Rafael Peres

**Estudo da presença, da função e das vias de
produção da melatonina em invertebrados.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

Rafael Peres

**Estudo da presença, da função e das vias de
produção da melatonina em invertebrados.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Fisiologia Humana

Orientador: Professor Dr. José Cipolla-Neto

Co-Orientador: Professor Antonio Carlos
Marques

Versão Original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Peres, Rafael.

Estudo da presença, da função e das vias de produção da melatonina em invertebrados./ Rafael Peres. -- São Paulo, 2013.

Orientador: José Cipolla Neto.

Co-Orientador: Antônio Carlos Marques

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia da glândula pineal.

Versão do título para o inglês: Melatonin in invertebrates: presence, functions and production pathways.

Descritores: 1. Melatonina 2. Invertebrados 3. Cronobiologia 4. Genes relógio I. Cipolla Neto, José II. Marques, Antonio Carlos, III. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana IV. Título.

ICB/SBIB59/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rafael Peres.

Título da Dissertação: Estudo da presença, da função e das vias de produção da melatonina em invertebrados

Orientador(a): José Cipolla Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 297, referente ao projeto intitulado: "*Estudo da presença da função e das vias de produção da melatonina em invertebrados*" sob a responsabilidade de **Rafael Peres**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 24 de março de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que RAFAEL PERES foi aprovado no Curso de Proteção Radiológica, promovido pelo Núcleo de Radioproteção do ICB/USP, no período de 14/07 a 18/07/2008 com carga horária de 15 horas.

São Paulo, 11 de Agosto de 2008.

Prof. Dr. BENY SPIRA

NUCLEO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA

À minha mãe, por sempre me apoiar, pela educação, por seu amor, incentivo e compreensão. E à Samuel Kai Mana David por ter sempre estado ao meu lado, em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor José Cipolla-Neto e ao meu co-orientador, professor Antonio Carlos Marques, pela preciosa ajuda no desenvolver do projetos, tanto me dando suporte nas dificuldades experimentais quanto em me prover de idéias sobre a discussão dos resultados. Ao professor Mark Martindale, da Universidade do Hawaii, por ter me recebido tão bem para meu estágio de doutorado, me dando total suporte em todos os momentos. Mais do que um excelente orientador, se tornou um grande amigo.

Agradecimento especial as técnica de laboratório, Julieta Helena Scialfa (ICB) e Sabrina Baroni (IB), pela ajuda na realização experimentos e aos técnicos do Cebimar pela ajuda na coleta dos animais.

À professora Solange Castro Afeche, por ter me possibilitado realizar diversos experimentos em seu laboratório, com total suporte, e por ter ajudado na discussão de resultados.

À todos os colegas de laboratório pela ajuda, apoio e amizade.

Aos colegas de laboratório da Universidade do Hawaii, que me receberam muito bem, me fazendo sentir em casa. Não teria conseguido nada sem vocês!

Agradecimento mais que especial à minha mãe, pelo apoio nas horas difíceis e pelo apoio na realização do intercâmbio.

WAE AKU I KA LANI

(Deixe o céu fazer as escolhas,
seja confiante, não há nada a temer.)

Provérbio havaiano

RESUMO

Peres R. Estudo da presença, da função e das vias de produção da melatonina em invertebrados. [tese (Doutorado em Ciências)]. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo; 2013.

A melatonina é o principal hormônio produzido pela glândula pineal dos vertebrados. Tal produção é regulada com precisão pelo ciclo dia-noite. Desta maneira, funciona como um sinal para o organismo como um todo, informando, pela sua presença ou ausência, se é dia ou noite no ambiente externo. A primeira descrição do indol em invertebrados ocorreu em 1984, no grilo *Locusta migratoria*. Seguiram-se trabalhos nos mais diversos filos, mas alguns grupos de fundamental importância, seja pela sua riqueza de espécies, seja pelo seu posicionamento filogenético, como Cnidaria, Ctenophora, Annelida, e Echinodermata nunca foram investigados quanto à presença deste hormônio. O presente estudo foi capaz de mostrar a presença da melatonina em espécies destes filos, bem como a presença da via de produção clássica da substância, com ensaios de atividade para as enzimas e demonstração da presença dos correspondentes genes no genoma das espécies. Fomos também capazes de realizar ensaios que mostraram que a melatonina possui papel na regulação do ritmo circadiano destas espécies.

Palavras chave: Melatonina. Invertebrados. Cronobiologia. Genes relógio.

ABSTRACT

Peres R. Melatonin in invertebrates: presence, functions and production pathways. [Thesis (Doctor in Science)]. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo; 2013.

The primary hormone of the vertebrate pineal gland, melatonin, an indole, was first described as a circadian and seasonal pacemaker that allows the animal to predict and prepare for changes in their environment. However, many articles have recently been published expanding the importance of melatonin, including new sites of production, such as the retina and gastrointestinal system, as well as its function in non-vertebrate organisms. The presence of melatonin in invertebrates was first reported in the eyes of the locust *Locusta migratoria*. However, groups of importance like Cnidaria, Ctenophora, Annelida, and Echinodermata have never been investigated about the presence of melatonin. Our study shows the presence of the indol, and also the presence of the enzymes of the classical melatonin pathway. This is showed not only by the presence of the genes of those enzymes in the genome of the species, but also by the activity of the enzymes. We also show potential actions of the melatonin in modulating the behavior of the species.

Keywords: Melatonin. Invertebrates. Chronobiology. Clock genes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1.1 A glândula pineal dos vertebrados.....	15
1.2 A molécula de melatonina.....	16
1.3 Melatonina em não vertebrados.....	18
1.4 Clock genes.....	21
1.5 Justificativa.....	23
2 OBJETIVOS.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Material biológico.....	26
3.2 Coleta de material e experimentos <i>in vivo</i>	27
3.3 Aferição da presença de melatonina por HPLC.....	30
3.4 Aferição da presença de melatonina por Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	31
3.5 Extração de DNA dos tecidos das espécies.....	32
3.6 Extração de RNA dos tecidos das espécies (<i>Bolinopsis vitrea</i> , <i>Olindias sambaquiensis</i> , <i>Nematostella vectensis</i> e <i>Phragmatopoma lapidosa</i>).....	33
3.7 Extração de RNA dos tecidos de <i>Echinaster brasiliensis</i>	34
3.8 Obtenção de cDNA.....	34
3.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de isoformas dos genes.....	35
3.10 Seqüenciamento dos fragmentos amplificados.....	35

3.11 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Real Time para identificação de padrões de expressão gênica.....	36
3.12 Análise Radiométrica da Atividade da Triptofano Hidroxilase (TPH)..	39
3.13 Análise radiométrica da atividade da aril-alquil-N-acetiltransferase (AANAT).....	40
3.14 Análise radiométrica da atividade da Hidroxindole-O-metiltransferase (HIOMT).....	41
3.15 Análise de expressão global por experimento de Microarranjo.....	42
3.16 Análise Estatística.....	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Bolinopsis vitrea.....	44
4.1.1 <i>Dosagens de melatonina.....</i>	44
4.1.2 <i>Averiguação da presença dos genes da via de produção de melatonina e genes relógio.....</i>	45
4.1.3 <i>Averiguação da atividade da enzima Triptofano hidroxilase.....</i>	47
4.1.4 <i>Averiguação da atividade da enzima aril-aquil-N-acetiltransferase.....</i>	47
4.1.5 <i>Experimentos com adição de melatonina aos aquários.....</i>	49
4.2 Lychnorhiza lucerna.....	49
4.2.1 <i>Dosagens de melatonina.....</i>	49
4.3 Olindias sambaquiensis.....	50
4.3.1 <i>Dosagens de melatonina.....</i>	50
4.3.2 <i>Averiguação da presença dos genes relacionados à via de produção de melatonina e genes relógio</i>	53
4.3.3 <i>Análise da expressão de enzimas da via de produção de melatonina e genes relógio</i>	54
4.3.4 <i>Averiguação da atividade da enzima Triptofano hidroxilase.....</i>	58
4.3.5 <i>Averiguação da atividade da enzima aril-aquil-N-acetiltransferase.....</i>	59
4.3.6 <i>Experimentos com adição de melatonina aos aquários.....</i>	60
4.4 Nematostella vectensis.....	61

4.4.1 Dosagens de melatonina.....	61
4.4.2 Averiguação da presença dos genes relacionados à via de produção de melatonina e genes relógio.....	62
4.4.3 Análise da expressão de enzimas da via de produção de melatonina e genes relógio	63
4.4.4 Averiguação da atividade das enzimas Triptofano hidroxilase e Hidroxindole-O-metiltransferase.....	67
4.4.5 Análise da expressão gênica global por microarranjo.....	68
4.5 Phragmatopoma lapidosa.....	71
4.5.1 Averiguação da presença de melatonina.....	71
4.5.2 Averiguação da presença de isoformas dos genes da via de produção de melatonina e genes relógio	74
4.5.3 Averiguação da atividade da enzima Triptofano hidroxilase.....	75
4.5.4 Averiguação da atividade da enzima Aril-aquil-N-acetiltransferase.....	76
4.6 Echinaster brasiliensis.....	77
4.6.1 Averiguação da presença de melatonina.....	77
4.6.2 Averiguação da presença de isoformas dos genes da via de produção de melatonina e genes relógio	80
4.6.3 Análise da expressão de enzimas da via de produção de melatonina e genes relógio	82
4.6.4 Averiguação da atividade da enzima Triptofano hidroxilase.....	87
4.6.5 Ensaio da atividade da Aril-aquil-N-acetiltransferase	87
4.6.6 Experimentos com adição de melatonina aos aquários.....	88
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS.....	99
ANEXO 1: Quadro comparativo das espécies.....	105
ANEXO 2: Alinhamentos.....	107
ANEXO 3: Resultados do Microarranjo em <i>Nematostella vectensis</i>.....	117

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A glândula pineal dos vertebrados

A glândula pineal está presente em todos os vertebrados conhecidos e se origina embriologicamente de uma evaginação do III ventrículo e, no cérebro adulto, constitui, junto com os núcleos habenulares, a maior parte do epitálamo (1). Nos vertebrados não mamíferos (lampreias, peixes cartilaginosos, peixes ósseos, anfíbios, “répteis” e aves), o órgão pineal é diretamente fotossensível. Na evolução dos mamíferos, porém, a glândula pineal perdeu sua capacidade fotorreceptiva, passando a estar sob o controle do sistema nervoso central, notadamente do simpático cervical. Assim, as influências do ciclo de iluminação ambiental passam a se dar de forma indireta, através de projeções da retina para estruturas diencefálicas e destas para os neurônios pré-ganglionares, que podem, por meio da inervação simpática periférica, atingir a glândula pineal (2, 3).

Desta maneira, verificamos que a evolução do principal tipo celular da glândula pineal, o pinealócito, corrobora o monofiletismo dos mamíferos por apresentar nestes características únicas, como a perda gradual da função receptora de luz e um aumento da função neuroendócrina, presente em todos os vertebrados (4, 5).

A função hormonal da glândula é regulada pelo ciclo dia-noite. Na maior parte das espécies, a glândula secreta seu hormônio, a melatonina, no período de escuro, ou seja, pela noite. Desta maneira, os reflexos da variação da duração da noite, tão característicos das estações do ano, serão diretamente percebidos no metabolismo da

glândula. Deste modo, as noites mais longas do inverno irão ocasionar uma produção de melatonina por um maior período, o oposto ocorrendo nas noites mais curtas do verão (6, 7). Portanto, é evidente a função fisiológica da glândula pineal: sinalizar para o meio interno, pela presença e ausência diária da melatonina na circulação e nos diversos líquidos corpóreos, se é noite ou dia no meio exterior e, por meio da duração do seu perfil secretório noturno, qual é a estação do ano. Em função desse papel de temporizador do meio interno (diário, sazonal e ontogenético), espera-se, portanto, que a glândula pineal, principalmente por meio da secreção da melatonina, esteja envolvida na regulação das mais diversas funções fundamentais para a sobrevivência do indivíduo e da espécie: regulação endócrina em geral e metabólica e reprodutiva, em particular; regulação do ciclo atividade-reposo, em particular do sono e da vigília; regulação do sistema imunológico, regulação cardiovascular, entre outras (7). Existem outros locais de síntese da melatonina, tais como retina(8) e sistema gastrointestinal(9), entretanto acredita-se que a melatonina sintetizada nestas regiões tem maior importância na modulação de fenômenos locais(10).

1.2 A molécula de melatonina

A melatonina (*N*-acetil 5-metoxitriptamina) é uma indolamina. O processo de produção de melatonina se inicia quando o aminoácido triptofano é transformado em 5-hidroxi triptofano (5HTP), pela enzima triptofano 5-hidroxilase (TPH). Após isso, uma descarboxilase de ácidos aromáticos inespecífica transforma o 5HTP em serotonina. A serotonina secretada tem um papel na própria pineal, atuando através dos seus

receptores do tipo 5-HT₂, e aumentando a síntese de melatonina induzida por noradrenalina (11, 12). A serotonina é N-acetilada pela aril-alkil-N-acetiltransferase (AANAT) produzindo N-acetil serotonina (NAS). A AANAT é a enzima passo-limitante da síntese de melatonina, pois ela apresenta um aumento de 100 vezes na sua atividade no período noturno, deslocando o metabolismo da serotonina para a produção de N-acetilserotonina e, em seguida, melatonina (13). A AANAT é uma enzima instável e a manutenção de sua atividade depende de muitos fatores. Quando cessa a estimulação simpática, ou se administram antagonistas adrenérgicos, ou ainda submete-se um animal a uma fotoestimulação no meio da noite, a atividade da AANAT cai com uma meia vida de aproximadamente 3 minutos (14-16). O passo final da produção ocorre quando a enzima hidroxindole-O-metiltransferase (HIOMT) converte a NAS em melatonina¹⁰. A atividade da HIOMT no período noturno apresenta um aumento de 1,5 vez, enquanto o seu RNAm tem um aumento de 2 vezes (17, 18).

As características químicas da molécula da melatonina, pela presença dos grupamentos metoxi no carbono 5, e do grupamento acil ligado ao nitrogênio do grupo amina, são de anfifilicidade. Ou seja, ela tem a propriedade de difundir-se, com igual capacidade tanto em meios hidrofílicos quanto lipofílicos⁷. Dessa forma, a melatonina, uma vez produzida na glândula pineal, é imediatamente secretada e pode ser encontrada em todos os compartimentos do organismo. Além disso, os carbonos 2 e 3 do anel pirrólico, possuem uma alta capacidade de doar elétrons. Isso confere a melatonina uma alta capacidade antioxidante (19).

1.3 Melatonina em não vertebrados

Apesar de existirem muitas referências da importância da melatonina em diversos aspectos da biologia dos vertebrados, somente desde meados dos 1980s esta importância expandiu-se também para os grupos taxonômicos não-vertebrados. Em 1984, Vivien-Roels e colaboradores publicaram o primeiro estudo da presença de melatonina no gafanhoto *Locusta migratoria*, ou mais especificamente caracterizaram indol em seus olhos compostos (20). O trabalho também mostrava que a melatonina presente nos olhos compostos apresentava um ritmo circadiano de concentração, com um pico de produção durante a noite, o que levou-os a sugerir uma via de transdução de sinal luminoso presente em todos os organismos vivos.

Após estes trabalhos, seguiram-se outros de diferentes autores, mostrando a presença do hormônio nos mais diversos grupos, inclusive algumas vezes propondo possíveis funções. No protista dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum*, por exemplo, foram verificados picos noturnos do indol, e a melatonina seria capaz de induzir encistamento em resposta a um decréscimo da temperatura, independentemente do fotoperíodo (21, 22). A presença de melatonina com um pico noturno foi verificada também em outros Protistas, como *Euglena* (23), algas verdes (24), vermes platelmintos (25) e insetos como a mosca *Drosophila melanogaster* (26). Os estudos com *Drosophila* aprofundaram-se na investigação das vias de biossíntese do hormônio. Hintermann e colaboradores (27, 28) foram os primeiros a purificar e clonar uma sequência da AANAT neste inseto, a qual se mostrou capaz de acetilar dopamina, triptamina e o precursor imediato da melatonina, a serotonina. Esses mesmos trabalhos

mostram experimentos de hibridização *in situ* do RNA mensageiro da AANAT, revelando a transcrição do gene no cérebro, no cordão ventral e no intestino. Entretanto, o grupo não foi capaz de verificar uma correlação entre a oscilação circadiana da melatonina e a expressão do gene da AANAT. Em 2000, uma segunda forma da AANAT, que compartilha 30% de identidade com a AANAT previamente descrita e com expressão circadiana semelhante, foi clonada (29).

