et al*., 1993a, b, c; CASTEL *et al*., 1997), o complexo ativador de proteína-1 (AP-1) (FRANÇOIS-BELLAN *et al*., 1999; 2000) e das seqüências promotoras do elemento responsivo a aumento de Ca^{2+}/AMPc (CRE) (KORNHOUSER *et al*., 1992; GINTY *et al*., 1993; DING *et al*., 1997; OBRIETAN *et al.*, 1999).

A ativação dos sítios CRE requer a fosforilação da serina-133, e possivelmente da serina-142, da proteína ligadora de CRE (CREB/P-CREB), um evento induzido por luz/glutamato durante a noite. Nem a luz, nem o glutamato induzem P-CREB, ou ativam a transcrição de CRE durante o dia subjetivo do relógio do NSQ (GINTY *et al*., 1993; DING *et al*., 1997; OBRIETAN *et al.*, 1999). Durante a noite, a indução da transcrição de CRE que é dependente do sinal luminoso ocorre simultaneamente à indução de P-CREB (OBRIETAN *et al*., 1999).

A indução de P-CREB no início e no final da noite por luz /glutamato parece ser dependente dos mesmos elementos de transdução de sinal iniciais envolvidos no re-início (*reset*) do relógio: ativação de receptores glutamatérgicos NMDA, influxo de Ca^{2+} e ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (DING *et al.,* 1998). Contudo, no início da noite, a via de transdução do sinal luz/glutamato requer a ativação de receptores de rianodina responsáveis por liberar Ca^{2+} de estoques intracelulares (DING *et al.,* 1998). Em contraste, no final da noite, o avanço de fase induzido por luz/glutamato requer a ativação da enzima guanilato ciclase (GC) mediada por óxido nítrico (NO), e subsequente estimulação da proteína quinase G (PKG) (HURST *et al*.,

2002).

Em 2002, Hurst e colaboradores mostraram que culturas de células imortalizadas de NSQ (SCN 2.2), sincronizadas por choque de soro, também apresentam dependência de fase na indução de P-CREB, e da atividade dos promotores da proteína vaso intestinal VIP, CRE e de elementos E-box, quando estimuladas com 10 µM de glutamato por 10 min a cada 4 h por um dia.

Nossos resultados mostram que o tratamento das culturas com 100 µM de glutamato, por 12 h em escuro constante, alterou o padrão de expressão visto para o grupo controle nas mesmas condições. De uma forma geral, esse tratamento induziu um aumento de expressão dos genes estudados nos ZTs iniciais da análise, que foi seguido por redução gradual até atingir os menores valores no fim dos ZTs analisados. A análise rítmica do grupo controle confirmou a ausência de oscilação na quantidade de RNA mensageiro de *Opn4x*, *Opn4m, Clock*, *N-acetiltransferase* e *Tirosina Hidroxilase*. A análise rítmica apontou que o grupo tratado passou a oscilar na produção de *Clock*, mas com acrofase e amplitudes menores que as observadas em 12C:12E. Essa inversão de fase indica que o tratamento com o glutamato pode ser um agente sincronizador dessas células. Esses resultados diferem dos dados de Garbarino-Pico e colaboradores (2004), que relatam que o tratamento com 100 µM de glutamato por três dias gerou um ritmo de expressão do RNA mensageiro de *N-acetiltransferase* em culturas de células ganglionares de embriões de galinha.

Viabilidade celular e Fragmentação de DNA

Ferreira e colaboradores mostraram, em 1998, que culturas de células de retina de embriões de galinha de oito dias mantidas com 5 % de soro fetal bovino no meio de cultivo por cinco dias, quando transferidas para meio sem soro, e submetidas a tratamento com 100 µM de glutamato, apresentam indícios de que esse tratamento é tóxico. Porém, a substituição do meio de cultivo após o tratamento com meio condicionado (meio de culturas irmãs com 5 % de soro fetal bovino), ou por meio novo com soro, reduzia o efeito tóxico

refletido na alteração do metabolismo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-fdifenil tetrazolium bromida (MTT). Esse resultado indicava que, ou a presença de soro, ou algum fator liberado pelas células, seria responsável pela proteção do efeito tóxico do glutamato (FERREIRA *et al*., 1998). Mais tarde, o grupo de Paes-de-Carvalho demonstrou que a ativação dos receptores de adenosina é capaz de inibir o efeito tóxico do glutamato das células de retina de embrião de galinha em cultura (FERREIRA; PAES-DE-CARVALHO, 2001; PAES-DE-CARVALHO *et al*., 2003).

Semelhantemente ao descrito por Garbarino-Pico e colaboradores (2004), nossos resultados de citometria de fluxo indicam que o tratamento com 100 µM de glutamato não exerceu efeito tóxico nas células, nem provocou morte por apoptose. Esses resultados confirmam as observações do Prof. Paes-de-Carvalho, pois em nossas culturas os receptores de adenosina estão constantemente estimulados devida a presença do inibidor do transportador deste neurotransmissor no meio de cultivo.

Regulação da transcrição e tradução

O conceito de que as oscilações diárias na concentração de RNAm ou proteína são uma característica central de relógios circadianos é amplamente aceito. Oscilações de RNAm são geralmente tidas como sendo geradas por um mecanismo de controle transcricional. Entretanto, uma síntese rítmica necessitaria de um RNAm com um tempo de meia vida curto, e/ou então o RNAm poderia ser regulado pós-transcricionalmente (ex. pela regulação de um fator de *splicing*). Dessa forma, a expressão de RNA de forma estável (constitutiva), durante o ciclo circadiano poderia diminuir, ou abolir a amplitude da oscilação. Várias modificações pós-transcricionais são utilizadas pelos componentes moleculares do relógio circadiano para tornar o RNA instável, e/ou atrasar sua tradução em proteínas, contribuindo assim para as fases e amplitudes da oscilação.

Mesmo assim, a regulação transcricional parece ser o mecanismo primário em gerar transcritos oscilantes. Atualmente, nada é conhecido sobre a contribuição do *capping* para a regulação circadiana. A regulação do

mecanismo de *splicing* parece ter um efeito na função do relógio. Apenas uma mutação afetando a proteína de *splicing* tull/dprp43 foi descrita até o momento em *Drosophila* (MARTINEK *et al.*, 2001). Esse gene codifica uma RNA helicase da família DEAHbox, que é amplamente conservado, e parece ser um componente geral do complexo de *splicing*. Uma mutação dominante negativa nesse gene aumenta o período de atividade locomotora das moscas em duas horas. Como grandes quantidades da forma *unspliced* de *Period* (*Per*) e *Timeless* (*Tim*) são encontradas na forma dominante negativa mutante, o aumento no período pode ser explicado por uma mudança na eficiência e/ou acurácia no *splicing*, retardando o acúmulo dos componentes do relógio.

A maquinaria de *splicing* alternativo também fornece um importante mecanismo para controlar a expressão de genes de relógio. No mecanismo molecular de relógios circadianos existe um grande número de proteínas resultantes de *splicing* alternativo, promovendo diversidade na regulação da função do relógio. A primeira evidência de *splicing* alternativo em genes de relógio veio da descrição de cDNAs de *Drosophila* onde o gene *Per* codifica, através de *splicing* alternativo, três diferentes proteínas PER (CITRI *et al.,* 1987). Este splicing diferencial parece ser um importante mecanismo para perceber mudanças térmicas e fotoperiódicas, pois temperatura, luz e o relógio interagem para regular o *splicing* 3' agindo então como um sensor sazonal (COLLINS *et al*., 2004; MAJERCAK *et al.,* 2004). Em mamíferos, são encontrados três genes *Per*, mas não existem evidências de que nenhum deles seja regulado por *splicing* alternativo.

Outro membro da maquinaria de relógio que sofre *splicing* alternativo é o gene *Bmal.* Em camundongos, *Bmal1* abrange 32kb e inclui 17 exons que produzem três *splices* variantes codificando três proteínas diferentes. Além disso, cada isoforma de mBMAL apresenta variação na distribuição tecidual (YU *et al*., 1999). De fato, múltiplas variantes de *splicing* e de sítios de iniciação foram identificadas em camundongos, ratos, e humanos para *Bmal1* e *Bmal2*, com distribuição tecidual diferente. O gene *Bmal2* de humanos apresenta atividade transcricional diferenciada *in vitro*, sugerindo que o *splicing* alternativo pode regular a amplitude tanto de osciladores centrais, como periféricos (SCHOENHARD *et al.,* 2002).

A contribuição da poliadenilação para o relógio circadiano é exemplificada pelo ritmo diário único no comprimento da cauda poliA no RNAm da vasopressina (AVP). Essa variação pode contribuir para a estabilidade do RNAm, e a presença da proteína AVP em diferentes horas do dia. Mesmo que a síntese hipotalâmica de AVP não seja necessária para a geração de ritmos circadianos, a amplitude deste ritmo parece ser modulada pela liberação de AVP no fluido cérebro-espinhal (ROBINSON *et al*., 1988; BROWN; NUNEZ, 1989). Embora a análise do comprimento da cauda poliA dos diferentes genes de relógio não tenha sido extensivamente investigada, essa modificação pode ser um importante mecanismo pelo qual o relógio pode controlar a estabilidade de RNAs mensageiros oscilantes.

Outro mecanismo de regulação da poliadenilação é fornecido pela nocturnina *(Noc)*, uma exonuclease especifica de cauda poliA envolvida na desadenilação (BAGGS; GREEN, 2003). A nocturnina apresenta uma expressão com grande amplitude nas células fotorreceptoras da retina de *Xenopus leavis* que contém relógios circadianos, e a nocturnina de mamíferos também é expressa de forma rítmica em tecidos como os rins, fígado e coração (WANG *et al*., 2001).

Em *Drosophila,* a evidência de controle pós-transcricional/pós-traducional veio da observação de que embora ciclem com mesma amplitude, o pico da concentração de proteína PER ocorre de 4 a 6 horas após o pico da concentração do RNAm de *Per* ser alcançado.

Dentre as muitas alterações pós-traducionais conhecidas (metilação, acetilação, glicosilação), a fosforilação mostrou exercer efeito crítico no relógio circadiano de *Drosophila* e em muitas outras espécies estudadas. No citoplasma acredita-se que a fosforilação afete o período do relógio de *Drosophila* de duas maneiras: (1) regulando a estabilidade de PER, e (2) regulando a entrada do complexo PER-TIM no núcleo. Em *Drosophila,* essa fosforilação é feita pela enzima DOUBLETIME (DBT), que é homóloga à enzima caseína quinase epsilon CKIε de mamíferos (KLOSS *et al*., 1998). Além da fosforilação, a ubiquitinação e a desfosforilação também exercem funções críticas na geração do ritmo de 24 horas.

Após o advento de sondas bioluminescentes incorporadas na região promotora do gene *Per* de *Drosophila* e de *Danio rerio* (*zebrafish*), ficou claro

que existem osciladores periféricos independentes em diferentes tecidos desses organismos (PLAUTZ *et al*., 1997; WHITMORE *et al.,* 2000). A expressão rítmica de genes de relógio foi encontrada até mesmo em linhagens de células imortalizadas de mamíferos (BALSALOBRE *et al.,*. 1998).

A partir de então, ficou evidente que cada célula do organismo contém um oscilador próprio, e que essa é uma característica muito conservada ao longo da evolução que apresenta pequenas alterações de acordo com o programa de diferenciação celular. Pois além dos genes de relógio dos NSQs, outros fatores de transcrição pertencentes a família bHLH-PAS podem ser diferencialmente expressos de um tecido para o outro, e por meio de elementos ativadores Ebox permitir alterações circadianas tecido-específicas na expressão gênica local, em resposta aos sinais endógenos (HOGENESCH *et al.,* 1998; REICK *et al.,* 2001; SCHOENHARD *et al.,* 2002).

Uma das características dos relógios periféricos, e também de células de NSQs isoladas, é a diminuição da amplitude, seguida de perda de ritmicidade na ausência de acoplamento entre as células. Pois, desta forma as células passam a manifestar períodos e fases distintos entre si, gerando uma resultante nula quando estas são analisadas em conjunto (CARR; WHITMORE, 2005; LIU *et al*., 2007).

Os resultados descritos neste trabalho sugerem que em escuro constante as células não são capazes de manter o acoplamento necessário para manter a mesma fase e período entre si, pelo menos no que diz respeito à expressão do RNAm de *Clock, Per2, Opn4x, N-acetiltransferase* e *Tirosina Hidroxilase,* embora a expressão de *Opn4m* tenha revelado um ritmo aparente. A expressão protéica de CLOCK e OPN4x não sugere ritmo, já a de TIROSINA HIDROXILASE sugere um ritmo aparente.

O ciclo claro-escuro foi capaz de estabelecer essa sincronia para a expressão do RNAm dos genes *Clock*, *Per2* (ritmo aparente), *Opn4m*, N-*acetiltransferase* (ritmo aparente) e *Tirosina Hidroxilase*, assim como para a expressão protéica de CLOCK e OPN4x (ambos ritmos aparentes). Os dados de 3 dias C:E, 3 dias E:E demonstram a incapacidade das células se manterem acopladas 3 dias após a sincronização por fotoperíodo.