Em alguns organismos, a melatonina está presente em vários tecidos, porém com diferentes padrões do pico de produção. No ensífero *Gryllus bimaculatus* há picos noturnos no cérebro e nos olhos compostos, e picos diurnos nos apêndices locomotores, antenas e órgão ovopositor (30). No molusco gastrópode *Aplysia californica* a situação é semelhante, com pico noturno de melatonina no cérebro e pico diurno no olho (31), estrutura na qual a melatonina parece ter um papel fotoprotetor (22).

Outro caso interessante é o do camarão *Macrobrachium rosenbergii*. Esta espécie apresenta melatonina em seu corpo e o indol mostrou-se capaz de antagonizar a ação do hormônio concentrador de pigmentos (32) – a melatonina em grande concentração escurece o tegumento do crustáceo, e em baixa concentração clareia (33). Contudo, a característica mais marcante da melatonina nesta espécie é o dimorfismo sexual estudado por Withachumnarnkul e colaboradores (34). Em outra espécie de camarão, *Penaeus monodon*, a diferença entre machos e fêmeas não foi constatada, mas foi encontrado que altas concentrações da enzima AANAT contrastam com baixas concentrações de melatonina, provavelmente devido ao baixo nível da enzima hidroxindole-O-metiltransferase (35).

A melatonina possui ainda relações com a ecologia de determinados grupos. Por exemplo, o verme nematódeo *Caenorhabditis elegans* alimenta-se

predominantemente de bactérias, notadamente *Escherichia coli*. Observou-se sincronia nos picos de melatonina de *C. elegans* e suas *E. coli* predadas, o que deixa a questão se o nematódeo é capaz de sintetizar sua melatonina ou a obtém da alimentação (36). Da mesma maneira, talvez as bactérias *Escherichia coli* presentes no intestino humano possam contribuir, ao menos em parte, para a melatonina presente neste órgão, em uma relação de simbiose.

A melatonina foi até mesmo verificada em plantas angiospermas, tendo sido demonstrada em folhas, flores e sementes (33), sem uma função específica ainda conhecida. Em *Chenopodium rubrum*, a melatonina parece influenciar a floração (37, 38). Alguns pesquisadores acreditam que o indol possa agir em sinergia com o hormônio vegetal auxina, promovendo o crescimento (39).

A presença da molécula em grupos tão distantes filogeneticamente indica um surgimento evolutivo precoce, com funções diferentes nos organismos que a possuem. Porém, as características anfifílicas da melatonina e sua capacidade de neutralizar radicais livres devem ter sido suas primeiras funções na escala evolutiva (33). Porém, embora possua ampla abrangência taxonômica, estudos abordando o uso da melatonina ou as enzimas de sua via de produção como caracteres filogenéticos são escassos. As referências existentes mostram que a sequência da AANAT presente em não-vertebrados é homóloga àquela presente em vertebrados, ou em cordados como o anfioxo (Cephalochordata). O gene da AANAT, presente em anfioxos, algas verdes, fungos e bactérias, é similar e sem íntrons (40). Coon e Klein defendem a hipótese de transferência horizontal do gene da AANAT de uma bactéria ancestral para fungos, algas verdes e cordados, de maneira independente. Os autores, contudo, ignoraram sequências da AANAT descritas para metazoários invertebrados, deixando um hiato na

história evolutiva da sequência da enzima, no seu uso e suas relações com a ecologia e biologia dos mais diferentes, e abundantes, táxons de invertebrados.

1.4 Clock genes

Nos vertebrados, uma das funções primordiais da melatonina é de um mecanismo de saída do relógio biológico localizado nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) no cérebro. O relógio do núcleo supraquiasmático é mantido pelas oscilações na transcrição de um conjunto de genes relógio (*clock*, *bmal*, *cry1* e *cry 2*, *period*, entre outros) que controlam a produção de melatonina ao sinalizarem para a glândula pineal (41, 42). A melatonina liberada pela glândula pineal, por sua vez, sinaliza as mudanças no fotoperíodo para o resto do corpo. Além disso, a melatonina pode agir como um mecanismo de entrada no relógio, sinalizando para o núcleo supraquiasmático (43).

Ainda que os genes relógio tenham sido estudados mais profundamente em invertebrados, seu mecanismo foi descrito pela primeira vez em um invertebrado, na mosca das frutas *Drosophila melanogaster* (44). Nesta espécie, a transcrição do gene *period* era induzida quando o nível da proteína PERIOD estava reduzido. Tratava-se do primeiro dado a indicar uma alça de retroalimentação. Dez anos após a identificação do gene *period*, um segundo gene, *timeless*, foi descoberto, com um mecanismo de retroalimentação negativo (45, 46). O gene *frequency* (*frq*) foi identificado no fungo *Neurospora* (47), mostrando-se como um mecanismo central do relógio nesta espécie, no qual a proteína FREQUENCY negativamente regulava sua transcrição, resultando em oscilações circadianas da quantidade do transcrito de *frq*. Estas descobertas estabeleceram o conceito que oscilações nas funções celulares eram resultados de um

processo de transcrição/tradução rítmica de um conjunto de genes relógio, que duraria aproximadamente 24 horas, e que este mecanismo estaria presente em diversas espécies.

Atualmente, já é de conhecimento comum que vários dos genes relógio são compartilhados entre animais distantes na árvore filogenética, com estudos mostrando sua similaridade entre os dois grupos do clado bilateria (deuterostômios e protostômios) (48). O modelo clássico do relógio nestes sistemas é baseado em duas alças regulatórias: uma positiva, dirigida pela expressão dos fatores de transcrição bHLH-PAS CLOCK e CYCLE (*Bmal/Mop3* em mamíferos) que se heterodimerizam para regular genes alvos que possuam sequências com o motivo E-box, e uma alça negativa, onde proteínas que têm sua expressão aumentada por CLOCK e CYCLE (como *period* e *criptocromos*) levam a supressão de sua própria transcrição (48, 49). As pesquisas têm mostrado que, enquanto a alça positiva é bem conservada, há variações na alça negativa em várias espécies, notadamente em insetos (50, 51). Até recentemente, não era claro se genes similares possuíam funções similares em animais que houvessem divergido muito cedo na evolução. Alguns genes relógio foram identificados no cnidário Anthozoa *Nematostella vectensis*, incluindo um gene similar a *timeout* (um parálogo de *timeless*), três criptocromos e ortólogos dos genes *clock* e *cycle* que seriam capazes de se heterodimerizar (52). Apesar destas similaridades, não há trabalhos que mostrem se há outros mecanismos do relógio circadiano conservados nos invertebrados, particularmente o papel de hormônios capazes de reiniciar o relógio.

1.5 Justificativa

Apesar da existência de diversos trabalhos sobre a presença de melatonina em invertebrados, há diversas frentes de pesquisa ainda não abordadas neste campo de estudo. Grupos de fundamental importância, seja pela sua riqueza de espécies, seja pelo seu posicionamento filogenético, tais como Cnidaria, Ctenophora, Annelida, e Echinodermata, nunca foram investigados quanto à presença deste hormônio.

Baseado neste cenário, investigamos inicialmente a presença de melatonina nestes grupos, a partir de estudos em *Bolinopsis vitrea* (Ctenophora), *Olindias sambaquiensis*, *Lychnorhiza lucerna*. e *Nematostella vectensis* (Cnidaria), *Phragmatopoma lapidosa*. (Annelida) e *Echinaster brasiliensis* (Echinodermata). Após a confirmação da existência de melatonina, realizamos uma análise comparada do padrão de produção da melatonina nas espécies estudadas, identificando a existência de ritmos circadianos e eventuais influências na biologia e ecologia dos animais.

A sistematização e aprofundamento da investigação permitiu responder a diversas questões relacionadas à evolução e ecologia dos grupos. Uma vez caracterizada, passamos a uma análise molecular da melatonina, buscando identificar as vias de produção envolvidas em sua síntese nas diferentes espécies por meio de ensaios de RT-PCR. Esta busca foi realizada em torno das três enzimas clássicas da via de produção já descrita (triptofano 5-hidroxilase, aril-alquil-*N*-acetiltransferase, hidroxindole-*O*-metiltransferase), com o uso de reação em cadeia da polimerase de baixa estrigência com uso de ‘primers’ baseados nas sequências mais conservadas

entre as espécies em que já foram descritos. Também foi realizado o sequenciamento dos amplificados encontrados.

Este projeto foi pioneiro em áreas pouco investigadas. Por um lado, em níveis evolutivos menos inclusivos, padrões comportamentais consagrados de algumas espécies, como a migração vertical de cnidários hidrozoários, finalmente contaram com uma explicação fisiológica. Por outro lado, como exemplo em níveis supraespecíficos, a identificação das enzimas e o sequenciamento dos genes da via de produção de melatonina e seu uso em inferências filogenéticas, como uma fonte de dados inexplorada, é uma nova frente que se abre na investigação da evolução em nível de grandes grupos. Por fim, associando-se as duas frentes (ecologia/biologia e filogenia), a análise filogenética de sequências das enzimas da via de produção de melatonina em diversos invertebrados poderá possibilitar uma compreensão sobre o sinal filogenético destas moléculas e sua expressão relacionada aos diferentes hábitos comportamentais das espécies.

2 OBJETIVOS

2.1. Analisar a presença e padrão de produção de melatonina em invertebrados

Dentro deste objetivo investigamos a presença do hormônio melatonina nos invertebrados analisados, além dos eventuais padrões circadianos relacionados a sua síntese.

2.2. Analisar a presença de enzimas da via de produção clássica de melatonina

Verificamos a presença de enzimas responsáveis pela via clássica de produção de melatonina (triptofano 5-hidroxilase, aril-alquil-*N*-acetiltransferase, hidroxindole-O-metiltransferase), e sua eventual expressão circadiana. Também realizamos ensaios de atividade enzimática para a triptofano 5-hidroxilase e aril-alquil-*N*-acetiltransferase.

2.3. Analisar a presença de genes relógio

Verificamos a presença de genes relógio (*clock*, *bmal*, *cry1*, *cry 2*, *per1* e *per2*) comumente descritos para invertebrados, mas ainda não analisados nas espécies de estudo.

2.4. Estudar o papel da melatonina na sincronização dos genes relógio

Diante dos dados da literatura sobre padrões de transcrição dos genes relógio em *Nematostella vectensis*, e da facilidade de manter estes animais em cultura no laboratório, realizamos experimentos para verificar a capacidade da melatonina de agir sincronizando os genes relógio nas espécies deste estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

As espécies a serem estudadas foram selecionadas com base nos critérios de disponibilidade, abundância, posição taxonômica, particularidades de sua biologia, posicionamento filogenético de seu grande grupo, não haver confirmação da existência de melatonina. Todas as espécies estudadas são marinhas, o que está relacionado à grande diversidade de filos exclusivamente marinhos ou com a maioria das espécies neste ambiente. As coletas foram realizadas no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, localizado em São Sebastião. As espécies selecionadas foram as seguintes.

- *Bolinopsis vitrea* (Ctenophora, Lobata, Bolinopsidae) – espécie holoplanctônica, filtradora de micro- e mesozooplâncton. O filo Ctenophora foi sugerido como clado basal de Triploblastia (i.e., animais com três tecidos embrionários, incluindo a mesoderme), embora sua posição, mesmo em relação aos Cnidaria, seja ainda incerta.
- *Olindias sambaquiensis* (Cnidaria, Hydrozoa, Olindiasidae) – espécie meroplanctônica com estágio de póipo pouco desenvolvido, tem biologia complexa, apresentando migração vertical, aparentemente circadiana. O filo Cnidaria é um dos grupos mais basais de Metazoa, porém ainda com posicionamento incerto, em especial em relação aos Ctenophora. Faz parte dos Eumetazoa por apresentar gastrulação e tecidos verdadeiros.

- *Lychnorhiza lucerna* (Cnidaria, Scyphozoa, Lychnorhizidae) Espécie de biologia complexa, tem estágio de pólipó com 4 tentáculos e estágio de medusa, o qual foi usado neste estudo. As medusas podem alcançar 45 centímetros de diâmetro.
- *Nematostella vectensis* (Cnidaria, Anthozoa, Edwardsiidae) – espécie que apresenta apenas pólipó bentônico e sedentário na maior parte do tempo, movendo-se ocasionalmente. É um modelo para estudos de evolução e desenvolvimento, facilmente mantido em aquário.
- *Phragmatopoma lapidosa* (Annelida, Polychaeta, Sabelariidae) – espécie bentônica e tubícola que forma bancos na zona entremarés com larva trocófora. Constitui um representante dos Annelida, incluídos no clado Lophotrochozoa, um dos dois grandes grupos incluídos em Protostomia (em contraposição à Ecdysozoa).
- *Echinaster brasiliensis* (Echinodermata, Asteroidea, Echinasteridae) espécie com adulto bentônico e larva planctônica. Os Echinodermata constituem um dos grupos incluídos em Deuterostomia.

3.2 Coleta de material e experimentos *in vivo*

As coletas foram realizadas no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, em São Sebastião (23°49'39.52"S 45°26'26.15"O). As estrelas-do-mar *Echinaster brasiliensis* foram coletadas por meio de mergulho livre. Espécimes das medusas *Olindias sambaquiensis* e *Lychnorhiza lucerna* foram coletadas por meio de arrasto de fundo. Espécimes do ctenóforo *Bolinopsis vitrea* foram coletados com uma rede de plâncton em arrastos oblíquos desde o fundo até a superfície. O anelídeo

Phragmatopoma lapidosa foram coletados retirando-se uma parcela de seus tubos e bancos do entremarés.

Após a coleta, os animais foram transferidos para aquários com água marinha captada diretamente do canal de São Sebastião, sendo uma espécie por aquário. Os experimentos foram iniciados às 17 horas, com pontos de coleta de tecido de 3 em 3 horas. Em cada ponto eram usados entre quatro e seis animais de cada espécie por experimento (exata quantidade em cada experimento está contida nos gráficos nos resultados). Das medusas *Olindias sambaquiensis* e *Lychnorhiza lucerna* foram retirados pedaços do bordo da umbrela, por conterem mais tecido e menos água. Da estrela-do-mar foi cortado um braço e retirados pedaços do ceco gonadal. Para o ctenóforo *Bolinopsis vitrea*, dada as pequenas dimensões dos animais coletados, os espécimes foram seccionados finamente e separamos frações para cada um dos experimentos. Para *Phragmatopoma lapidosa*, os indivíduos foram retirados de seus tubos com a ajuda de uma pinça e separados para os experimentos subsequentes. Para esta espécie, usamos indivíduos inteiros nas dosagens, sendo selecionados apenas indivíduos que ainda estivessem vivos (se movendo ativamente) e com tamanho entre 1 e 1,5 centímetro. Em todas as espécies, as amostras eram guardadas em tubos de criogenia e congelados em nitrogênio líquido. Os aquários foram mantidos em uma sala com janelas amplas, e a iluminação desta foi mantida apenas com luz solar. Os momentos de nascer e pôr do Sol foram devidamente anotados em cada experimento. Para experimentos com animais em livre curso, estes eram mantidos em escuro constante por 24 horas antes dos sacrifícios.

Os exemplares de *Nematostella vectensis* foram tomados de culturas no laboratório de Mark Martindale (Universidade do Havaí), onde os experimentos foram realizados. Eles foram mantidos em um regime de luz 12:12, ligando as luzes às 7 horas, com iluminação

por lâmpadas fluorescentes de espectro completo, com intensidade luminosa de aproximadamente 3600 lux. Os animais eram mantidos em recipientes de vidro com 1/3 de água salgada em uma incubadora à 17 °C. A água era trocada todos os dias e os animais eram alimentados com larvas de artêmias frescas a cada dois dias. Para os experimentos, os animais eram sacrificados a cada 4 horas, durante 24 horas. Os animais inteiros eram macerados e porções eram separadas para cada experimento. Para cada ponto, em cada bloco experimental, foram usados 5 animais. Um segundo grupo de indivíduos foi mantido em escuro constante por 20 dias sob as mesmas condições. Para um segundo experimento, mantivemos animais em escuro constante por 24h, 48h e 96h após a estada em regime de claro-escuro, com as mesmas condições.

Para os tratamentos de melatonina em *Nematostella*, animais previamente mantidos em escuro constante por 5 dias receberam melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) nos 15 dias subsequentes de escuro constante. Melatonina foi administrada na concentração de 1 µM, no momento da transição subjetiva para a noite (ZT = 12). Após 12 horas de incubação, os animais eram “lavados” em uma primeira cuba com água salgada e depois passados para novas cubas.

Para os experimentos de avaliação comportamental, realizado com *Bolinopsis vitrea*, *Olindias sambaquiensis* e *Echinaster brasiliensis*, os exemplares eram mantidos em aquários isolados, e após 24 horas de aclimação, recebiam uma adição de melatonina na água (1 µM) às 15 horas. Sua atividade foi monitorada pelas 24 horas seguintes, comparando com exemplares sem adição de melatonina porém com as mesmas condições ambientais.

3.3 Aferição da presença de melatonina por HPLC

Para este experimento, os animais selecionados foram sacrificados em oito pontos igualmente distribuídos ao longo do dia (sacrifícios de 3 em 3 horas). Um pedaço de tecido foi retirado e a melatonina dosada por cromatografia líquida de alta precisão acoplada a um detector eletroquímico.

O sistema cromatográfico é composto por bomba Dionex Ultimate 3000RS operada isocraticamente, coluna Acclaim C18 (partícula esférica de 2,2 μm , 2,1 x100 mm) e detector eletroquímico ESA Coulochem III operado em modo DC e controlado por um programa computacional através de interface (Chromeleon) programável.

Os tecidos foram sonicados (Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, N.Y., USA), individualmente, com 120 μl de ácido perclórico 0,1 M acrescido de 0,02% de EDTA e 0,02% de metabissulfito de sódio, por 10 segundos, sendo posteriormente centrifugados por 2 minutos a 12000 rpm, a 5° C (Eppendorf 5804R Centrifuge, Brinkman Instruments Inc., Westburg, N.Y., USA).

O sistema cromatográfico foi operado isocraticamente com fluxo de 120 $\mu\text{l}/\text{min}$ e potencial de oxidação de +700 mV e célula guarda em +750 mv, usando-se, como fase móvel, uma solução contendo tampão acetato de sódio 0,1M, ácido cítrico 0,1M, EDTA 0,15mM e metanol 32%. O sistema de cromatografia foi operado no modo isocrático, com sensibilidade de 10 nanoamperes.

O estoque dos padrões de melatonina (1 mM) foi preparado em uma solução de HCL 0,1M acrescido de EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02%, em alíquotas em tubos de microcentrífuga e mantidos em congelador a -85 ° C. A alíquota foi diluída em

uma solução de perclórico 0,1M, EDTA 0,02% e metabissulfito de sódio 0,02%, para obtenção das concentrações necessárias à análise.

Curvas de calibração com 5 concentrações diferentes e conhecidas (0,435 a 6,96 ng/20ul) foram utilizadas para a quantificação da melatonina presente nas amostras. As curvas de calibração foram obtidas através do programa Chromeleon v6.8 pela relação das concentrações de cada padrão com as áreas dos picos correspondentes dos cromatogramas. A identificação da melatonina das amostras se deu pela comparação do seu tempo de retenção com aqueles dos padrões conhecidos.

3.4 Aferição da presença de melatonina por Elisa (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Para as amostras de *Nematostella vectensis*, os níveis de melatonina foram medidos usando-se de um kit Elisa (IBL International, Hamburg, Germany). O ensaio é baseado no princípio de competição. Tecidos de *N. vectensis* tiveram a melatonina extraída em 0,6ml de ácido perclórico 0,6%. Para normalizar os ensaios, 2 µl de cada amostra foram usados para medição de proteína total, usando um espectrofotômetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) e medindo a absorbância da luz à 280 nm. As amostras foram à seguir passadas através de uma coluna de purificação de carbono 18, extraídas com metanol, evaporadas e reconstituídas com água. Cada amostra foi adicionada à um poço da placa que continha o anticorpo para melatonina. Uma quantidade desconhecida do antígeno (melatonina) presente na amostra e uma concentração conhecida de antígeno marcado competiam pelos sítios dos anticorpos nos poços. Após uma incubação de duas horas, os poços eram lavados para parar a reação.

O substrato da reação era adicionado e a concentração de antígeno medida como a proporção inversa da densidade ótica medida no fotômetro. Padrões de melatonina de concentração conhecida foram usados para construir uma curva de calibração com a qual foi calculada a quantidade do hormônio presente nas amostras. A sensibilidade do ensaio era ao redor de 3 pg/ml. A especificidade do kit é próxima à 100% (manual do kit). Um teste adicionando concentrações conhecidas de melatonina à amostras de *N. vectensis* nos mostrou que a taxa de recuperação era de aproximadamente 85%.

3.5 Extração de DNA dos tecidos das espécies

Para a extração do DNA total dos tecidos, foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, o tecido foi disperso com um homogeneizador até completa solubilização. Em seguida a mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, acrescida de 0,2 ml de clorofórmio (LABSYNTH, São Paulo, Brasil) por ml de Trizol para desproteinização. A fase intermediária foi separada por centrifugação (12.000 rpm, 15 min, 4° C, - centrifuga Eppendorf 5804R Centrifuge, Hamburg, Germany) e o DNA contido foi precipitado com álcool etílico (LABSYNTH, São Paulo, Brasil), centrifugado (2000g, 5 min, 4° C), lavado com citrato de sódio, lavado novamente com etanol 75% e dissolvido com hidróxido de sódio 8 mM. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop 2000c Thermoscientific Instruments Inc/USA) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

3.6 Extração de RNA dos tecidos das espécies (*Bolinopsis vitrea*, *Olindias sambaquiensis*, *Nematostella vectensis* e *Phragmatopoma lapidosa*)

Para a extração do RNA total dos tecidos, foram usadas duas técnicas diferentes. Para as espécies *Bolinopsis vitrea*, *Olindias sambaquiensis*, *Nematostella vectensis* e *Phragmatopoma lapidosa*, utilizamos o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, o tecido foi disperso com um homogeneizador Polytron PTMR2100 (Kinematica AG, Switzerland) até a completa solubilização. Em seguida a mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, acrescida de 0,2 ml de clorofórmio (LABSYNTH, São Paulo, Brasil) para desproteinização. O sobrenadante foi separado por centrifugação (12.000 rpm, 15 minutos, 4 °C, - centrifuga Eppendorf 5804R Centrifuge, Hamburg, Germany) e o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com isopropanol (LABSYNTH, São Paulo, Brasil), centrifugado (12000 rpm 25 minutos, 4 °C), lavado com etanol 75% (LABSYNTH, São Paulo, Brasil) e dissolvido com H₂O desionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop 2000c Thermoscientific Instruments Inc/USA) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Após quantificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,4%, para análise da integridade do RNA. Somente os RNAs íntegros foram utilizados nos experimentos subsequentes.

3.7 Extração de RNA dos tecidos de *Echinaster brasiliensis*

Para as amostras de *Echinaster brasiliensis*, utilizamos um kit específico para extração de RNA (RNAqueous 4PCR – Ambion, Texas, EUA), segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, o tecido foi disperso na solução de lise com a ajuda de um homogeneizador, acrescentou-se igual volume de uma solução de etanol 64%, passou-se a amostra por uma coluna de separação, lavou-se com uma sequência de tampões e finalmente eluiu-se o RNA com uma solução específica também contida no kit. A quantificação e a qualificação do RNA foi feita da mesma maneira que com as amostras das outras espécies.

3.8 Obtenção de cDNA

Uma amostra de 5 µg de cada RNA (2 µg no caso das amostras que possuíam menor concentração de RNA) foi submetida à reação de transcrição reversa com ‘primers’ aleatórios. Para tal foi adicionado a cada amostra tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), DTT (10 mM), mistura de dNTPs (0,5mM cada), ‘primers’ aleatórios (150ng), inibidor de RNase (40U) e a enzima SuperScript III (200U; Invitrogen, EUA), em volume final de 20µl. As reações foram incubadas no termociclador MyGene™ Series Gradient (LongGene®, China) por 5 minutos à 70 °C, seguida de 10 minutos à 25 °C, com aquecimento para 42 °C por 75 minutos e 70 °C por 15 minutos para desnaturação da enzima. As amostras de cDNA foram armazenadas à -20 °C. Antes das reações de PCR, as amostras foram requantificadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000c Thermoscientific Instruments

Inc/USA) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm e diluídas para uma concentração de 300 ng/ μ l de DNA.

3.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de isoformas dos genes

A partir dos DNAs obtidos foram realizadas as reações em cadeia da polimerase para amplificação de cada gene. Os ensaios de PCR foram realizados no termociclador MyGene™ Series Gradient (LongGene®, China) usando GoTaq® DNA Polymerase (Promega, USA) e 10 pmol de cada primer em 100 μ L de master mix. As reações de PCR foram feitas em duplicata. Para comparar os fragmentos, as reações foram acompanhadas de controles positivos (cDNA obtido da glândula pineal de ratos) para comparar o tamanho dos amplificadores. O cDNA que foi utilizado faz parte de um conjunto de amostras de cDNA já existente no laboratório, que foi obtida durante o projeto “O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: interações hormonais, ações centrais e periféricas: (papel, obesidade, diabetes e envelhecimento)”, certificado 79/04/CEEA, datado de 16.12.04. O controle negativo foi feito com água ao invés de material genético.

3.10 Seqüenciamento dos fragmentos amplificados

Os produtos de PCR dos genes de interesse foram separados em gel de agarose 2%. A purificação foi feita a partir das bandas de gel que continham os amplificadores e

que foram depositadas na parte superior de uma ponteira de 200 µl com filtro. A ponteira foi colocada no interior de um tubo de 1,5 ml e os tubos foram então centrifugados a 6000 rpm por 6 minutos (centrífuga Eppendorf 5417R Centrifuge, Hamburg, Germany). O purificado ficava depositado no tubo. O DNA purificado foi submetido à marcação fluorescente por PCR, em reações independentes para as fitas ‘forward’ e ‘reverse’, utilizando o reagente Big Dye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Após precipitação, os produtos dessas reações foram enviados ao Serviço de Sequenciamento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, onde ambas fitas de DNA de cada amostra foram sequenciadas utilizando um equipamento ABI PRISM® 3100 (Hitachi). As sequências foram alinhadas e usadas para construir o amplificado utilizando o programa ChromasPro (Technelysium Pty, USA).

3.11 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Real Time para identificação de padrões de expressão gênica

A análise semi-quantitativa da expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR em tempo real utilizando o aparelho 7500 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando 2 µL de cDNA (600 ng) previamente sintetizado, adicionado à mistura da reação contendo 12,5 µL de *Power SYBR*® Green (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), 8,5 µL de água MilliQ e 400 nM dos primers específicos para cada gene.

Os parâmetros de amplificação foram os seguintes: 1) etapa inicial de ativação da enzima a 50 °C por 1 minuto e 95 °C por 10 minutos, 2) 40 ciclos que incluíram a

desnaturação a 95 °C por 15 segundos; o anelamento dos ‘primers’ em temperatura específica para cada ‘primer’ por 30 segundos e a extensão a 72 °C por 30 segundos 3) 1 ciclo para análise do ‘*melting*’ que consistiu em 95 °C por 15 segundos; 60 °C por 1 minuto e posterior aumento gradativo da temperatura para 95 °C para obtenção das curvas de ‘*melting*’.

O limiar para desconsideração do ruído na fluorescência de cada amostra foi determinado automaticamente pelo software 7500 versão 2.0.3 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), que também determinou as curvas de ‘*melting*’. As amostras foram comparadas a partir dos valores de delta CT.

Os primers para as reações de real time foram desenhados para cada uma das espécies, a partir dos sequenciamentos obtidos. Foram eles:

Para *Olindias sambaquiensis*: :

- RPL37a fwd: CCA GCG ACC ATG AAA GCA TT
- RPL37a reverse: CCT AAC CTG CCT TCC AAA CTT G
- TPH fwd: CGTCTCCTCTGAAGCTCCAATG
- TPH reverse: CAGACACCTGCCACGAACTCT
- Cry1 fwd: CAG CAA ACT AAC CCA CTA AAG CAA
- Cry1 reverse: TGC GTC CCT TCC TGA CTT G
- Cry 2 fwd: GCT ACT GAG GAT CTT TTG GAC ATG T
- Cry2 reverse: ATC TGT GTG TAG AAT GAA CGG TTC TT
- Bmal fwd: CATA CGGTGCAAGTATACAAGACACC
- Bmal reverse: GCTTCCCAAGAGGCTCATGAT
- Clock fwd: TCCATTTTCTCAAGAGGGTAGCC
- Clock reverse: ACGCTAACAACCAACATCTTGGC
- Per 2 fwd: CCTCCACCCTTGACCACTGT
- Per 2 reverse: CTGGCTTCGTTACTTTATGAAAGGT

Para *Echinaster brasilienses*

- RPL37a fwd: TGCTGCCGGCACTATGG
- RPL37a reverse: ATGTATCTAACCAATCGGCTTGTG
- TPH fwd: GTTAGCCTTTCGTTGGAGACGG
- TPH reverse: GCTACTTCACAACCAGTTCCACC
- AANAT fwd: TCGATGAACGTGACTGGCTTT
- AANAT reverse: ATCGTTTGCCCTGGAAGGAT
- Cry1 fwd: ACCCACTAAAGCAAGGAAGAAGCT
- Cry 1 reverse: CTGTGCGTCCTCTTCCTGACT
- Cry 2 fwd: TGCCTAGTGCTGGAGGAAGGT
- Cry 2 reverse: TTAAAACCTTCTCCCTATTCTGACG
- Bmal fwd: TCTCCAGGAGGCAAGAAGATTC
- Bmal reverse: CCTGAGCTCTGCCCTGGTAGT
- Clock fwd: GTCTCCGTCTGTGCCTGCTG
- Clock reverse: GTCACCGCAGTCAATGCAGA
- Per 2A fwd: CAAGCCACTCAGTGCAATGG
- Per 2A reverse: TTCCCTGAACATTATCCCGTTAA
- Per 2B fwd: GACGTCTGGCCATGTTTAAGAAG
- Per 2B reverse: TGCTTTCCCCGAGACACTATG

Para *Nematostella vectensis*:

- Clock fwd: TCGGCTCCCCGAGTCTAGCG
- Clock reverse: GCATCGCGGCGAACCCAGTA
- Cycle fwd: TGTCTCGTGGCCGTCGGAAG
- Cycle reverse: GGCGACATCCGGTCGGGAAAA
- Timeout fwd: GTGCCTTCGCAGGTGGGACG
- Timeout reverse: GGCTTTCGTTGTCCGACTCGCT
- Cry1a fwd: GCGGCATGGCAAGACAGGCT
- Cry1a reverse: CACCCAATGGACTGCCGGGC

- Cry1b fwd:TCGGACCGGACCATGCTGACA-
- Cry1b reverse:TCGTCGCAAAGCTTCGGGCT
- Cry2 fwd:AGCTCGCCGTAAAAGGGCGG
- Cry2 reverse:ATATAAGCGCCTGCACCCGCG
- TPH fwd:AAAAACTCGCCACGCTCTACTGG
- TPH reverse:CGGTCAAGCAATACTGTAACTCCCC
- HIOMT fwd:CGAGATTTGATTGCGTTCACCG
- HIOMT reverse:AAAACAGCCAGTTCCTCCTCCAAG
- Proteína ribossomal P0 fwd:GGCTTCGTCTTCACCAAGGAGGAG-
- Proteína ribossomal P0 reverse:CCAGCAGGGACAAACACATCAATA

3.12 Análise Radiométrica da Atividade da Triptofano Hidroxilase (TPH)

O método baseia-se na quantificação do [^3H]-5-hidroxitriptofano, que é o produto da reação catalisada pela enzima Triptofano Hidroxilase (TPH) e que tem como precursor o [^3H] triptofano.