Novas substâncias endógenas e exógenas têm sido reconhecidas como agentes sicronizadores, dentre estas hormônios, ácidos graxos, retinóis e

outros (BALSALOBRE *et al.,* 2000). O glutamato promoveu a sincronização de ritmos para a expressão do RNAm do gene *Clock*, demonstrando mais uma função retiniana para esse importante neurotransmissor.

Em conclusão, nossos resultados indicam que as células em cultura de embrião de 8 dias de galinha já contêm um relógio funcional, porém este necessita do ciclo claro-escuro ou de glutamato para sua sincronização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, A.; NOGI, T.; EBIHARA, S. Phase-relationship and mutual effects between circadian rhythms of ocular melatonin and dopamine in the pigeon. **Brain Res,** 792: 361-9, 1998.

ADACHI, A. *et al***.** The relationship between ocular melatonin and dopamine rhythms in the pigeon: effects of melatonin inhibition on dopamine release. **Brain Res,** 815: 435-40, 1999.

ADACHI, A. *et al*. Functional melatonin receptors and metabolic coupling in cultured chick astrocytes. **Glia**, 39(3): 268-78, 2002.

ADLER, R.; HATLEE, M. Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis. **Science**, 243(4889): 391-3, 1989.

ARENDT, D. Evolution of eyes and photoreceptor cell types. **Int J Dev Biol**, 47(7-8): 563-71, 2003.

ARENDT, D.; WITTBRODT, J. Reconstructing the eyes of Urbilateria. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,** 356: 1545-63, 2001.

ARENDT, D. *et al***.** Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. **Science,** 306: 869-71, 2004.

ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 25: 11-28, 1960.

BAGGS, J.; GREEN, C. Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina: A mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA. **Curr Biol,** 13: 189-198, 2003.

BAILEY, M. *et al***.** Chickens' Cry2: molecular analysis of an avian cryptochrome in retinal and pineal photoreceptors. **FEBS Lett,** 513: 169-74, 2002.

BAILEY, M.; CASSONE, V. Melanopsin expression in the chick retina and pineal gland. **Brain Res Mol Brain Res**, 134: 345-8, 2005.

BALSALOBRE, A.; DAMIOLA, F.; SCHIBLER, U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. **Cell**, 93(6): 917-9, 1998.

BALSALOBRE, A. *et al.* Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. **Science**., 289(5488): 2344-7, 2000.

BARRETT, R.; TAKAHASHI, J. Lability of circadian pacemaker amplitude in chick pineal cells: a temperature-dependent process. **J Biol Rhythms,** 12:

309-18, 1997.

BARRETT, R.; UNDERWOOD, H. Retinally perceived light can entrain the pineal melatonin rhythm in Japanese quail. **Brain Res,** 563: 87-93, 1991.

BELECKY-ADAMS, T.; COOK, B.; ADLER R. Correlations between terminal mitosis and differentiated fate of retinal precursor cells in vivo and in vitro: analysis with the "window-labeling" technique. **Dev Biol,** 178: 304-15, 1996.

BELLINGHAM, J.; FOSTER, R. Opsins and mammalian photoentrainment. **Cell Tissue Res,** 309: 57-71, 2002.

BELLINGHAM, J. *et al***.** Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localisation and phylogenetic position. **Brain Res Mol Brain Res,** 107: 128-36, 2002.

BELLINGHAM, J. *et al*. Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in non mammalian vertebrates. **PLoS Biol,** 4: 254, 2006.

BENEDITO-SILVA, A.A. Aspectos metodológicos da cronobiologia. In: Marques N. & Menna-Barreto L.S.(eds.) **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**, 3ª. Ed., EDUSP: 297-320, 2003.

BERNARD, M. *et al***.** Avian melatonin synthesis: photic and circadian regulation of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the chicken pineal gland and retina. **J Neurochem,** 68: 213-24, 1997.

BERNARD, M. *et al.* Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina. **Reprod Nutr Dev**, 9(3): 325-34, 1999.

BERSON, D.; DUNN, F.; TAKAO, M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. **Science,** 295: 1070-3, 2002.

BERSON, D.; CASTRUCCI, A.M.L.; PROVENCIO, I. Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice. **J Comp Neurol,** 2009 (submetido).

BESHARSE, J.; DUNIS, D. Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding. **Science,** 219: 1341-3, 1983.

BESHARSE, J.; IUVONE, P. Is dopamine a light-adaptive or a dark-adaptive modulator in retina? **Neurochem Int**, 20: 193-9, 1992.

BESHARSE, J.; DUNIS, D.; IUVONE P. Regulation and possible role of serotonin N-acetyltransferase in the retina. **Fed Proc,** 43: 2704-8, 1984.

BINKLEY, S. Circadian rhythm in pineal N-acetyltransferase activity: phase

shifting by light pulses (II). **J Neurochem,** 41: 273-6, 1983.

BLEAKMAN, D,; LODGE, D. Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. **Neuropharmacology,** 37: 1187-204, 1998.

BOATRIGHT, J.H.; RUBIM, N.M.; IUVONE, P.M. Regulation of endogenous dopamine release in amphibian retina by melatonin: the role of GABA. **Vis Neurosci,** 11, 1013–1018, 1994.

BROWN, M.; NUNEZ, A.A. Vasopressin-deficient rats show a reduced amplitude of the circadian sleep rhythm. **Physiol Behav,** 46: 759-762, 1989.

CAHILL G.; BESHARSE, J. Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors. **J Neurosci,** 11: 2959-71, 1991.

CAHILL, G; BESHARSE, J. Circadian clock functions localized in *Xenopus* retinal photoreceptors. **Neuron**, 10(4): 573-7, 1993.

CAHILL, G.; GRACE, M.; BESHARSE, J. Rhythmic regulation of retinal melatonin: metabolic pathways, neurochemical mechanisms, and the ocular circadian clock. **Cell Mol Neurobiol**, 11: 529-60, 1991.

CARR, A.J.; WHITMORE, D. Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. **Nat Cell Biol**, 7(3): 319-21, 2005.

CASHMORE, A. *et al***.** Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. **Science,** 284: 760-5, 1999.

CASSONE, V.; MENAKER, M. Is the avian circadian system a neuroendocrine loop? **J Exp Zool,** 232: 539-49, 1984.

CASSONE, V.; MOORE, R. Retinohypothalamic projection and suprachiasmatic nucleus of the house sparrow, *Passer domesticus*. **J Comp Neurol,** 266: 171-82, 1987.

CASTEL, M. *et al***.** Light-induced c-Fos expression in the mouse suprachiasmatic nucleus: immunoelectron microscopy reveals co-localization in multiple cell types. **Eur J Neurosci,** 9: 1950–1960, 1997.

CHAURASIA S. *et al*. 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, 2005.

CHAURASIA, S. *et al***.** Circadian clockwork machinery in neural retina: evidence for the presence of functional clock components in photoreceptor-enriched

chick retinal cell cultures. **Mol Vis,** 12: 215-23, 2006.

CHONG, N.; BERNARD, M.; KLEIN, D. Characterization of the chicken serotonin N-acetyltransferase gene. Activation via clock gene heterodimer/Ebox interaction. **J Biol Chem,** 275: 32991-8, 2000.

CHONG N. *et al***.** Temporal-spatial characterization of chicken clock genes: circadian expression in retina, pineal gland, and peripheral tissues. **J Neurochem,** 85: 851-60, 2003.

CITRI, Y. *et al*. A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene. **Nature**, 326: 42-47, 1987.

COLLINS, B.H.; ROSATO, E.; KYRIACOU, C.P. Seasonal behavior in *Drosophila melanogaster* requires the photoreceptors, the circadian clock, and phospholipase C. **Proc Natl Acad Sci USA,** 101: 1945-1950, 2004.

CONN, P.; PIN, J. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol,** 37: 205-37, 1997.

CONTIN, M.; VERRA, D.; GUIDO M. An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells. **FASEB J,** 20: 2648-50, 2006.

CORNÉLISSEN, G. *et al***.** Chronobiometry with pocket calculators and computer systems. **Ric Clin Lab,** 10(2): 333-85, 1980.

DANI, J.A.; MAYER, M.L. Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors. **Curr Opin Neurobiol**, 5(3): 310-7, 1995.

DAVID-GRAY, Z. *et al***.** Light detection in a 'blind' mammal. **Nat Neurosci,** 1: 655-6, 1998.

de MELLO, M. *et al***.** Regulation of dopamine- and adenosine-dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture. **Proc Natl Acad Sci USA,** 79: 5708-12, 1982.

DING, J. M. *et al***.** Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. **J Neurosci,** 17: 667–675, 1997.

DING, J. M. *et al***.** A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. **Nature**, 394(6691): 381-4, 1998.

DJAMGOZ, M.; WAGNER, H. Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina. **Neurochem Int,** 20: 139-91, 1992.

DOWLING, J.; EHINGER, B. The interplexiform cell system. I. Synapses of the

dopaminergic neurons of the goldfish retina. **Proc R Soc Lond B Biol Sci,** 201: 7-26, 1978.

DUBOCOVICH, M.L.; TAKAHASHI, J.S.. Use of 2-[125I]-iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. **Proc Natl Acad Sci,** 84: 3916–3920, 1987.

DUBOCOVICH, M. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. **Nature,** 306: 782-4, 1983.

EBREY, T.; KOUTALOS, Y. Vertebrate photoreceptors. **Prog Retin Eye Res**, 20(1): 49-94, 2001.

FAILLACE, M.; KELLER, M.S.; ROSENSTEIN R. Melatonin effect on [^{3}H] glutamate uptake and release in the golden hamster retina. **J Neurochem,** 67: 623-8, 1996.

FERNALD, R. Casting a genetic light on the evolution of eyes. **Science,** 313: 1914-8, 2006.

FERREIRA, I.; FAILLACE, M.; KELLER, M.S.; ROSENSTEIN, R. Culture medium components modulate retina cell damage induced by glutamate, kainate or "chemical ischemia". **Neurochem Int,** 32: 387-96, 1998.

FERREIRA, J.; PAES-de-CARVALHO, R. Long-term activation of adenosine A (2a) receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. **Brain Res,** 900: 169-76, 2001.

FOSTER, R. *et al*. Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). **J Comp Physiol [A]** 169: 39-50, 1991.

FOSTER, R.; HANKINS, M.; PEIRSON, S. Light, photoreceptors, and circadian clocks. **Methods Mol Biol,** 362: 3-28, 2007.

FRANÇOIS-BELLAN, A.; DEPREZ, P.; BECQUET, D. Light-induced variations in AP-1 binding activity and composition in the rat suprachiasmatic nucleus. **J Neurochem,** 72: 841-7, 1999.

FRANÇOIS-BELLAN, A. *et al*. Is light-regulated AP-1 binding in the rat suprachiasmatic nucleus gated by the circadian clock? **Brain Res Mol Brain Res,** 85: 161-70, 2000.

FREEDMAN, M. *et al*. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. **Science,** 284: 502-4, 1999.

GARBARINO-PICO, E. *et al*. Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day. **J Biol Chem,**

279: 51172-81, 2004.

GÄRTNER, W.; TOWNER, P. Invertebrate visual pigments. **Photochem Photobiol,** 62: 1-16, 1995.

GASTON, S.; MENAKER, M. Pineal function: the biological clock in the sparrow? **Science,** 160: 1125-7, 1968.

GEKAKIS, N. *et al*. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. **Science,** 280: 1564-9, 1998.

GILLETTE, M.U.; MITCHELL, J.W. Signalling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative**. Cell Tissue Res,** 309: 99–107, 2002.

GINGRICH, J.A.; CARON, M. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. **Annu Rev Neurosci,** 16: 299–321, 1993.

GINTY, D.D *et al*. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. **Science,** 260: 238–241, 1993.

GRACE, M. *et al*. The tau mutation shortens the period of rhythmic photoreceptor outer segment disk shedding in the hamster. **Brain Res,** 735: 93-100, 1996.

GRACE, M.S.; CHIBA, A.; MENAKER, M., Circadian control of photoreceptor outer segment membrane turnover in mice genetically incapable of melatonin synthesis. **Vis Neurosci,** 16: 909–918, 1999.

GREEN, C.; CAHILL, G.; BESHARSE, J. Regulation of tryptophan hydroxylase expression by a retinal circadian oscillator in vitro. **Brain Res,** 677: 283-90, 1995a.

GREEN, C.; CAHILL, G.; BESHARSE, J. Tryptophan hydroxylase is expressed by photoreceptors in *Xenopus laevis* retina. **Vis Neurosci,** 12: 663-70, 1995b.

GUIDO, M.; CARPENTIERI, A.; GARBARINO-PICO, E. Circadian phototransduction and the regulation of biological rhythms. **Neurochem Res,** 27: 1473-89, 2002.

GREEN, C.; BESHARSE, J. Retinal circadian clocks and control of retinal physiology **J Biol Rhythms,** 19(2): 91-102, 2004.

GUIMARÃES, M. *et al*. Dopaminergic retinal cell differentiation in culture: modulation by forskolin and dopamine. **Eur J Neurosci,** 13: 1931-7, 2001.