Cada amostra foi sonicada (Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, NY, USA) em 0,2% de Triton X-100 em tampão fosfato de sódio (2 mM, pH 7, 40). A cada amostra foram acrescentados: HEPES (0,5M, pH 7), catalase (1 mg/ml), triptofano (2 mM), dietiltreitol (1 M), $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2$ (1 mM), 6-MPH4 (20 mM), de modo a obter-se, respectivamente, as seguintes concentrações finais: 50 mM, 100 mg/ml, 50 μM , 5 mM, 10 μM , 500 μM ; e 1 μl de [^3H]triptofano (1 mCi/ml – previamente seco com nitrogênio). O material foi incubado em banho úmido (Microprocessed Controlled Water Baths, Polyscience, Niles, Illinois, USA) a 37 C por 10 minutos. Em seguida, foi acrescentada uma solução de carvão ativado (7,5% em 1 M

HCl, 500 µl) para interromper a reação. As amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5804R Centrifuge, Hamburg, Germany) por 2 minutos a 6797 g (2 vezes). Em seguida, 200 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos de cintilação, e foi acrescentado o líquido de cintilação (Optiphase HiSafe 3, PerkinElmer, Inc, Massachusetts, USA) para amostras aquosas para contagem da radioatividade em contador β (LS 6500 Liquid Scintillation Counter, Beckman Coulter Inc., CA, USA).

3.13 Análise radiométrica da atividade da aril-alquil-N-acetiltransferase (AANAT)

O método baseia-se na quantificação da N-[^3H] acetiltriptamina que é o produto da reação da [^3H] acetil-coenzima A ([^3H] acetil CoA) e da triptamina, como uma indicação da atividade da enzima AANAT. O produto marcado é extraído em clorofórmio e medida a radioatividade (53, 54). Para isso, foram adicionados aos tubos de microcentrífuga contendo uma amostra, 25 µl de triptamina (40 mM), 25 µl de [^3H] acetilCoA (2 mM) e 50 µl de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH= 6,8), a 4 °C. As amostras foram sonicadas, aplicando-se 1 pulso de 30 segundos, de modo a romper os tecidos. As amostras foram incubadas, em banho seco a 37 °C, por 20 minutos. Em seguida, acrescentou-se 1 ml de clorofórmio saturado com água a cada uma das amostras, e o produto foi extraído agitando-se os tubos durante 1 minuto. Para a separação completa das fases aquosas e lipossolúveis as amostras foram centrifugadas por 40 segundos, a 14000rpm.

A fase aquosa foi removida e acrescentados 200 µl do tampão. Novamente as amostras foram agitadas, centrifugadas e as fases aquosas foram novamente removidas. 500 µl do clorofórmio contendo o produto da reação (^3H -N-acetiltriptamina) foram

transferidos para os tubos de contagem e evaporados até que as amostras ficassem completamente secas. O líquido de cintilação foi, então, acrescentado e a radioatividade medida em contador beta.

3.14 Análise radiométrica da atividade da Hidroxindole-O-metiltransferase (HIOMT)

Os substratos utilizados para a avaliação da atividade da enzima HIOMT foram ^{14}C -S-adenosil-L-metionina e N-acetilserotonina. O produto (^{14}C melatonina) foi extraído em clorofórmio e medida a sua radioatividade (55).

As amostras foram sonicadas separadamente em tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH=7,9, 50 μL) e, em seguida, acrescentados 150 μL de uma solução contendo ^{14}C -S-adenosil-L-metionina (atividade 43,8 mCi) e N-acetilserotonina (1 mM). As amostras foram incubadas em banho seco por 30 minutos a 37 °C. Após 30 minutos as amostras foram mantidas no gelo e acrescentados 200 μL de tampão borato de sódio (12,5 mM, pH=10) e 1 mL de clorofórmio saturado em água, de modo a interromper a reação. Os tubos foram agitados por 15 segundos e centrifugados a 13000 rpm (centrífuga Eppendorf, Mod. 5804R) por 5 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi aspirada e dispensada e novamente acrescentados 200 μL de tampão borato de sódio. Os tubos foram agitados, centrifugados e novamente retirada a fase aquosa. 600 μL do clorofórmio foram transferidos para tubos de contagem e após a total evaporação do clorofórmio, foi acrescentado o líquido de cintilação para amostras não-aquosas (Optiphase Hisafe-PerkinElmer) e contada a radioatividade em contador β (Beckman – LS 6500), incluindo os brancos e totais.

3.15 Análise de expressão global por experimento de Microarranjo

Para este experimento foram feitos 3 grupos experimentais. Um grupo de animais adultos em regime claro-escuro (12:12); um segundo grupo de animais mantidos em escuro constante durante 20 dias (previamente no regime de claro:escuro) e finalmente um terceiro grupo que consistia em animais tratados com melatonina. Neste grupo os animais eram previamente mantidos em escuro constante por 5 dias e a seguir recebiam melatonina 0.1 μ M no momento da transição subjetiva para a noite (ZT = 12). Este tratamento foi feito durante os 15 dias subsequentes, mantendo os animais em escuro constante. Ao final do protocolo destes três grupos, os animais foram sacrificados em 2 pontos do dia (ZT6 e ZT18) e o RNA extraído como previamente descrito. Foram utilizados 3 animais por tratamento, para cada tempo experimental.

Para a realização dos experimentos de microarranjo, 10 μ g de RNA total foram utilizados para síntese de cDNA cadeia dupla usando um kit específico (Superscript III double-stranded cDNA synthesis kit - Invitrogen, EUA). Seguiu-se o protocolo de marcação de uma cor com 1 μ g do cDNA previamente obtido (One color DNA labeling kit - Nimblegen, Islândia). O DNA marcado foi hibridizado em um 'array' para o genoma completo, desenvolvido para o laboratório pela empresa Roche Nimblegen (Islândia). O 'array' foi lido com um *scanner* GenePix Personal 4100a por meio do programa GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e analisado com o programa Nimblescan (Nimblegen). Os níveis de expressão gênica foram normalizados no programa de acordo com referências prévias (56, 57). A comparação dos dados do microarranjo de quanto variava a expressão de cada gene dentro de cada

tratamento para os pontos temporais ZT6 e ZT18 considerou como válidas apenas as alterações maiores que 10 vezes na expressão.

3.16 Análise Estatística

As análises estatísticas, escolhidas de acordo com o desenho experimental, foram realizadas utilizando-se o programa computacional Prism v 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Nos casos em que se fez necessário estudar a ritmicidade diária dos parâmetros fisiológicos, isso era feito, em primeiro lugar, pela aplicação da análise de variância à série temporal considerando como fator o horário do dia. Se essa análise fosse significativa ($p < 0,5$) aplicávamos, a seguir, para a análise dos parâmetros rítmicos, o método do Cosinor. Esse método permite o ajuste de uma curva cossenoidal aos dados utilizando o método dos quadrados mínimos e testa a presença ou não de um ritmo verificando, estatisticamente, avaliando se a amplitude da curva ajustada é diferente ou não de zero. Com a aplicação deste modelo é possível obter, ainda, 3 parâmetros matemáticos da curva ajustada que caracterizam o ritmo estudado: mesor (nível médio de oscilação), amplitude (distância entre o mesor e os pontos de mínimo ou de máximo) e acrofase (instante em que ocorre a amplitude máxima). A comparação desses parâmetros (feita com teste t ou análise de variância, conforme requerido) entre os diferentes grupos experimentais permite detectar eventuais diferenças na ritmicidade provocadas pelos tratamentos.

4 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados por espécie. No Anexo 1 deste exemplar encontra-se um quadro comparativo das espécies.

4.1 *Bolinopsis vitrea*

4.1.1 *Dosagens de melatonina:*

A melatonina pôde ser dosada em todos os pontos, apresentando picos no cromatograma no mesmo tempo de retenção que os padrões de melatonina. Pelo fato de termos utilizado frações dos animais, os dados foram normalizados pela quantificação posterior da proteína total das amostras.

Como pode ser visto na Figura 1, a melatonina apresentou um padrão de produção com diferença entre os pontos, com maior concentração no período entre o fim da tarde e o começo da noite, mas com pontos diferentes um dos outros (Anova de uma via, $p < 0,05$).

Figura 1 - Dosagem de melatonina nos diversos pontos do dia em *Bolinopsis vitrea*.

Cada ponto é uma média de cinco indivíduos. Sol nascendo às 6:15 da manhã e se pondo às 17:48 da tarde.

Houve ritmo diário (24h) para a produção de melatonina (Figura 2, teste de cosinor), com pico de produção às 18:05 da noite, ou seja, logo após o escurecer, e a produção média foi de 27,2 picogramas de melatonina por miligrama de proteína total.

Figura 2 - Curva ajustada ao perfil diário de melatonina em *Bolinopsis vitrea*.

Gráfico obtido após aplicação do método do cosinor. A linha horizontal representa o mesor (nível médio de produção do hormônio), e a vertical com seta, a acrofase (horário do pico de produção do hormônio) e a amplitude. Cada ponto do gráfico é uma média de cinco indivíduos.

4.1.2 *Averiguação da presença dos genes da via de produção de melatonina e genes relógio*

A averiguação da presença de isoformas dos genes das enzimas da via de produção de melatonina e genes relógio resultou na amplificação do gene constitutivo RPL37a, das enzimas da via de produção de melatonina Triptofano Hidroxilase (TPH) e

Aril-aquil-N-acetiltransferase (AANAT) e os genes relógio *Cry1*, *Clock* e *Per1*. Os seis genes puderam ser sequenciados. Porém, o gene para a terceira enzima da via de produção de melatonina, a Hidroxi-indol-oxi-metil-transferase, não apresentou uma isoforma, mesmo variando a concentração do magnésio e com temperaturas ainda mais baixas de ligação.

O gene do RPL37a apresentou 95% de bases em comum com o mesmo gene descrito para *Rattus norvegicus*, porém com muitos gaps. Houve menor similaridade em relação à *Mus musculus*, porém menos gaps, além de similaridades com outras espécies.

O gene para a Triptofano Hidroxilase apresentou similaridade com as sequências descritas de *Rattus morvergicus*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, entre outras. Como no caso de RPL37a, houve muitos gaps na sequência, similar ao observado para *Cry1*.

A sequência para o gene da AANAT apresentou similaridades com mamíferos (*Rattus morvergicus*, *Mus musculus*), peixes (*Solea senegalensis*) e, inclusive, uma sequência não identificada de algas verdes *Volvox carteri*.

O caso do gene *clock* apresentou similaridade com genes diferentes do esperado, como a NADH desidrogenase da bactéria *Saccharopolyspora erythraea*, o receptor para fator de crescimento de fibroblastos de humanos, o gene para via de biossíntese de canamicina na bactéria *Streptomyces kanamyceticu*, além de sequências ainda não identificadas em diversas espécies. Situação similar ocorreu com o gene *Per2*, com similaridade apenas com sequências ainda não identificadas de diversas espécies.

Todos estes alinhamentos constam no anexo 2 deste exemplar.

4.1.3 Averiguação da atividade da enzima Triptofano hidroxilase

Houve atividade da Triptofano Hidroxilase em todas as amostras, concentrada nos pontos entre 14h e 2h da manhã (Figura 3), o que coincide com a dosagem de melatonina (coeficiente r de Pearson = 0,8190; $p < 0,05$). Os pontos foram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,01$; Anova de uma via).

Figura 3- Atividade da enzima Triptofano hidroxilase em *Bolinopsis vitrea*.

Cada ponto representa a média de três indivíduos.

4.1.4 Averiguação da atividade da enzima aril-aquil-N-acetiltransferase

Há atividade da AANAT com um ritmo correlacionado ao da produção da melatonina (r de Pearson = 0,9489; $p < 0,05$), com pico no ponto das 20 horas (Figura 4). Há diferença entre os pontos ao longo do dia ($p < 0,01$; Anova de uma via).

Figura 4-Atividade da enzima AANAT nos exemplares de *Bolinopsis vitrea*.

Cada ponto representa a média de três indivíduos.

4.1.5 Experimentos com adição de melatonina aos aquários

Dos sete animais tratados com melatonina, cinco apresentaram atividade intensificada entre 30 e 45 minutos após a adição do hormônio, nadando ativamente em direção a superfície dos tanques, enquanto os animais não tratados (n= 5) permaneceram na base de seus respectivos aquários.

4.2 *Lychnorhiza lucerna*

4.2.1 Dosagens de melatonina

Os resultados do perfil de melatonina corrigido pela quantidade de proteína (Figura 5) mostram um pico diurno de melatonina no ponto das 14 horas. Os pontos eram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$; teste Anova de uma via), mas o teste cosinor não foi aplicável a estes dados.

Figura 5- Dosagem de melatonina em *Lychnorhiza lucerna*.

Cada ponto é uma média de seis indivíduos. Sol nascendo às 6:15 da manhã e se pondo às 5:48 da tarde.

Não foi possível extrair DNA ou RNA das amostras de *Lychnorhiza lucerna* e, portanto, não há dados sobre a presença das enzimas da via de produção de melatonina ou genes relógio. Como não conseguimos coletar espécimes de *L. lucerna* novamente, não foi possível realizar experimentos de escuro constante ou de atividade enzimática.

4.3 *Olindias sambaquiensis*

4.3.1 *Dosagens de melatonina*

Os cromatogramas de *O. sambaquiensis* apresentaram diversos picos, mas a região próxima ao tempo de retenção do hormônio estava relativamente limpa e com picos no mesmo tempo que o controle.

Os exemplares de *Olindias sambaquiensis* apresentaram um pico de produção de melatonina no ponto das 23 horas, e concentrações mais reduzidas nos pontos do dia (Figura 6). Os pontos eram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$; Anova de uma via), e a oscilação da produção do hormônio apresentou um ritmo de 24 horas (cosinor), com pico de produção (acrofase) às 23 horas e 34 minutos (Figura 7).

Figura 6- Dosagem de melatonina em *Olindias sambaquiensis*.

Cada ponto é uma média de seis indivíduos. Sol nascendo às 6:15 da manhã e se pondo às 17:48 da tarde.

Figura 7- Curva ajustada do perfil de melatonina em *O. sambaquensis*.

Curva obtida após aplicação do método do cosinor. Cada ponto do gráfico é uma média de seis indivíduos.

Os experimentos com os animais em livre curso resultam em uma curva (Figura 8) que mostra um pico de produção próximo ao observado para os animais em regime de luz convencional, porém com um valor máximo de produção aparentemente reduzido. Os pontos eram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$; Anova de uma via), e a oscilação da produção do hormônio apresentou um ritmo de 24 horas (cosinor), mesmo sem a presença da luz, confirmando que se trata da manifestação de um ritmo endógeno (Figura 9). A análise das variáveis do cosinor demonstrou que, de fato, o nível médio de produção do hormônio (mesor) está significativamente reduzido nos animais mantidos em escuro constante, bem como a amplitude do pico. O horário do pico de produção de melatonina também é estatisticamente diferente entre os grupos (teste T), ainda que essa diferença seja pequena (Tabela 1).

Figura 8- Dosagem de melatonina em *Olindias sambaquiensis*.

Dosagem realizada com animais em regime de escuro constante. Cada ponto é uma média de seis indivíduos.

Figura 9- Curva ajustada do perfil diário de produção de melatonina em *Olindias sambaquiensis*.

Curva obtida com animais em regime de escuro constante, após aplicação do método do cosinor. Cada ponto do gráfico é uma média de 6 indivíduos.

Tabela 1- Parâmetros do teste cosinor com relação a quantidade de melatonina em *Olindias sambaquiensis*.

Parâmetro	Acrofase		Mesor		Amplitude	
	LD	DD	LD	DD	LD	DD
<i>Melatonina</i>	23,58±0,31	22,36±1,1*	342,93±25,3	73,08±17,1*	156,43±34,4	85,86±25,6*

A acrofase representa o horário de pico de produção do hormônio, o mesor a oscilação média e a amplitude a diferença entre o mesor e o ponto de máximo. “LD” = “claro e escuro” (ou seja, regime de luz convencional); “DD” = “escuro-escuro” (ou seja, regime de luz de escuro constante); * = estatisticamente diferente do LD com valor de $p < 0.05$ – teste t.