HANKINS, M.; PEIRSON, S.; FOSTER, R. Melanopsin: an exciting

photopigment. **Trends Neurosci,** 31(1): 27-36, 2007.

HANNIBAL, J. *et al*. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. **J Neurosci,** 17: 2637-44, 1997.

HANNIBAL, J.; FAHRENKRUG, J. Melanopsin: a novel photopigment involved in the photoentrainment of the brain's biological clock? **Ann Med,** 34: 401-7, 2002.

HANNIBAL, J. *et al*. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. **J Neurosci,** 22: RC191, 2002.

HANNIBAL, J. *et al*. Melanopsin is expressed in PACAP-containing retinal ganglion cells of the human retinohypothalamic tract. **Invest Ophthalmol Vis Sci,** 45: 4202-9, 2004.

HAQUE, R. *et al*. Dual regulation of cryptochrome 1 mRNA expression in chicken retina by light and circadian oscillators. **Neuroreport,** 13: 2247-51, 2002.

HAQUE, R. *et al*. Diurnal regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase activity in chicken retinal cells in vitro: analysis of culture conditions. **Mol Vis,** 9: 52-9, 2003.

HARGRAVE, P.; McDOWELL, J. Rhodopsin and phototransduction. **Int Rev Cytol,** 137B: 49-97, 1992a.

HARGRAVE, P.; McDOWELL, J. Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. **FASEB J,** 6: 2323-31, 1992b.

HARTWICK, A.T. *et al***.** Light-evoked calcium responses of isolated melanopsin-expressing retinal ganglion cells. **J Neurosci** 27(49): 13468-80, 2007.

HEDDEN, W.J.; DOWLING, J. The interplexiform cell system. II. Effects of dopamine on goldfish retinal neurones. **Proc R Soc Lond B Biol Sci,** 201: 27-55, 1978.

HOGENESCH, J.B. *et al*. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. **Proc Natl Acad Sci USA**, 95(10): 5474-9, 1998.

HURST, W.J.; MITCHELL, J.W.; GILLETTE, M.U. Synchronization and phase-resetting by glutamate of an immortalized SCN cell line. **Biochem Biophys Res Comm,** 298: 133–43, 2002.

ISOLDI, M. *et al***.** Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. **Proc Natl Acad Sci USA,**. 102: 1217-21, 2005.

IUVONE, P.; BESHARSE, J. Dopamine receptor-mediated inhibition of serotonin N-acetyltransferase activity in retina. **Brain Res,** 369: 168-76, 1986.

IUVONE, P. *et al* Cellular and molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase activity in chicken retinal photoreceptors. **Biol Signals,** 6(4-6): 217-24, 1997.

IUVONE, P. *et al*. Melatonin biosynthesis in chicken retina. Regulation of tryptophan hydroxylase and arylalkylamine N-acetyltransferase. **Adv Exp Med Biol,** 460: 31-41, 1999.

IUVONE, P. *et al*. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. **Prog Retin Eye Res,** 24: 433-56, 2005.

IVANOVA, T.; IUVONE, P. Circadian rhythm and photic control of cAMP level in chick retinal cell cultures: a mechanism for coupling the circadian oscillator to the melatonin-synthesizing enzyme, arylalkylamine N-acetyltransferase, in photoreceptor cells. **Brain Res,** 991: 96-103, 2003a.

IVANOVA, T.; IUVONE, P. Melatonin synthesis in retina: circadian regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase activity in cultured photoreceptor cells of embryonic chicken retina. **Brain Res,** 973: 56-63, 2003b.

KALLONIATIS, M.; TOMISICH, G.; MARC, R. Neurochemical signatures revealed by glutamine labeling in the chicken retina. **Vis Neurosci,** 11: 793-804, 1994.

KALSBEEK, A. *et al*. GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. **Neuroscience,** 91: 453-61, 1999.

KALSBEEK, A. *et al*. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. **Eur J Neurosci,** 12: 3146-54, 2000.

KASAL, C.; MENAKER, M.; PEREZ-POLO, J. Circadian clock in culture: N-acetyltransferase activity of chick pineal glands oscillates in vitro. **Science,** 203: 656-8, 1979.

KLEIN, D. *et al*. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity.

Biochem Soc Trans, 20: 299-304, 1992.

KLOSS, B. *et al.* The *Drosophila* clock gene doubletime encodes a protein closely related to human casein kinase Iepsilon. **Cell,** 94: 97-107, 1998.

KORENBROT, J.I.; FERNALD, R.D. Circadian rhythm and light regulate opsin mRNA in rod photoreceptors. **Nature**, 337(6206): 454-7, 1989.

KORNHAUSER, J. *et al*. Regulation of jun-B messenger RNA and AP-1 activity by light and a circadian clock. **Science,** 255: 1581-4, 1992.

KOUTALOS, Y.; NAKATANI, K.; YAU, K. The cGMP-phosphodiesterase and its contribution to sensitivity regulation in retinal rods. **J Gen Physiol,** 106: 891-921, 1995.

KOUTALOS, Y.; YAU, K. Regulation of sensitivity in vertebrate rod photoreceptors by calcium. **Trends Neurosci,** 19: 73-81, 1996.

KOYANAGI, M. *et al*. Cephalochordate melanopsin: evolutionary linkage between invertebrate visual cells and vertebrate photosensitive retinal ganglion cells. **Curr Biol,** 15: 1065-9, 2005.

KUHLMAN, S.; QUINTERO, J.; McMAHON, D. GFP fluorescence reports Period 1 circadian gene regulation in the mammalian biological clock. **Neuroreport,** 11: 1479-82, 2000.

KUMBALASIRI, T. *et al***.** Melanopsin triggers the release of internal calcium stores in response to light. **Photochem Photobiol**, 83(2): 273-9, 2007.

KUSAKABE, T.; TSUDA, M. Photoreceptive systems in ascidians. **Photochem Photobiol,** 83: 248-52, 2007.

LARKIN, P.; BAEHR, W.; SEMPLE-ROWLAND, S.L. Circadian regulation of iodopsin and clock is altered in the retinal degeneration chicken retina. **Brain Res Mol Brain Res,** 70: 253-63, 1999.

LASATER, E. Characteristics of single-channels activated by quisqualate and kainate in teleost retinal horizontal cells**. Vision Res,** 31: 413-24, 1991.

LIMA, L.H.R.G. *et al***.** Melanopsin in chicken melanocytes and retina**. Biol Rhythm Res,** 37(5): 393-404, 2006.

LIU, A.C. *et al.* Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network .**Cell,** 129(3): 605-16, 2007.