4.3.2 *Averiguação da presença dos genes relacionados à via de produção de melatonina e genes relógio.*

Obtivemos fragmentos para o gene constitutivo RPL37a, para a enzima da via de produção de melatonina Triptofano Hidroxilase (TPH) e para os genes relógio *Cry1*, *Cry2*, *Per 1*, *Per 2* *Clock* e *Bmal* (ver Anexo 2 para alinhamentos afins).

A sequência do gene constitutivo RPL37a apresentou similaridade com diversas sequências do GenBank, mas em todos os casos cobrindo poucas bases. Houve similaridade alta com uma proteína hipotética descrita no fungo *Fusarium fujikuroi* e com sequências de RNA mensageiro sem função conhecida do molusco *Crepidula fornicata*, em duas regiões diferentes.

A sequência obtida para a Triptofano Hidroxilase apresentou similaridade com outra TPH de *Rattus norvegicus*, mas com vários *gaps*. Também houve similaridade com *gaps* em relação a sequências de outros mamíferos, como javali (*Sus scrofa*), sagui (*Callithrix jacchus*) e *Homo sapiens*, aves (*Taeniopygia guttata*), anfíbios (*Xenopus tropicalis*) e peixes (*Takifugu rubripes*). O mesmo foi observado para o gene *Cry1*.

O gene *Cry2* apresentou similaridade com sequências ainda não descritas de peixes (*Danio rerio*) e fungos (*Trichophyton verrucosum*, *Penicillium marneffei*).

A sequência de *Bmal* pareou com diversos pontos do genoma da bactéria *Salmonella enterica* e suas “subespécies”. Também houve o pareamento com regiões de *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus*, ainda não identificadas. A única similaridade com outra sequência de *Bmal* foi com o hamster sírio (*Mesocricetus auratus*). O mesmo ocorreu para a isoforma encontrada para *Clock*, com similaridade para diversas sequências sem função conhecida, de vários táxons como “répteis” (*Anolis carolinensis*), artrópodes (*Pediculus humanus*), peixes (*Danio rerio*), entre outros.

A sequência de *Per2* seguiu o padrão de *Bmal* e *Clock*, com similaridade com sequências ainda não identificadas em táxons diversos, viz. insetos (*Bombus insularis*), nemátode (*Caenorhabditis remanei*) e algas (*Phaeodactylum tricornutum*).

4.3.3 Análise da expressão de enzimas da via de produção de melatonina e genes relógio.

Após a determinação das sequências das isoformas dos genes *RPL37a*, *TPH*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal*, *Clock* e *Per2* e desenho de seus ‘primers’ específicos, obtivemos os resultados de ensaios de expressão gênica por PCR real time (Figura 10). O gene *TPH* mostrou uma tendência a maior expressão no pontos do período noturno, especialmente 23 e 2h, coincidindo com o padrão observado na produção de melatonina.

Figura 10- Expressão de triptofano-hidroxilase (TPH) em *Olindias sambaquiensis*

Amostras da umbrela, curva normalizada pelo gene constitutivo RPL37a . Cada ponto representa a média de quatro amostras.

A isoforma do gene relógio *Cry1* apresentou uma curva de expressão com aumento pronunciado no início da noite, seguida por queda (Figura 11). Os pontos foram diferentes entre si ($p < 0,01$, Anova de uma via). Um padrão similar foi observado para o gene *Cry2*, exceto pelo fato que o aumento na transcrição inicia-se no fim do período claro e é sustentado por algumas horas (Figura 12). Igualmente, os pontos foram diferentes entre si ($p < 0,05$, Anova de uma via).

Figura 11- Expressão do gene relógio Cry1 em *Olindias sambaquiensis*

Amostras da umbrela, curva normalizada pelo gene constitutivo RPL37a . Cada ponto representa a média de quatro amostras.

Figura 12- Expressão do gene relógio Cry2 em *Olindias sambaquiensis*

Amostras da umbrela, curva normalizada pelo gene constitutivo RPL37a . Cada ponto representa a média de quatro amostras.

A isoforma do gene Clock apresentou uma variação bem marcada ao longo do dia, com expressão pronunciada nos pontos do período claro (Figura 13). O teste Anova de uma via confirmou a variação na expressão, com valor de p menor que 0,01.

Figura 13-Expressão do gene relógio Clock em *Olindias sambaquiensis*.

Amostras da umbrela, curva normalizada pelo gene constitutivo RPL37a . Cada ponto representa a média de quatro amostras.

O gene *Bmal* mostrou expressão marcada no entardecer, com pico no ponto das 17 horas (Figura 14) e variação entre as amostras ($p < 0,05$, Anova de uma via).

Figura 14- Expressão do gene relógio Bmal em *Olindias sambaquiensis*

Amostras da umbrela, curva normalizada pelo gene constitutivo RPL37a . Cada ponto representa a média de quatro amostras.

A isoforma do gene *Per2* tem tendência a maior expressão no fim do dia, por volta das 17 horas (Figura 15), com variação na expressão ($p < 0,01$, Anova de uma via).

Figura 15- Expressão do gene relógio Per 2 em *Olindias sambaquiensis*

Amostras da umbrela, curva normalizada pelo gene constitutivo RPL37a. Cada ponto representa a média de quatro amostras.

4.3.4 Averiguação da atividade da enzima Triptofano hidroxilase

Houve atividade da Triptofano Hidroxilase em todas as amostras, concentrada nos pontos entre 17h e 2h da manhã (Figura 16). Esse dado coincide com a dosagem de melatonina (coeficiente r de Pearson=0,7990; $p < 0,05$), e os pontos eram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,01$, Anova de uma via).

Figura 16- Atividade da enzima Triptofano hidroxilase em *Olindias sambaquiensis*.

Amostras da umbrela. Cada ponto representa a média de quatro amostras.

4.3.5 Averiguação da atividade da enzima aril-aquil-N-acetiltransferase

O experimento mostrou a existência de atividade da AANAT com ritmo que se correlaciona ao da produção da melatonina (coeficiente r de Pearson=0,9296; $p<0,05$) (Figura 17), e diferença entre os pontos ao longo do dia ($p<0,01$, Anova de uma via).

Figura 17- Atividade da aril-aquil-N-acetiltransferase em *Olindias sabaquiensis*

Amostras da umbrela. Cada ponto representa a média de quatro amostras.

4.3.6 Experimentos com adição de melatonina aos aquários

Todos os 15 exemplares tratados com melatonina apresentaram atividade intensificada entre 15 e 30 minutos após a adição da solução à água, em comparação aos 12 animais não tratados. Enquanto os animais sem tratamento na água permaneceram com uma movimentação restrita na base de seus respectivos aquários, os que receberam o indol tiveram atividade motora intensificada, migrando para próximo da superfície da água.

4.4 *Nematostella vectensis*

4.4.1 Dosagens de melatonina

Para as dosagens em *Nematostella vectensis*, homogenizamos os organismos inteiros e procedemos à extração de melatonina. Os exemplares de *Nematostella vectensis* apresentaram um pico de produção de melatonina no período claro (Figura 18, em cinza), com os pontos estatisticamente diferentes entre si ($P < 0,05$, Anova de uma via), e indicação de oscilação da produção do hormônio em um ritmo de 24 horas (teste cosinor), com pico de produção (acrofase) às 11 horas e 40 minutos (Figura 19).

Figura 18- Dosagem de melatonina em *Nematostella vectensis*.

Cada ponto é uma média de cinco indivíduos. “LD” mostra os dados dos animais mantidos em regime de luz 12 horas de claro e 12 horas de escuro, e “DD” mostra os animais mantidos em escuro constante durante 20 dias antes do experimento. Tempo dividido em ZTs.

Figura 19- Curva ajustada do perfil de melatonina em *Nematostella vectensis*

Curva obtida após aplicação do método do cosinor. Cada ponto do gráfico é uma média de cinco indivíduos.

A curva obtida para os experimentos de livre curso (Figura 18, em preto) mostra um padrão de produção próximo ao observado para os animais em regime de luz convencional, porém com redução na maior parte dos valores (teste Anova de duas vias). Havia variação entre os pontos ($P < 0,05$, Anova de uma via), mas a melatonina não apresentava mais um ritmo circadiano (teste cosinor).

4.4.2 Averiguação da presença dos genes relacionados à via de produção de melatonina e genes relógio.

Na literatura já estavam descritas isoformas dos genes relógio para *N. vectensis* (52). Diante disso, nossa busca se concentrou em torno das enzimas da via de produção de melatonina. Usando a biblioteca de EST para *Nematostella* (Joint Genome Institute *Nematostella* genome browser, <http://genome.jgi-pdf.org/Nemvel>),

identificamos candidatos para a primeira e última enzima da via de produção de melatonina - Triptofano Hidroxilase (TPH - número de acesso XM_001623795.1) e hidroxindole-O-metiltransferase (HIOMT - número de acesso XM_001627179.1). Ambos os genes apresentaram alta similaridade com sequências previamente descritas em outras espécies.

4.4.3 *Análise da expressão de enzimas da via de produção de melatonina e genes relógio.*

A expressão do gene TPH varia pouco nos exemplares de *N. vectensis* em regime de claro-escuro, com aumento moderado antes da transição para o período escuro (Figura 20a, em cinza), correlacionado com o padrão de melatonina. Os animais em escuro constante, porém, mostraram um padrão diferente, com expressão maior nos ZTs 12 e 16 (Figura 20a, em preto). Há diferença entre os regimes de luz em quatro pontos (ZTs 0, 12, 16 e 20) (Anova de duas vias), com padrão de expressão significativamente diferente ($F=161,35$, $p \text{ value} < 0,001$). A correlação positiva entre a expressão de TPH e a quantidade de melatonina para animais em claro escuro ($r=0,8714$, $p \text{ value} = 0,0053$, teste de correlação de Person) mas não para aqueles em escuro constante ($r \text{ value} = 0,2857$, $p \text{ value} = 0,2673$).

A expressão do gene para a HIOMT aumenta no início do período claro e reduz nos pontos do escuro (Figura 20b, em cinza). Este padrão se correlaciona com o padrão observado de produção de melatonina se considerado um adiantamento de 3 horas (correlação de Person $r \text{ value} = 0.6963$, $p = 0.042$). Para os animais em escuro constante a

expressão do gene também é quase constante, com um pico no ZT 12 (Figure 20b, em preto).

Figura 20- Expressão relativa de RNAm em *Nematostella vectensis*.

Curvas para a) Triptofano-hidroxilase (TPH) e b) hidroxindole-O-metiltransferase (HIOMT) em indivíduos de *Nematostella vectensis* mantidos em regime de claro-escuro -LD (12:12h) ou escuro constante - DD, normalizado pelo gene para a proteína ribossomal P0. Cada ponto representa cinco indivíduos. * estatisticamente de claro-escuro com $p < 0,05$.

Para os genes relógio, a expressão de *NvClock* mostra-se aumentada nos pontos correspondentes ao dia, ritmo este perdido nos animais em escuro constante, e o tratamento de melatonina não foi capaz de reverter este quadro (Figura 21a). Os pontos eram estatisticamente diferentes entre si apenas nos animais em claro escuro ($p=0,0046$, Anova de uma via; cosinor igualmente válido para os mesmos animais, Figura 22a).

O gene *NvCycle* não teve seu ritmo substancialmente alterado pela mudança no regime de luz ou pelo tratamento com melatonina (Figura 21b). Os pontos foram diferentes entre si em todos os tratamentos ($p<0.0001$ para claro-escuro; $p=0.0003$ para escuro constante, $p=0.0021$ para tratados com melatonina; Anova de uma via) e houve ritmo circadiano mantido (cosinor; Figura 22b).

Os genes da alça negativa foram mais afetados pelo regime de escuro constante. Para *NvTimeout* (Figura 21c), *NvCry1a* (Figura 21d), *NvCry1b* (Figura 21 e), *NvCry2* (Figura 21f) tiveram pontos estatisticamente diferentes entre si ($p<0,05$, Anova de uma via) para os animais em regime de claro escuro e para aqueles em escuro constante com tratamento de melatonina, mas não para os em escuro constante sem tratamento. O escuro constante aboliu o ritmo circadiano de transcrição destes genes para os animais em regime de claro escuro, mas o tratamento com melatonina foi capaz de restabelece-lo para os animais em escuro constante com tratamento de melatonina (cosinor; Figura 22 c-f).

Figura 21- Expressão de Clock Genes em *Nematostella vectensis*

Expressão relativa do RNA mensageiro para (a) *Clock*, (b) *Cycle*, (c) *Timeout*, (d) *Cry1a*, (e) *Cry1b* e (f) *Cry2* em indivíduos de *Nematostella vectensis* mantidos em regime de claro-escuro-LD (12:12h), escuro constante-DD ou escuro constante com suplementação de melatonina (1 μ M), normalizado pelo gene para a proteína ribossômica P0. Cada ponto representa cinco indivíduos. * $p < 0,05$.

Figura 22- Expressão de Clock Genes em *Nematostella vectensis*

Curvas cosinor da expressão relativa do RNA mensageiro para (a) *Clock*, (b) *Cycle*, (c) *Timeout*, (d) *Cry1a*, (e) *Cry1b* e (f) *Cry2* em indivíduos de *Nematostella vectensis* mantidos em regime de claro-escuro-LD (12:12h), escuro constante-DD ou escuro constante com suplementação de melatonina (1 μ M), normalizado pelo gene para a proteína ribossômica P0. Cada ponto representa cinco indivíduos.

4.4.4 Averiguação da atividade das enzimas Triptofano hidroxilase e Hidroxindole-O-metiltransferase

A validação das medições de melatonina em *Nematostella vectensis* com ensaios de atividade para as enzimas Triptofano Hidroxilase e Hidroxindole-O-metiltransferase demonstraram atividades das enzimas para as amostras dos ZTs 8 e 20. Valores maiores de atividade foram observados no ZT8, o mesmo ponto do pico de produção de melatonina. A atividade da Triptofano Hidroxilase foi de $78,935 \pm 7.32$ picomoles/200mg de proteína por hora no ZT8 e $58,964 \pm 4.73$ picomoles/200mg de proteína por hora no ZT20 (média de 5 amostras para ambos os ensaios). A Hidroxindole-O-metiltransferase teve atividade medida de $91,705 \pm 0.795$ picomoles/200mg de proteína por hora no ZT8 e $43,505 \pm 0.987$ picomoles/200mg de proteína por hora no ZT20 (média de 4 amostras para ambos os ensaios).

4.4.5 Análise da expressão gênica global por microarranjo

A comparação dos dados do microarranjo de quanto variava a expressão de cada gene dentro de cada tratamento para os pontos temporais ZT6 e ZT18 considerou como válidas apenas as alterações maiores que 10 vezes na expressão. Considerando 24020 pontos do microarranjo, 287 genes apresentaram uma alteração na expressão de ao menos 10 vezes na comparação do ZT18 ao ZT6 para os animais em claro-escuro; nos animais em escuro constante foram 582 genes; e nos animais em escuro constante com suplementação de melatonina foram 3619 genes. Tais análises foram baseadas em 3 diferentes lâminas de ‘array’ para cada tratamento para cada ponto temporal. Todas

possíveis combinações entre os regimes de claro-escuro, escuro constante e escuro constante com melatonina foram realizadas na busca dos genes que variavam nos animais (Figura 23), e genes foram identificados por Blast da sequência de cada gene (anexo 3).

Na análise quantitativa, 35 dos 24020 genes sempre variam entre os dois pontos analisados, independente do tratamento. A identificação destes 35 genes demonstrou genes fundamentais ao funcionamento normal das células, tais como o genes para uma proteína constituinte do ribossomo 60s, para uma subunidade de uma ATPase, para proteínas extracelulares de membrana, entre outras.

Dos 287 genes que oscilam em claro-escuro, 184 perdem esta variação quando os animais são mantidos em escuro constante, mas a recuperam se melatonina é adicionada à água dos animais. Neste grupo foram identificados genes cujas proteínas atuam na manutenção da fisiologia normal da célula, tais como Histona H2B, proteína p62 do aparato mitótico e proteína 5 de morte celular programada. Mas também aparecem genes para proteínas que agem como enzimas, modulando diversos eventos na resposta celular e, desta maneira, na fisiologia do animal como um todo. Dentre elas destacamos: Proteína 14-3-3; Sub-unidade reguladora da proteína fosfatase 1; Proteína da família da O-metiltransferase; Proteína chaperonina (heat shock) 10; Proteína supressora 1 do fator de sinalização RAS. Ainda entre os genes que apresentaram variação em regime claro-escuro e escuro constante com adição de melatonina, encontravam-se também alguns para componentes da cadeia de respiração celular, como Succinato desidrogenase; Glutathione transferase; NADH desidrogenase; Citocromo C oxidase.