LOWREY, P. *et al*. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. **Science,** 288: 483-92, 2000.

LUCAS, R. *et al*. Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone,

ocular photoreceptors. **Science,** 284: 505-7, 1999.

MAJERCAK, J. *et al*. Splicing of the period gene 3'-terminal intron is regulated by light, circadian clock factors, and phospholipase C. **Mol Cell Biol,** 24: 3359-3372, 2004.

MANGEL, S. Circadian clock regulation of neuronal light responses in the vertebrate retina. **Prog Brain Res,** 131: 505-18, 2001.

MANGLAPUS, M. *et al*. Dopamine mediates circadian rhythms of rod-cone dominance in the Japanese quail retina. **J Neurosci,** 19: 4132-41, 1999.

MARC, R.; MURRY, R.; BASINGER, S. Pattern recognition of amino acid signatures in retinal neurons. **J Neurosci,** 15: 5106-29, 1995.

MARTINEK, S. *et al*. A role for the segment polarity gene *shaggy*/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. **Cell,** 105: 769-779, 2001.

MASSEY, S.; MILLER, R. N-methyl-D-aspartate receptors of ganglion cells in rabbit retina. **J Neurophysiol,** 63: 16-30, 1990.

McCARREN, J.; DeLONG, E. Proteorhodopsin photosystem gene clusters exhibit co-evolutionary trends and shared ancestry among diverse marine microbial phyla. **Environ Microbiol,** 9: 846-58, 2007.

McCORMACK, C.; BURNSIDE, B. Effects of circadian phase on cone retinomotor movements in the Midas cichlid. **Exp Eye Res,** 52: 431-8, 1991.

McCORMACK, C.; BURNSIDE, B. A role for endogenous dopamine in circadian regulation of retinal cone movement. **Exp Eye Res,** 55: 511-20, 1992.

McCORMACK, C.; BURNSIDE, B. Light and circadian modulation of teleost retinal tyrosine hydroxylase activity. **Invest Ophthalmol Vis Sci,** 34: 1853-60, 1993.

MENAKER, M. Nonvisual light reception. **Sci Am,** 226: 22-9, 1972.

MENAKER, M.; MOREIRA, L.; TOSINI, G. Evolution of circadian organization in vertebrates. **Braz J Med Biol Res,** 30: 305-13, 1997.

MITCHELL, C.K.; REDBURN, D.A.. Melatonin inhibits ACh release from rabbit retina. **Vis Neurosci**, 7: 479–86, 1991.

MONTELL, C. Visual transduction in Drosophila. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 15: 231-68, 1999.

MOORE, R. Neural control of the pineal gland. **Behav Brain Res,** 73: 125-30, 1996.

MURAKAMI, N. *et al*. Comparison of circadian oscillation of melatonin release

in pineal cells of house sparrow, pigeon and Japanese quail, using cell perfusion systems. **Brain Res,** 651: 209-14, 1994.

MURESAN, Z.; BESHARSE, J.C. D2-like dopamine receptors inamphibian retina: localization with fluorescent ligands. **J Comp Neur,** 331: 149–160, 1993.

NAKAHARA, K. *et al*. Individual pineal cells in chick possess photoreceptive, circadian clock and melatonin-synthesizing capacities in vitro. **Brain Res,** 774: 242-5, 1997.

NAMIHIRA, M. *et al***.** Circadian rhythms and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the rat retina. **Neurosci Lett,** 271: 1-4, 1999.

NAMIHIRA, M. *et al*. Circadian pattern, light responsiveness and localization of rPer1 and rPer2 gene expression in the rat retina. **Neuroreport,** 12: 471-5, 2001.

NATESAN, A.; CASSONE, V. Melatonin receptor mRNA localization and rhythmicity in the retina of the domestic chick, *Gallus domesticus*. **Vis Neurosci**, 19: 265-74, 2002.

NAWY, S.; JAHR, C. Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. **Nature,** 346: 269-71, 1990a.

NAWY, S.; JAHR, C. Time-dependent reduction of glutamate current in retinal bipolar cells. **Neurosci Lett,** 108: 279-83, 1990b.

NELSON, W. *et al*. Methods for cosinor rhythmometry. **Chronobiologia,** 6: 305-23, 1979.

NGUYEN-LEGROS, J. *et al***.** Immunocytochemical localization of dopamine D1 receptors in the retina of mammals. **Vis Neurosci,** 14: 545–551, 1997.

NIR, I.; HAQUE, R.; IUVONE, P. Diurnal metabolism of dopamine in the mouse retina. **Brain Res,** 870: 118-25, 2000.

NICOLLETTI, I. *et al***.** A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Meth**, 139(2): 271-9, 1991.

NORGREN, R.J.; SILVER, R. Retinal projections in quail (*Coturnix coturnix*). **Vis Neurosci,** 3: 377-87, 1989a.

NORGREN, R.J.; SILVER, R. Retinohypothalamic projections and the suprachiasmatic nucleus in birds. **Brain Behav Evol,** 34: 73-83, 1989b.

OBRIETAN, K. *et al***.** Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. **J Biol Chem,** 274: 17748-56, 1999.

OHI, K. *et al*. N-methyl-D-aspartate receptor participates in neuronal transmission of photic information through the retinohypothalamic tract. **Neuroendocrinology,** 53: 344-8, 1991.

OKANO, T.; YOSHIZAWA, T.; FUKADA, Y. Pinopsin is a chicken pineal photoreceptive molecule. **Nature,** 372: 94-7, 1994.

OKANO, T.; FUKADA, Y. Photoreception and circadian clock system of the chicken pineal gland. **Microsc Res Tech,** 53: 72-80, 2001.

OKANO, T. *et al*. Chicken pineal clock genes: implication of BMAL2 as a bidirectional regulator in circadian clock oscillation. **Genes Cells,** 6: 825-36, 2001.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol,** 54: 581-618, 1998.

PAES-DE-CARVALHO R., MAIA, G.; FERREIRA, J. Adenosine regulates the survival of avian retinal neurons and photoreceptors in culture. **Neurochem Res,** 28: 1583-90, 2003.

PANDA, S. *et al*. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. **Science,** 298: 2213-6, 2002.

PANDA, S. *et al*. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. **Science,** 301: 525-7, 2003.

PEIRSON, S.; FOSTER, R. Melanopsin: another way of signaling light. **Neuron**, 49: 331-9, 2006.

PERSSON, K.; HAMBY, K.; UGOZZOLI, L.A. Four-color multiplex reverse transcription polymerase chain reaction—Overcoming its limitations. **Anal Biochem**, 344: 33–42, 2005.

PIERCE, M.; BESHARSE, J. Circadian regulation of retinomotor movements. I. Interaction of melatonin and dopamine in the control of cone length. **J Gen Physiol,** 86: 671-89, 1985.

PIERCE, M.; BESHARSE, J. Melatonin and rhythmic photoreceptor metabolism: melatonin-induced cone elongation is blocked at high light intensity. **Brain Res,** 405: 400-4, 1987.

PIERCE, M. *et al***.** Circadian regulation of iodopsin gene expression in

embryonic photoreceptors in retinal cell culture. **Neuron,** 10: 579-84, 1993.

PITTENDRIGH, C. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol,** 25: 159-84, 1960.

PLAUTZ, J.D. *et al.* Independent photoreceptive circadian clocks throughout Drosophila. **Science,** 278(5343): 1632-5, 1997.

POLITI, L.; ADLER, R. Generation of enriched populations of cultured photoreceptor cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci,** 27: 656-65, 1986.

PROVENCIO, I. *et al.* Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. **Proc Natl Acad Sci USA,** 95: 340-5, 1998.

PROVENCIO, I. *et al***.** A novel human opsin in the inner retina. **J Neurosci,** 20: 600-5, 2000.

PROVENCIO, I.; ROLLAG, M.; CASTRUCCI, A. Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. **Nature,** 415: 493, 2002.

QIU, X. *et al*. Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. **Nature**, 433: 745-9, 2005.

REA, M. Light increases Fos-related protein immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nuclei. **Brain Res Bull,** 23: 577-81, 1989.

REA, M. *et al***.** Daily profile of the extracellular concentration of glutamate in the suprachiasmatic region of the Siberian hamster. **Proc Soc Exp Biol Med,** 204: 104-9, 1993a.

REA, M.; MICHEL, A.; LUTTON, L. Is Fos expression necessary and sufficient to mediate light-induced phase advances of the suprachiasmatic circadian oscillator? **J Biol Rhythms,** 8 Suppl: S59-64, 1993b.

REA, M.; BUCKLEY, B.; LUTTON, L. Local administration of EAA antagonists blocks light-induced phase shifts and c-fos expression in hamster SCN. **Am J Physiol,** 265: R1191-8, 1993c.

REICK *et al.* NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain **Science,** 293(5529): 506-9, 2001 .

REPPERT, S. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. **J Biol Rhythms,** 12: 528-31, 1997.

REPPERT, S.; WEAVER, D. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. **Annu Rev Physiol,** 63: 647-76, 2001.

ROBINSON, B., *et al*. Vasopressin mRNAin the suprachiasmatic nuclei: Daily regulation of polyadenylate tail length. **Science,** 241:342- 344, 1988.

ROLLAG, M.; BERSON, D. PROVENCIO, I. Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. **J Biol Rhythms,** 18: 227-34, 2003.

ROSIAK, J.; ZAWILSKA, J. Near-ultraviolet light perceived by the retina generates the signal suppressing melatonin synthesis in the chick pineal gland-an involvement of NMDA glutamate receptors. **Neurosci Lett,** 379: 214-7, 2005.

ROSIAK, J.; IUVONE, M.P.; ZAWILSKA, J. UV-A light regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the chick pineal gland: role of cAMP and proteasomal proteolysis. **J Pineal Res,** 39: 419-24, 2005.

SAKAMOTO, K. *et al*. Two circadian oscillatory mechanisms in the mammalian retina. **Neuroreport,** 11: 3995-7, 2000.

SAKAMOTO, K. *et al***.** Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. **Eur J Neurosci,** 22: 3129-36, 2005.

SEEMAN, P.; VANTOL, H.H.M. Dopamine receptor pharmacology. **Trans Pharmacol Sci,** 15: 264–70, 1994

SEIGEL, G. The golden age of retinal cell culture. **Mol Vis,** 5: 4, 1999.

SEKARAN, S. *et al*. 2-Aminoethoxydiphenylborane is an acute inhibitor of directly photosensitive retinal ganglion cell activity in vitro and in vivo. **J Neurosci**, 27(15): 3981-6, 2007.

SHIMIZU, T. *et al*. Cholera toxin mapping of retinal projections in pigeons (*Columbia livia*), with emphasis on retinohypothalamic connections. **Vis Neurosci,** 11: 441-6, 1994.

SCHOENHARD, J.A. *et al*. Alternative splicing yields novel BMAL2 variants: Tissue distribution and functional characterization. **Am J Physiol Cell Physiol,** 283: 103-14, 2002.

SLAUGHTER, M.; MILLER, R. 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. **Science,** 211: 182-5, 1981.

SLAUGHTER, M.; MILLER, R. An excitatory amino acid antagonist blocks cone input to sign-conserving second-order retinal neurons. **Science,** 219: 1230-2, 1983a.

SLAUGHTER, M.; MILLER, R. Bipolar cells in the mudpuppy retina use an excitatory amino acid neurotransmitter. **Nature,** 303: 537-8, 1983b.

SLAUGHTER, M.; MILLER, R. The role of excitatory amino acid transmitters in the mudpuppy retina: an analysis with kainic acid and N-methyl aspartate. **J Neurosci,** 3: 1701-11, 1983c.

SPUDICH, J. The multitalented microbial sensory rhodopsins. **Trends Microbiol,** 14: 480-7, 2006.

SPUDICH, J. *et al***.** Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. **Annu Rev Cell Dev Biol,** 16: 365-92, 2000.

STENKAMP, D.; IUVONE, P.; ADLER, R. Photomechanical movements of cultured embryonic photoreceptors: regulation by exogenous neuromodulators and by a regulable source of endogenous dopamine. **J Neurosci,** 14: 3083-96, 1994.

STRYER, L. Molecular mechanism of visual excitation. **Harvey Lect,** 87: 129-43, 1991.

TAKAHASHI, J.; HAMM, H.; MENAKER, M. Circadian rhythms of melatonin release from individual superfused chicken pineal glands in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA,** 77: 2319-22, 1980.

TAKEUCHI, Y. *et al***.** N-methyl-D-aspartate, quisqualate and kainate receptors are all involved in transmission of photic stimulation in the suprachiasmatic nucleus in rats. **Brain Res,** 563: 127-31, 1991.

TOMONARI, S. *et al***.** A non-canonical photopigment, melanopsin, is expressed in the differentiating ganglion, horizontal, and bipolar cells of the chicken retina. **Dev Dyn**, 234: 783-90, 2005.

TOMONARI, S. *et al.* Expression pattern of the melanopsin-like (cOpn4m) and VA opsin-like genes in the developing chicken retina and neural tissues. **Gene Expr Patterns,** 7: 746-53, 2007.

TOSINI, G.; MENAKER, M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. **Science,** 272(5260): 419-21, 1996.