57 genes somente variam quando da presença da oscilação claro-escuro, perdendo tal ritmo em escuro constante, e não o recuperando com a suplementação com melatonina. Dentre estes destacam-se genes para enzimas envolvidas em sinalização celular, como proteínas similar à Ras e à enzima N-acetiltransferase 5, e componentes para ciclo celular, tais como proteína especificadora da morte celular 2 e ciclina B3.

Dos 287 genes que variam quando os animais estão em claro-escuro, 12 mantêm tal oscilação se os animais são passados para o regime de escuro constante, mas o tratamento com melatonina abole esta variação na expressão. Dentre estes estão genes para a proteína cálcio-calmodulina dependente de cinase IV e o precursor da Ficolina 2.

Figura 23- Dados oriundos do experimento de Microarranjo

Conjunto de genes que variaram ao menos 10 vezes ao longo dos dois pontos analisados no experimento de microarranjo, nos animais em claro-escuro, escuro constante ou escuro constante com suplementação de melatonina (0.1 μ M).

4.5 *Phragmatopoma lapidosa*

4.5.1 *Averiguação da presença de melatonina*

A dosagem de melatonina mostrou a presença do hormônio em todos os pontos do dia analisados, com um pico de produção no início da manhã, no ponto das oito horas (Figura 24). Os pontos eram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,001$, Anova de uma via) e esta variação entre os pontos obedecia um ritmo de 24 horas (cosinor, Figura 25).

Figura 24- Dosagem de melatonina em *Phragmatopoma lapidosa*.

Cada ponto é uma média de seis indivíduos. Sol nascendo às 6:15 da manhã e se pondo às 17:48 da tarde.

Figura 25- Curva ajustada de melatonina em *Phragmatopoma lapidosa*

Curva obtida após aplicação do método do cosinor. Cada ponto do gráfico é uma média de seis indivíduos. Sol nascendo às 6:15 da manhã e se pondo às 17:48 da tarde.

Experimentos com animais em livre curso mostraram a presença de melatonina em todos os pontos de sacrifício, mas com um pico aparente no ponto das 11 horas da manhã e baixas concentrações à partir das 17 horas (Figura 26). Novamente os pontos eram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,005$, Anova de uma via) e seguiam a um ritmo de 24 horas (cosinor, $p < 0,005$), e ficou evidente a diferença de horário do pico de produção de melatonina, que ficou em 10 horas e 22 minutos (Figura 27). Contudo, a curva dos animais em escuro constante foi similar a dos animais em regime de iluminação natural, indicando que a melatonina seria mesmo a manifestação do relógio endógeno.

Figura 26- Dosagem de melatonina em *Phragmatopoma lapidosa*

Cada ponto é uma média de seis indivíduos. Animais em livre curso (escuro constante).

Figura 27- Curva ajustada de melatonina em *Phragmatopoma lapidosa*

Animais em regime de escuro constante, após aplicação do método do cosinor. Cada ponto do gráfico é uma média de seis indivíduos.

Houve uma diferença estatística entre os momentos de pico de produção de melatonina em relação aos animais em regime normal de luz e escuro constante (cosinor, Tabela 2). O valor médio de produção de melatonina (mesor) e a amplitude de produção também foram significativamente menores nos animais sobre escuro constante.

Tabela 2- Parâmetros do teste cosinor com relação a quantidade de melatonina em *Phragmatopoma lapidosa*.

Parâmetro	Acrofase		Mesor		Amplitude	
	LD	DD	LD	DD	LD	DD
<i>Melatonina</i>	7,26±1,0	10,2±1,01*	59,7±6,02	23,3±2,18*	31,3±8,9	11,5±3,12*

A acrofase representa o horário de pico de produção do hormônio, o mesor a oscilação média e a amplitude a diferença entre o mesor e o ponto de máximo. “LD” significa “claro e escuro”, ou seja, regime de luz convencional, e “DD” significa “escuro-escuro”, ou seja, regime de luz de escuro constante. *estatisticamente diferente do LD com valor de $p < 0.01$ – teste t.

4.5.2 Averiguação da presença de isoformas dos genes da via de produção de melatonina e genes relógio.

Foram obtidas sequências para o gene constitutivo *RPL37a*, para a enzima da via de produção de melatonina Triptofano Hidroxilase e para os genes relógio *Clock*, *Bmal*, *Cry1* e *Per1* (Anexo 2)

A isoforma do gene *RPL37a* apresentou no blast similaridade com sequências ainda sem produto conhecido de insetos (*Exoneura robust*), bactérias (*Clostridium phytofermentans*, *Alkaliphilus metalliredigens*), protistas (*Schistosoma mansoni*) e mamíferos (*Mus musculus*, *Mustela putorius*), entre outras espécies. Houve similaridade com apenas uma sequência descrita para *RPL37a*, a de cavalos (*Equus caballus*).

A isoforma do gene para a Triptofano Hidroxilase apresentou alta similaridade, com alguns gaps, com a mesma sequência em ratos (*Rattus norvegicus*), hamsters (*Mesocricetus auratus*) e outros vertebrados, além de vermes (*Caenorhabditis elegans*).

A sequência obtida para o gene *Bmal* apresentou similaridade apenas com sequências ainda sem função definida, de diversas espécies. O mesmo foi observado pra *Cry1* e *Per1*.

A isoforma obtida para o gene *Clock* apresentou alta similaridade com a sequência descrita em ratos, mas com alta porcentagem de gaps, o mesmo tendo acontecido para a sequência descrita em camundongos e em outros vertebrados.

Todos estes alinhamentos constam no anexo 2 deste exemplar.

4.5.3 Averiguação da atividade da enzima Triptofano hidroxilase

Houve atividade da Triptofano Hidroxilase apenas nos pontos da noite e das 17h (bastante reduzido neste), sendo o pico de atividade no ponto das 2 horas da manhã (Figura 28). Este padrão difere do observado para a dosagem de melatonina. Os pontos eram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,005$, Anova de uma via).

Figura 28- Atividade da Triptofano hidroxilase em *Phragmatopoma lapidosa*

Cada ponto representa a média de cinco indivíduos.

4.5.4 Averiguação da atividade da enzima Aril-aquil-N-acetiltransferase

Embora não tenhamos conseguido sequenciar uma isoforma para a Aril-aquil-N-acetiltransferase, verificamos a havia atividade desta enzima, a qual esteve ativa em todos os pontos amostrados, com pico aparente na amostra das 23h (Figura 29). Os pontos eram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,005$, Anova de uma via). Novamente, o padrão da atividade discerniu do observado para a produção de melatonina.

Figura 29- Atividade da enzima AANAT em *Phragmatopoma lapidosa*.

Cada ponto representa a média de 3 amostras.

4.6 *Echinaster brasiliensis*

4.6.1 *Averiguação da presença de melatonina*

A dosagem de melatonina mostrou a presença do hormônio, especialmente nos pontos da noite (Figura 30). Os pontos eram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,01$, Anova de uma via), com ritmo relacionado ao período de 24 horas ($p < 0,005$, Cosinor, Figura 31) e pico de produção da melatonina um pouco depois das 21 horas.

O experimentos com os animais em livre curso resultaram em uma curva similar àquela resultante em animais em regime de luz normal, com maior concentração de melatonina nos pontos da noite subjetiva e pico aparentemente próximo as 21 horas (Figura 32). Os pontos eram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$, Anova de uma via), com ritmo de 24 horas ($p < 0,05$, cosinor, Figura 33). A curva dos animais em escuro constante foi similar à dos animais em regime de iluminação natural, indicando que a melatonina seria mesmo a manifestação do relógio endógeno.

Figura 30- Dosagem de melatonina em *Echinaster brasiliensis*.

Cada ponto é uma média de 6 indivíduos. Sol nascendo às 6:15 da manhã e se pondo às 17:48 da tarde.

Figura 31- Curva ajustada da produção de melatonina em *Echinaster brasiliensis*

Curva obtida após aplicação do método do cosinor. Cada ponto do gráfico é uma média de 6 indivíduos.

Figura 32- Dosagem de melatonina em *Echinaster brasilienses*

Animais em regime de escuro constante. Cada ponto é uma média de 6 indivíduos.

Figura 33- Curva ajustada de melatonina em *Echinaster brasiliensis*

Animais em regime de escuro constante, após aplicação do método do cosinor. Cada ponto do gráfico é uma média de 6 indivíduos.

A comparação dos dados obtidos nos animais em regime de luz natural e em escuro constante (Tabela 3) mostrou que o nível médio de produção de melatonina (mesor) é estatisticamente maior nos animais em livre curso em relação àqueles em regime normal de luz (teste T). O pico de produção do hormônio também foi estatisticamente diferente, ainda que em pequena escala.

Tabela 3- Parâmetros do teste cosinor em *Echinaster brasiliensis*

Parâmetro	Acrofase		Mesor		Amplitude	
	LD	DD	LD	DD	LD	DD
<i>Melatonina</i>	21,3±0,82	20,5±0,77*	4,79±0,5	8,09±0,45*	3,2±0,73	2,97±0,66

Dados da produção de melatonina. A acrofase representa o horário de pico de produção do hormônio, o mesor a oscilação média e a amplitude a diferença entre o mesor e o ponto de máximo. “LD” significa “claro e escuro”, ou seja, regime de luz convencional, e “DD” significa “escuro-escuro”, ou seja, regime de luz de escuro constante. * estatisticamente diferente do LD com valor de $p < 0.05$ – teste t.

4.6.2 *Averiguação da presença de isoformas dos genes da via de produção de melatonina e genes relógio*

Foram obtidas isoformas para os genes Triptofano Hidroxilase e Aril-aquil N-acetil-transferase, da via de produção de melatonina; *Cry1*, *Cry2*, *Clock*, *Bmal* e *Per2* dos genes relógio; e do gene ribossomal *RPL37a*.

A isoforma obtida para o gene *RPL37a* apresentou alta similaridade, em diversas regiões, com genes ainda sem função conhecida em outras espécies do filo Echinodermata (e.g., *Patiria miniata*, *Asterina pectinifera*), Mollusca (e.g., *Crepidula fornicata*) e Arthropoda (e.g., *Eulaema nigrita*, *Apis florea*).

A isoforma encontrada para o gene *TPH* apresentou alta similaridade com uma proteína hipotética descrita em fungos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*) e também com sequências de diversos genes que funcionam como fatores de transcrição em mamíferos (*Mus musculus*).

A sequência obtida para a AANAT apresenta similaridade com sequências do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em mamíferos em regiões distintas (*Macaca fascicularis*, *Macaca nemestrina* e *Macaca mulatta*) e com a sequência da NADH desidrogenase em salamandras (*Plethodon caddoensis*), em mais de um ponto do amplificado.

A isoforma encontrada para *Cry1* apresentou uma similaridade muito alta com a sequência descrita para camundongos (*Mus musculus*), ente outros mamíferos (*Canis familiaris*, *Oryctolagus cuniculus*, *Spalax judaei*, *Homo sapiens*, *Bos taurus*).

O alinhamento da isoforma encontrada para o *Cry2* mostrou alta similaridade com uma proteína hipotética em protista (*Trichomonas vaginalis*) e com partes do

genoma de protistas da família tripanossomídeos (*Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*). Caso similar foi observado para o gene *Clock*.

A sequência obtida para o gene *Bmal* apresentou alta similaridade com a sequência descrita para *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*, ainda que com muitos gaps. e em outros mamíferos (*Phodopus sungorus*, *Homo sapiens*, entre outros).

A isoforma de *Per2* apresentou similaridade com sequências descritas para *Per2* em *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*. Uma banda secundária, de maior tamanho, apresentou homologia alta com sequências sem função definida para o cnidário *Acropora millepora*, em camundongos (*Mus musculus*) ratos (*Rattus norvegicus*) e em peixes (*Danio rerio*).

Todos estes alinhamentos constam no anexo 2 deste exemplar.

4.6.3 Análise da expressão de enzimas da via de produção de melatonina e genes relógio

A isoforma encontrada para a enzima Triptofano Hidroxilase apresentou uma expressão maior nos pontos da noite, com um aparente pico no ponto das 17 horas (Figura 34), padrão semelhante ao observado na produção de melatonina, sendo que os pontos eram diferentes entre si ($p < 0,001$, Anova de uma via).

Figura 34- Expressão da enzima Triptofano-hidroxilase em *Echinaster brasiliensis*

Amostras do ceco gonadal de *Echinaster brasiliensis*. Dados normalizados pelo gene constitutivo RPL37a . Cada ponto representa a média de quatro amostras.

Um padrão similar foi observado na expressão da isoforma da AANAT, com expressão baixa durante os pontos do dia, crescente nos pontos da noite, pico as 22 horas (Figura 35). Os pontos eram diferentes entre si ($p < 0,001$, Anova de uma via) e a curva remete à de melatonina (correlação de Pearson, $r = 0,633$; $p < 0,05$).

Figura 35- Expressão da enzima AANAT em *Echinaster brasiliensis*

Amostras do ceco gonadal de *Echinaster brasiliensis*. Dados normalizados pelo gene constitutivo RPL37a . Cada ponto representa a média de quatro amostras.

As isoformas encontradas para os genes *Bmal* e *Clock* apresentaram curvas de expressão semelhantes, com pico ao redor das 22 horas (Figuras 36 e 37). Em ambas, os pontos eram estatisticamente diferentes ($p < 0,001$, Anova de uma via).

Figura 36- Expressão da isoforma do gene relógio *Bmal* em *Echinaster brasilienses*

Amostras do ceco gonadal de *Echinaster brasilienses*. Dados normalizados pelo gene constitutivo RPL37a. Cada ponto representa a média de quatro amostras.

Figura 37- Expressão do gene relógio *Clock* em *Echinaster brasilienses*

Amostras do ceco gonadal de *Echinaster brasilienses*. Dados normalizados pelo gene constitutivo RPL37a. Cada ponto representa a média de quatro amostras.

Os genes *Cry1* e *Cry2* apresentaram um padrão bastante estável, com apenas um pico de expressão no ponto das 2 horas (Figuras 38 e 39). Os pontos eram estatisticamente diferentes para ambos os genes ($p < 0,001$, Anova de uma via).

Figura 38- Expressão do gene relógio *Cry1* em *Echinaster brasilienses*

Amostras do ceco gonadal de *Echinaster brasilienses*. Dados normalizados pelo gene constitutivo RPL37a . Cada ponto representa a média de quatro amostras.

Figura 39- Expressão do gene relógio *Cry2* em *Echinaster brasilienses*

Amostras do ceco gonadal de *Echinaster brasilienses*. Dados normalizados pelo gene constitutivo RPL37a . Cada ponto representa a média de quatro amostras.

As duas isoformas encontradas para o gene *Per2* apresentaram padrão de expressão semelhante, concentrada nos pontos da noite, com pico no ponto das 2 horas da manhã. Enquanto para a primeira isoforma (*Per2A*, Figura 40) a expressão é quase constante durante todo o período, apresentando apenas o pico das 2 horas, na segunda isoforma (*Per2B*, Figura 41), a expressão tem o pico das 2 horas e vai decaindo cada vez mais até o menor ponto as 23 horas. Os pontos eram estatisticamente diferentes ($p < 0,001$, Anova de uma via) para ambos os genes.

Figura 40- Expressão do gene relógio Per 2 em *Echinaster brasilienses*

Amostras do ceco gonadal de *Echinaster brasilienses*. Dados normalizados pelo gene constitutivo RPL37a. Cada ponto representa a média de quatro amostras.

Figura 41- Expressão do gene relógio Per 2 em *Echinaster brasilienses*

Amostras do ceco gonadal de *Echinaster brasilienses*. Dados normalizados pelo gene constitutivo RPL37a . Cada ponto representa a média de quatro amostras.

4.6.4 Averiguação da atividade da enzima Triptofano hidroxilase

Pudemos verificar a existência de atividade da Triptofano Hidroxilase em todas as amostras, mas concentrada nos pontos da noite, especialmente nos pontos de 20, 23 e 2 horas (Figura 42), o que coincide com a dosagem de melatonina. Os pontos eram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,001$, Anova de uma via).