TOSINI, G.; MENAKER, M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. **Brain Res,** 789: 221-8, 1998.

UNDERWOOD, H. The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. **Experientia,** 46: 120-8, 1990.

UNDERWOOD, H. The circadian rhythm of thermoregulation in Japanese quail.

I. Role of the eyes and pineal. **J Comp Physiol [A],** 175: 639-53, 1994.

UNDERWOOD, H.; SIOPES, T. Circadian organization in Japanese quail. **J Exp Zool,** 232: 557-66, 1984.

UNDERWOOD, H.; BARRETT, R.; SIOPES, T. Melatonin does not link the eyes to the rest of the circadian system in quail: a neural pathway is involved. **J Biol Rhythms,** 5: 349-61, 1990a.

UNDERWOOD, H.; BARRETT, R.; SIOPES, T. The quail's eye: a biological clock. **J Biol Rhythms,** 5: 257-65, 1990b.

UNDERWOOD, H.; EDMONDS, K. The circadian rhythm of thermoregulation in Japanese quail. II. Multioscillator control. **J Biol Rhythms,** 10: 234-47, 1995a.

UNDERWOOD, H.; EDMONDS, K. The circadian rhythm of thermoregulation in Japanese quail: III. Effects of melatonin administration. **J Biol Rhythms,** 10: 284-98, 1995b.

UNDERWOOD, H.; STEELE, C. T.;ZIVIKOVIC, B. Circadian organization and role of pineal in birds. **Microsc Res Tech,** 53(1): 48-62, 2001.

UNDERWOOD, H., BINKLEY, S.; SIOPES, T.; MOSHER K. Melatonin rhythms in the eyes, pineal bodies, and blood of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Gen Comp Endocrinol,** 56: 70-81, 1984.

VERSAUX-BOTTERI, C. *et al*. Molecular identification of a dopamine D1b receptor in bovine retinal pigment epithelium. **Neurosci Lett,**. 237: 9–12, 1997.

VERUKI, M.L.; WÄSSLE, H. Immunohistochemical localization of dopamine D1 receptors in rat retina. **Eur J Neurosci,** 8: 2286–97, 1996.

VOUGHT, B. *et al*. Characterization of the primary photointermediates of Drosophila rhodopsin. **Biochemistry,** 39: 14128-37, 2000.

WANG, Y. *et al.* Rhythmic expression of nocturnin mRNA in multiple tissues of the mouse. **BMC Dev Biol,** 1: 9, 2001.

WAINWRIGHT, S.; WAINWRIGHT, L. Regulation of the diurnal cycle in activity of serotonin acetyltransferase in the chick pineal gland. **Can J Biochem,** 56: 685-90, 1978.

WARREN, E.J. *et al*. The light-activated signaling pathway in SCN-projecting rat retinal ganglion cells. **Eur J Neurosci,** 23(9): 2477-87, 2006.

WHITE, M.P.; FISHER, L.J.. Effects of exogenous melatonin on circadian disc shedding in the albino rat retina. **Vis Res,** 29: 167–79, 1989.

WHITMORE, D.; FOULKES, N.S.; SASSONE-CORSI, P. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. **Nature,** 404(6773): 87-91, 2000.

WIECHMANN, A.F. *et al*. Melatonin enhances horizontal cell sensitivity in salamander retina. **Brain Res,** 453: 377–380, 1988.

WIRZ-JUSTICE, A.; Da PRADA, M.; REMÉ, C. Circadian rhythm in rat retinal dopamine. **Neurosci Lett,** 45: 21-5, 1984.

WITKOVSKY, P. *et al*. Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene Period 1 in the mouse retina. **J Neurosci,** 23: 7670-6, 2003.

WITKOVSKY, P. Dopamine and retinal function. **Doc Ophthalmol**, 108(1): 17-40, 2004.

YAMAZAKI, S.; ALONES, V.; MENAKER, M. Interaction of the retina with suprachiasmatic pacemakers in the control of circadian behavior. **J Biol Rhythms,** 17: 315-29, 2002.

YAU, K. Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. **Invest Ophthalmol Vis Sci,** 35: 9-32, 1994.

YEAGLE, P.; CHOI, G.; ALBERT, A. Studies on the structure of the G-protein-coupled receptor rhodopsin including the putative G-protein binding site in unactivated and activated forms. **Biochemistry,** 40: 11932-7, 2001.

YOUNG, R.W. The daily rhythm of shedding of rod and cone outer segment membranes in the chick retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci,** 77: 105-116, 1978.

YOSHIMURA, T. *et al*. Molecular analysis of avian circadian clock genes. **Brain Res Mol Brain Res,** 78: 207-15, 2000.

YOSHIMURA, T. *et al***.** Identification of the suprachiasmatic nucleus in birds. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** 280: R1185-9, 2001.

YU, W. *et al.* Characterization of three splice variants and genomic organization of the mouse BMAL1 gene. **Biochem Biophys Res Commun,** 260: 760-767, 1999.

ZATZ, M. Photoendocrine transduction in cultured chick pineal cells: IV. What do vitamin A depletion and retinaldehyde addition do to the effects of light on the melatonin rhythm? **J Neurochem,** 62(5): 2001-11, 1994.

ZATZ, M.; HEATH Jr. Calcium and photoentrainment in chick pineal cells revisited: effects of caffeine, thapsigargin, EGTA, and light on the melatonin rhythm. **J Neurochem** 65: 1332-41, 1995.

ZAWILSKA, J. *et al*. Rhythmic changes in metabolism of dopamine in the chick retina: the importance of light versus biological clock. **J Neurochem,** 84: 717-24, 2003a.

ZAWILSKA, J. *et al*. L-745,870 suppresses the nighttime serotonin N-acetyltransferase activity in chick retina: in vivo evidence for agonist activity at D4-dopamine receptors. **J Neural Transm,** 110: 219-27, 2003b.

ZHANG, Y. *et al*. Circadian oscillator function in embryonic retina and retinal explant cultures. **Brain Res Mol Brain Res,** 114: 9-19, 2003.

ZHU, H.; GREEN, C. Three cryptochromes are rhythmically expressed in *Xenopus laevis* retinal photoreceptors. **Mol Vis,** 7: 210-5, 2001.

ZHU, H. *et al*. The *Xenopus* clock gene is constitutively expressed in retinal photoreceptors. **Brain Res Mol Brain Res,** 75: 303-8, 2000.

ZHUANG, M. *et al.* Differential regulation of two period genes in the *Xenopus* eye. **Brain Res Mol Brain Res,** 82: 52-64, 2000.

ZYLKA, M. *et al.* Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. **Neuron,** 20: 1103-10, 1998.