Figura 42- Atividade da enzima TPH em *Echinaster brasiliensis*.

Amostras do ceco gonadal de *Echinaster brasiliensis*. Cada ponto representa a média de quatro amostras.

4.6.5 Ensaio da atividade da aril-aquil-N-acetiltransferase

O experimento mostrou não apenas a existência de atividade da AANAT, como um ritmo próximo ao da produção da melatonina, com pico no ponto das 20 horas (Figura 43), enquanto o do hormônio era às 23 horas. Há diferença entre os pontos ao longo do dia ($p < 0,001$, Anova de uma via).

Figura 43- Atividade da enzima AANAT em *Echinaster brasiliensis*.

Amostras do ceco gonadal de *Echinaster brasiliensis*. Cada ponto representa a média de quatro amostras.

4.6.6 Experimentos com adição de melatonina aos aquários

Todos os 10 exemplares de *Echinaster brasiliensis* tratados com melatonina apresentaram atividade intensificada dos pés ambulacrais entre 15 e 30 minutos após a adição de melatonina à água, em comparação com os 8 animais não tratados. Não foi possível verificar alterações consideráveis com relação ao posicionamento dos indivíduos no aquário.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente estudo foi capaz de mostrar indícios da maquinaria circadiana em filos pouco estudados, demonstrando a presença de melatonina, sua via de produção, possíveis funções e também a presença da maquinaria dos genes relógio. Os resultados obtidos são inéditos na literatura e ajudarão na construção do conhecimento da biologia de tais grupos.

As espécies com as quais aqui trabalhamos, por mais que pareçam carecer de relação entre si, são representantes de filos nos quais nunca havia sido investigada a produção de melatonina, ou careciam de mais estudos. Isso torna nossas dosagens de maior relevância. Algumas das espécies, como *Bolinopsis vitrea*, representante do filo Ctenophora, por si só tem uma fisiologia pouco conhecida, o que torna todos os dados gerados importantes para conhecer mais sobre elas.

As dosagens de melatonina renderam dados com 4 padrões diferentes: picos de produção no início da noite (*Bolinopsis vitrea*), meio da noite (*Olindias sambaquiensis* e *Echinaster brasilienses*), início do dia (*Phragmatopoma lapidosa*) e meio do dia (*Lychnorhiza lucerna* e *Nematostella vectensis*). São padrões muito diversos, porém já observados na literatura.

Picos de melatonina na noite já foram observados em protistas (23), algas verdes (58) e alguns invertebrados (e.g., planárias (25) e insetos como a *Drosophila* (26)), além de vertebrados. Neste caso, a melatonina poderia estar preparando os indivíduos para a atividade ou para o repouso. Nos casos aqui observados, estamos tratando de três animais de filos distintos, mas com hábitos alimentares similares. *Bolinopsis vitrea*, *Olindias sambaquiensis* e *Echinaster brasilienses* são todas espécies carnívoras. Para as duas

primeiras é bastante claro, mesmo quando em aquário, se tratarem de espécies com ritmos de atividade-reposo bem definidos. Durante o dia, elas se encontravam na base do aquário, com movimentos em baixa frequência. Contudo, durante a noite, nadavam ativamente. As coletas destas espécies já indicavam este padrão. Somente fomos capazes de encontrar espécimes de *Bolinopsis vitrea* e *Olindias sambaquiensis* no arrasto de fundo durante o dia, sendo que à noite as espécies se encontravam mais próximas à superfície. Para *Echinaster brasilienses*, não foi tão simples observar um padrão. Comportamentos circadianos já foram observados em equinodermos da classe Ophiuroidea (59) e também na classe Asteroidea (60). Acredita-se que este padrão seja presente em todo o filo, relacionado a fatores abióticos (e.g. marés (60),) e bióticos (e.g., alimentação e predação (59)). Pudemos observar em aquário uma maior movimentação dos exemplares de *Echinaster* durante a noite, especialmente uma maior atividade dos pés ambulacrais. Podemos supor que nestas espécies a melatonina está agindo para sinalizar a todos os tecidos do corpo que o animal se encontra no período noturno. Tal marcação circadiana é fundamental, para manter o nicho ecológico dos animais. O fato observado nas dosagens de melatonina em animais em livre curso (que pudemos realizar apenas em *Olindias sambaquiensis* e *Echinaster brasilienses*), de que os padrões de produção eram mantidos, corrobora o fato de que nestes animais a melatonina é a manifestação do relógio biológico destas espécies. Outro fato que corrobora o papel da melatonina nestas espécies é o experimento que realizamos em que era realizada a aplicação de melatonina (1 μ M) nos aquários com espécies individualizadas de *Bolinopsis vitrea*, *Olindias sambaquiensis* e *Echinaster brasilienses* durante o dia, às 15h. Todas as espécies apresentaram atividade intensificada entre 15 e 45 minutos após a adição de melatonina à água, sendo que *Bolinopsis vitrea* e *Olindias sambaquiensis* saíram da base do aquário e passaram a nadar ativamente próximo a superfície da água.

A produção de melatonina nos pontos do claro, observada em *Lychnorhiza lucerna*, *Nematostella vectensis* e em *Phragmatopoma lapidosa* já foi descrita em algumas espécies, como nos apêndices locomotores do grilo *Gryllus bimaculatus* (30) e no olho do molusco gastrópode *Aplysia californica* (31). Estas três espécies apresentam hábitos muito distintos. Enquanto *Lychnorhiza lucerna* caça ativamente, e provavelmente apresenta migração vertical, como outros Scyphozoa (61), *Nematostella vectensis* é uma espécie sedentária a maior parte do tempo, e *Phragmatopoma lapidosa* é uma espécie bentônica, que depende muito do regime de marés. Parece impossível generalizar uma função da melatonina nestas espécies. Entretanto, devemos imaginar que a função básica do hormônio, que é combater radicais livres de oxigênio e/ou nitrogênio, deve ser um ponto chave para estas espécies. Estes radicais livres são produto não apenas de fontes endógenas, como o metabolismo, mas também de exógenas, como metais pesados e/ou de transição, poluição e radiação ultravioleta. Melatonina se mostrou capaz de reduzir a concentração de espécies reativas de oxigênio no crustáceo *Neohelice granulata* quando este era exposto à radiação ultravioleta (62). No ácaro, *Tetranychus urticae*, a atividade da enzima AANAT e a concentração de melatonina foram elevadas em resposta à alta exposição a radiação ultravioleta (63). De volta as espécies abordadas neste trabalho, *Nematostella vectensis* vive em região de baixa profundidade, onde pode sofrer com grande exposição à radiação ultravioleta (64), de modo que a melatonina poderia vir a exercer a função de antioxidante. *Phragmatopoma* poderia depender da melatonina da mesma forma, por viver no costão e por diversas vezes ter de lidar com forte radiação solar.

No caso de *Phragmatopoma lapidosa*, algumas considerações devem ser feitas. Os recifes habitados por vermes constituem a base de uma elaborada e estável

comunidade marinha que inclui crustáceos, moluscos, esponjas, briozoários e peixes (65). Pesquisas recentes na absorção de melatonina através da alimentação em *C. elegans* (36) e em vertebrados (33), indicam a ocorrência de trocas interespecíficas da molécula, tanto em regime de simbiose quanto através de níveis tróficos (33), incluindo aí o papel de microorganismos e fungos ricos em melatonina que estão na cadeia alimentar de microcrustáceos e peixes (33). Indivíduos de *Phragmatopoma* são predados por crustáceos, gastrópodes e peixes, constituindo a base da cadeia alimentar de espécies que vivem nestes recifes ou próximos destes (65, 66). Desta forma, poderíamos esperar uma interação interespecífica da molécula entre as espécies, indicando que o conteúdo de melatonina no corpo dos predadores de *Phragmatopoma* poderia ter origem não apenas na produção local mas também vir da ingestão destes anelídeos.

O padrão de produção de melatonina observado em *Nematostella vectensis*, com ritmicidade circadiana e pico diurno, merece algumas considerações. Mechawar e Anctil (67) haviam previamente descrito a presença de melatonina em Cnidaria, no Anthozoa colonial *Renilla köllikeri*, mas eles não detectaram um padrão circadiano de produção do indol, o que é interessante dado que o hormônio funciona como um marcador circadiano e sazonal nos Bilateria (33, 58). Entretanto, uma diferença considerável entre aquele trabalho e o aqui apresentado é que Mechawar and Anctil utilizaram-se de luz vermelha no momento de dissecar as colônias para coletar tecido para os pontos da noite, enquanto nós realizamos as coletas sem qualquer luz auxiliar. A produção de melatonina é conhecida por ser extremamente sensível à luz (14, 68), então é possível que mesmo uma exposição curta à luminosidade possa ter alterado a produção de melatonina. Outros autores utilizaram-se de exposição à luz vermelha mas

ainda foram capazes de ver ritmos de melatonina em um modelo animal diferente (31), então não é claro porque *Nematostella* apresenta um padrão diferente de *Renilla*. Outra possibilidade é que a melatonina por si só possa ter sido degradada pela luz vermelha (69).

Os resultados dos sequenciamentos trouxeram dados interessantes. Verificamos que a sequência para a enzima Triptofano Hidroxilase é bastante conservada nas cinco espécies investigadas. Isso provavelmente é um reflexo de como essa enzima deve ser importante no metabolismo de todos estes animais, de modo que uma pressão evolutiva deve ter agido evitando grandes alterações na sequência com o passar do tempo. A triptofano hidroxilase é importante não apenas na síntese de melatonina, como também de outros metabólitos que funcionam como mensageiros químicos, que devem ser conservados ao longo das espécies. A sequência para a AANAT, entretanto, só pode ser identificada em *Bolinopsis vitrea* e *Echinaster brasiliensis*, e da HIOMT, apenas em *Nematostella vectensis*. Provavelmente tais sequências foram muito modificadas no curso da evolução, mas ainda devem se encontrar presentes, já que pudemos verificar atividade destas enzimas.

Um dado muito interessante que obtivemos dos sequenciamentos foi sobre os genes relógio Cry1 e Cry2, que se mostraram muito conservados, em *Olindias*, *Nematostella vectensis* e em *Echinaster*, o que indica que a maquinaria do relógio provavelmente é muito importante para tais espécies. Esse resultado aumentou nosso interesse pelos genes relógio nestas espécies, o que não fugiu do escopo original do projeto, uma vez que nosso objetivo era investigar os mecanismos moleculares e fisiológicos da ritmicidade nas espécies que estamos trabalhando. Nossos resultados mostram que a maquinaria do relógio deve envolver os componentes classicamente

descritos, uma vez que identificamos possíveis genes homólogos para Clock, Bmal, Per 1 e Per 2, sendo que o Bmal, assim como Cry1 e Cry2 se mostrou muito similar a seqüências previamente descritas para esse gene.

O fato de as isoformas para genes relógio em *Olindias sambaquiensis* e *Echinaster brasilienses* apresentarem expressão com variação ao longo do dia é apenas uma primeira evidência de que talvez venham mesmo a serem genes responsáveis pela ritmicidade nestas espécies. Estudos mais aprofundados, investigando sua sequência completa de bases e o impacto do bloqueio de sua expressão na ritmicidade circadiana seriam necessários para confirmar seu papel.

Os dados de expressão gênica em *Olindias sambaquiensis*, *Nematostella vectenis* e *Echinaster brasilienses* vieram a nos mostrar que as isoformas de triptofano hidroxilase eram expressas em tais espécies, de maneira bastante similar à produção de melatonina (*Olindias* e *Nematostella*) ou com um aparente adiantamento (*Echinaster*). É preciso frisar que aqui estamos tratando da expressão do gene, que após render o RNA mensageiro, ainda teria de ter este traduzido para a proteína para esta ter atividade. Desta maneira, o fato do gene para a isoforma da triptofano hidroxilase não apresentar exatamente o mesmo padrão de produção da melatonina não é uma incongruência. Os dados de atividade das enzimas viriam a ser cruciais para confirmar o papel da via clássica de produção de melatonina nestas espécies. Em *Nematostella vectenis* verificamos também a expressão da hidroxindole-O-metiltransferase, última enzima da via de produção de melatonina, correlacionado ao padrão de síntese do indol.

Em *Nematostella vectensis* já haviam dados sobre a expressão dos genes relógio (52), mostrando inclusive a capacidade de Clock e Cycle de formar dímeros. Entretanto, ainda eram necessários mais estudos sobre seu mecanismo de regulação e

sua resposta à regimes de escuro constante. Nossos resultados mostram que 4 dias de escuro constante são suficientes para abolir a expressão circadiana de todos os genes relógio que analisamos, com apenas 24 horas sendo suficientes para o fator central *NvClock*. Os dados de outros Anthozoos mostram um padrão similar, com perda de ritmicidade dos genes relógio em 24 horas (*Acropora millepora*) (70) ou 72 horas (*Favia fragum*) (71). Juntos, estes dados indicam que perda da ritmicidade na transcrição dos genes relógio quando dos animais em escuro constante pode ser uma característica de cnidários, em oposição à descrição clássica em bilateria, onde os animais são capazes de manter a ritmicidade naquela condição (72-75).

Nossa hipótese de que melatonina seria capaz de re-sincronizar os genes relógio nos exemplares de *Nematostella vectensis* em escuro constante foi baseada em estudos anteriores com mamíferos que observaram esta capacidade do hormônio (76, 77). Nós observamos que a adição de 1 μ M de melatonina teve a mesma capacidade em *Nematostella*, corroborando nossa hipótese de que a interação entre melatonina e a maquinaria dos genes relógio surgiu bastante cedo na evolução dos Metazoa. Em mamíferos, um curto tratamento de melatonina (2 horas) não é capaz de alterar a expressão destes genes (78). Em conjunto, nossos resultados e os dados da literatura indicam que anêmonas em escuro constante, que possuem um menor período com melatonina, perdem a ritmicidade dos genes relógio, mas uma exposição artificial de 12 horas ao hormônio faz com que a expressão de tais genes seja re-sincronizada.

O experimento de microarranjo em *Nematostella vectensis* trouxe mais dados que demonstram a capacidade da melatonina de ser uma gente sincronizador nesta espécie. Dos 287 genes que oscilaram ao longo dos pontos analisados em animais em escuro constante, 183 perdiam tal variação quando os animais eram mantidos em escuro

constante, mas recuperaram o ritmo nos animais suplementados com melatonina. Aparecem neste grupo genes para proteínas que agem como enzimas, modulando diversos eventos na resposta celular, e desta maneira, na fisiologia do animal como um todo, tais como proteína 14-3-3, chaperonina 10, uma o-metiltransferase, entre outras. Podemos inferir que as alterações fisiológicas nos animais quando da passagem para o regime de escuro constante, como supressão da produção de gametas, podem vir a ser decorrentes da alteração da transcrição destes genes.

Também foi possível verificar que dos 24020 genes analisados, 35 deles mantêm uma oscilação na expressão independente do regime de luz ou da adição de melatonina. Provavelmente se tratavam de genes intimamente relacionados a ritmicidade desta espécie, cuja perda da oscilação poderia ocasionar problemas ao indivíduo. De fato, a análise qualitativa nos mostrou que aí se encontravam genes para uma proteína constituinte do ribossomo 60s, para uma sub-unidade de uma ATPase, e genes para proteínas extracelulares de membrana. Também verificamos que por mais a melatonina pareça um potente agente sincronizador em *Nematostella*, 57 genes que variam em regime de claro-escuro perdem essa ritmicidade em escuro constante e tal capacidade não é recuperada com a adição do indol. Outro dado que deve ser levado em conta são os 12 genes com variação circadiana que aparecem em comum entre os regimes de claro-escuro e escuro constante. São genes cuja adição de melatonina teria inibido a transcrição. Dentro deste grupo encontra-se o gene para uma proteína cinase dependente de cálcio calmodulina, cuja alteração na transcrição poderia ter grande impacto na sinalização celular. A quantidade de genes cuja adição de melatonina foi capaz de induzir alterações no padrão de expressão (3219) mostra o potencial do

hormônio como regulador da transcrição. Entre estes encontram-se genes para enzimas e para a RNA polimerase, o que teria um grande impacto na fisiologia celular.

Fomos capazes de realizar ensaios de atividade enzimática para Triptofano Hidroxilase e Aril-aquil-N-acetiltransferase em *Bolinopsis vitrea*, *Olindias sambaquiensis*, *Phragmatopoma lapidosa* e em *Echinaster brasiliensis*, e para as enzimas Triptofano Hidroxilase e Hidroxindole-O-metiltransferase em *Nematostella vectensis*. Em *Bolinopsis vitrea*, *Olindias sambaquiensis* e em *Echinaster brasiliensis* ambas enzimas (TPH e AANAT) mostraram padrões de atividade que se correlacionavam ao observado para a produção de melatonina (teste de correlação de Pearson). Isso nos leva a supor que a via de produção de melatonina nos invertebrados é provavelmente a mesma descrita em vertebrados, ainda que faltem ensaios sobre a atividade da última enzima da via, a HIOMT, nestas espécies.

Para *Phragmatopoma lapidosa*, antes mesmo de realizar os testes de correlação, já podíamos inferir que os padrões não se relacionavam diretamente. Tanto a triptofano hidroxilase quanto a aril-aquil-N-acetiltransferase apresentam um pico de atividade no ponto das 2 horas da manhã, enquanto a dosagem de melatonina acusou maior concentração no início do período claro. De fato, o teste de correlação de Pearson não indicou relação nem para a TPH (coeficiente r de Pearson igual a 0,023; valor de p de 0,4735) nem para a AANAT (coeficiente r de Pearson igual a -0,2996; valor de p de 0,2325). Podemos imaginar que nesta espécie a última enzima da via de produção de melatonina, a hidroxindole-O-metiltransferase (HIOMT), deve estar tendo um papel fundamental. No ponto das duas horas da manhã, a máxima atividade da triptofano hidroxilase e da aril-aquil-N-acetiltransferase deve estar gerando grandes quantidades de N-acetil serotonina, que devido a uma baixa concentração/atividade da HIOMT, não

estaria sendo convertida em melatonina. Ensaaios de atividade da HIOMT se fazem necessários para confirmar esta hipótese.

Em *Nematostella vectensis*, fomos capazes de detectar a atividade das enzimas TPH e HIOMT. O teste ANOVA de uma via mostrou que a atividade diferia entre os dois pontos do dia analisados para ambas as enzimas ($p < 0,001$), indicando uma dependência temporal na atividade. Ambas enzimas tiveram maior atividade no ponto com maior quantidade de melatonina, evidência da correlação entre a atividade das enzimas e a produção de melatonina. Fomos os primeiros a mostrar atividade destas enzimas nos filos nos quais trabalhamos, mas existem dados na literatura sobre moluscos (79) e artrópodes (35, 80-82), o que reforça nossos dados.

Em conclusão, pudemos verificar a presença de melatonina, com produção circadiana e com sinais de ser um marcador endógeno da ritmicidade circadiana em 4 filos onde nunca tal averiguação havia sido realizada: Ctenophora, Cnidaria, Annelida e Echinodermata. Mais do que isso, nossos dados indicam que a via de produção de melatonina é a mesma nas cinco espécies dos quatro filos analisados com base em dados gênicos e de atividade das enzimas. Isso comprova a tese de que a melatonina é uma molécula ubíqua nos seres vivos, uma vez que em todos os animais em que foi investigada, ela esteve presente.

Também fomos capazes de demonstrar a presença de isoformas de genes relógio nestes filos, pela primeira vez na literatura, o que abre as possibilidades de investigar como tais genes funcionam nestas espécies, modulando sua ritmicidade, tanto em fenômenos comportamentais, como na própria produção de melatonina.

REFERÊNCIAS ^a

1. Ekstrom P, Meissl H. Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003;358(1438):1679-700. Epub 2003/10/17.
2. Vollrath L. [The function of the pineal body in man and animal under the effect of light and darkness]. *Hippokrates.* 1976;47(1):84-5. Epub 1976/02/01. Die Zirbeldrüsenfunktion bei Tier und Mensch unter dem Einfluss von Licht und Dunkelheit.
3. Korf HW. Evolution of melatonin-producing pinealocytes. *Adv Exp Med Biol.* 1999;460:17-29. Epub 2000/05/16.
4. Collin JP, Meinil A. [The pineal body. Combined ultrastructural, cytochemical (monoamines) and experimental studies in *Testudo mauritanica*. Dense granules of cells of the "sensory" line in the vertebrates]. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 1971;60(3):269-303. Epub 1971/07/01. L'organe pineal. Etudes combinees ultrastructurales, cytochimiques (monoamines) et experimentales, chez *Testudo mauritanica*. Grains denses des cellules de la lignee "sensorielle" chez les vertebrres.
5. Oksche A. [Extraretinal photoreceptors in the pineal body of birds]. *Arch Anat Histol Embryol.* 1968;51(5):495-507. Epub 1968/01/01. Zur Frage extraretinaler Photorezeptoren im Pinealorgan der Vogel.
6. Reiter RJ. Electromagnetic fields and melatonin production. *Biomed Pharmacother.* 1993;47(10):439-44. Epub 1993/01/01.
7. Hardeland R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(13):2001-18. Epub 2008/03/18.
8. do Carmo Buonfiglio D, Peliciari-Garcia RA, do Amaral FG, Peres R, Nogueira TC, Afeche SC, et al. Early-stage retinal melatonin synthesis impairment in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(10):7416-22. Epub 2011/09/08.
9. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci.* 2002;47(10):2336-48. Epub 2002/10/25.
10. Arendt J. Melatonin. *BMJ.* 1996;312(7041):1242-3. Epub 1996/05/18.
11. Aloyo VJ, Walker RF. Alpha-adrenergic control of serotonin release from rat pineal glands. *Neuroendocrinology.* 1988;48(1):61-6. Epub 1988/07/01.
12. Olcese J, Munker M. Extracellular serotonin promotes melatonin release from cultured rat pinealocytes: evidence for an S2-type receptor-mediated autocrine feedback. *Brain Res.* 1994;643(1-2):150-4. Epub 1994/04/18.
13. Binkley SA, Klein DC, Weller JL. Dark induced increase in pineal serotonin N-acetyltransferase activity: a refractory period. *Experientia.* 1973;29(11):1339-40. Epub 1973/11/15.

^a De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

14. Klein DC, Weller JL. Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science*. 1972;177(48):532-3. Epub 1972/08/11.
15. Deguchi T, Axelrod J. Induction and superinduction of serotonin N-acetyltransferase by adrenergic drugs and denervation in rat pineal organ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69(8):2208-11. Epub 1972/08/01.
16. Klein DC, Buda MJ, Kapoor CL, Krishna G. Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for "turnoff". *Science*. 1978;199(4326):309-11. Epub 1978/01/20.
17. Ribelayga C, Garidou ML, Malan A, Gauer F, Calgari C, Pevet P, et al. Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. *J Biol Rhythms*. 1999;14(2):105-15. Epub 1999/04/09.
18. Ribelayga C, Gauer F, Calgari C, Pevet P, Simonneaux V. Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology*. 1999;140(3):1375-84. Epub 1999/03/06.
19. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 2006;273(13):2813-38. Epub 2006/07/05.
20. Vivien-Roels B, Pevet P, Beck O, Fevre-Montange M. Identification of melatonin in the compound eyes of an insect, the locust (*Locusta migratoria*), by radioimmunoassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Neurosci Lett*. 1984;49(1-2):153-7. Epub 1984/08/24.
21. Hardeland R, Balzer I, Poeggeler B, Fuhrberg B, Uria H, Behrmann G, et al. On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J Pineal Res*. 1995;18(2):104-11. Epub 1995/03/01.
22. Hardeland R. New actions of melatonin and their relevance to biometeorology. *Int J Biometeorol*. 1997;41(2):47-57. Epub 1998/01/16.
23. Balzer I. Recent progress in understanding the temporal behavior of unicellular organisms. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29(1):95-9. Epub 1996/01/01.
24. Hardeland R, Burkhardt S, Antolin I, Fuhrberg B, Coto-Montes A. Melatonin and 5-methoxytryptamine in the bioluminescent dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. Restoration of the circadian glow peak after suppression of indoleamine biosynthesis or oxidative stress. *Adv Exp Med Biol*. 1999;460:387-90. Epub 2000/05/16.
25. Itoh MT, Shinozawa T, Sumi Y. Circadian rhythms of melatonin-synthesizing enzyme activities and melatonin levels in planarians. *Brain Res*. 1999;830(1):165-73. Epub 1999/06/03.
26. Finocchiaro L, Callebert J, Launay JM, Jallon JM. Melatonin biosynthesis in *Drosophila*: its nature and its effects. *J Neurochem*. 1988;50(2):382-7. Epub 1988/02/01.
27. Hintermann E, Grieder NC, Amherd R, Brodbeck D, Meyer UA. Cloning of an arylalkylamine N-acetyltransferase (aaNAT1) from *Drosophila*

- melanogaster expressed in the nervous system and the gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12315-20. Epub 1996/10/29.
28. Hintermann E, Jenö P, Meyer UA. Isolation and characterization of an arylalkylamine N-acetyltransferase from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*. 1995;375(1-2):148-50. Epub 1995/11/13.
 29. Amherd R, Hintermann E, Walz D, Affolter M, Meyer UA. Purification, cloning, and characterization of a second arylalkylamine N-acetyltransferase from *Drosophila melanogaster*. *DNA Cell Biol*. 2000;19(11):697-705. Epub 2000/12/01.
 30. Itoh MT, Hattori A, Sumi Y, Suzuki T. Day-night changes in melatonin levels in different organs of the cricket (*Gryllus bimaculatus*). *J Pineal Res*. 1995;18(3):165-9. Epub 1995/04/01.
 31. Abran D, Anctil M, Ali MA. Melatonin activity rhythms in eyes and cerebral ganglia of *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol*. 1994;96(2):215-22. Epub 1994/11/01.
 32. Nery LE, Da Silva MA, Castrucci AM. Possible role of non-classical chromatophorotropins on the regulation of the crustacean erythrophore. *J Exp Zool*. 1999;284(6):711-6. Epub 1999/10/26.
 33. Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res*. 2003;34(4):233-41. Epub 2003/03/29.
 34. Withyachumnarnkul B, Ajpru S, Rachawong S, Pongsa-Asawapaiboon A, Sumridthong A. Sexual dimorphism in N-acetyltransferase and melatonin levels in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *J Pineal Res*. 1999;26(3):174-7. Epub 1999/05/08.
 35. Withyachumnarnkul B, Pongtippatee P, Ajpru S. N-acetyltransferase, hydroxyindole-O-methyltransferase and melatonin in the optic lobes of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *J Pineal Res*. 1995;18(4):217-21. Epub 1995/05/01.
 36. Balzer I, Höcker B, Kapp H, Bartolomaeus B. Occurrence and comparative physiology of melatonin in evolutionary diverse organisms. In: Vanden Driessche T, Guisset JL, Petiau-de Vries GM, editors. *The Redox State and Circadian Rhythms*. London: Springer; 2000. p. 95-119.
 37. Kolar J, Machackova I. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. *J Pineal Res*. 2005;39(4):333-41. Epub 2005/10/07.
 38. Chab D, Kolar J, Olson MS, Storchova H. Two flowering locus T (FT) homologs in *Chenopodium rubrum* differ in expression patterns. *Planta*. 2008;228(6):929-40. Epub 2008/07/26.
 39. Hernandez-Ruiz J, Cano A, Arnao MB. Melatonin acts as a growth-stimulating compound in some monocot species. *J Pineal Res*. 2005;39(2):137-42. Epub 2005/08/16.
 40. Coon SL, Klein DC. Evolution of arylalkylamine N-acetyltransferase: emergence and divergence. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;252(1-2):2-10. Epub 2006/05/16.
 41. Kalsbeek A, Perreau-Lenz S, Buijs RM. A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol Int*. 2006;23(3):521-35. Epub 2006/06/07.
 42. Borjigin J, Samantha Zhang L, Calinescu AA. Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;349(1):13-9. Epub 2011/07/26.
 43. Stehle JH, von Gall C, Korf HW. Melatonin: a clock-output, a clock-input. *J Neuroendocrinol*. 2003;15(4):383-9. Epub 2003/03/08.

44. Reddy P, Zehring WA, Wheeler DA, Pirrotta V, Hadfield C, Hall JC, et al. Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell*. 1984;38(3):701-10. Epub 1984/10/01.
45. Sehgal A, Price JL, Man B, Young MW. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science*. 1994;263(5153):1603-6. Epub 1994/03/18.
46. Vosshall LB, Price JL, Sehgal A, Saez L, Young MW. Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, timeless. *Science*. 1994;263(5153):1606-9. Epub 1994/03/18.
47. Aronson BD, Johnson KA, Loros JJ, Dunlap JC. Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science*. 1994;263(5153):1578-84. Epub 1994/03/18.
48. Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell*. 1999;96(2):271-90. Epub 1999/02/13.
49. Dunlap J. Circadian rhythms. An end in the beginning. *Science*. 1998;280(5369):1548-9. Epub 1998/06/27.
50. Harmer SL, Panda S, Kay SA. Molecular bases of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:215-53. Epub 2001/11/01.
51. Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, Reppert SM. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Mol Biol Evol*. 2007;24(4):948-55. Epub 2007/01/25.
52. Reitzel AM, Behrendt L, Tarrant AM. Light entrained rhythmic gene expression in the sea anemone *Nematostella vectensis*: the evolution of the animal circadian clock. *PLoS One*. 2010;5(9):e12805. Epub 2010/09/30.
53. Parfitt A, Weller JL, Klein DC, Sakai KK, Marks BH. Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3',5'-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Mol Pharmacol*. 1975;11(3):241-55. Epub 1975/05/01.
54. Deguchi T, Axelrod J. Control of circadian change of serotonin N-acetyltransferase activity in the pineal organ by the beta--adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69(9):2547-50. Epub 1972/09/01.
55. Ribelayga C, Pevet P, Simonneaux V. Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res*. 1997;777(1-2):247-50. Epub 1998/02/04.
56. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19(2):185-93.
57. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4(2):249-64.
58. Hardeland R. Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans. *Reprod Nutr Dev*. 1999;39(3):399-408. Epub 1999/07/27.
59. Rosenberg R, Lundberg L. Photoperiodic activity pattern in the brittle star *Amphiura filiformis*. *Mar Biol*. 2004;145(4):651-6.

60. Garza C, Robles C. Effects of brackish water incursions and diel phasing of tides on vertical excursions of the keystone predator *Pisaster ochraceus*. *Mar Biol.* 2010;157(3):673-82.
61. Arai T, Watari Y. Effects of photoperiod and aging on locomotor activity rhythms in the onion fly, *Delia antiqua*. *J Insect Physiol.* 1997;43(6):567-76. Epub 1997/06/01.
62. Vargas MA, Geihs MA, Maciel FE, Cruz BP, Nery LE, Allodi S. The effects of UV radiation on the visual system of the crab *Neohelice granulata*: a protective role of melatonin. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2011;154(4):427-34. Epub 2011/08/23.
63. Suzuki T, Takashima T, Izawa N, Watanabe M, Takeda M. UV radiation elevates arylalkylamine N-acetyltransferase activity and melatonin content in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *J Insect Physiol.* 2008;54(7):1168-74. Epub 2008/07/19.
64. Pankow S, Bamberger C. The p53 tumor suppressor-like protein nvp63 mediates selective germ cell death in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *PLoS One.* 2007;2(9):e782. Epub 2007/09/13.
65. Zale A, SG M. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (south Florida)--reef-building tube worm. *US Fish Wildl Serv Biol Rep.* 1989;82(11.115):12. Epub 1989.
66. Gore RH, Scotto LE, Becker LJ. Community Composition, Stability, and Trophic Partitioning in Decapod Crustaceans Inhabiting Some Subtropical Sabellariid Worm Reefs. *Bulletin of Marine Science.* 1978;28(2):221-48.
67. Mechawar N, Anctil M. Melatonin in a primitive metazoan: seasonal changes of levels and immunohistochemical visualization in neurons. *J Comp Neurol.* 1997;387(2):243-54. Epub 1997/10/23 22:34.
68. Itoh MT, Hattori A, Nomura T, Sumi Y, Suzuki T. Melatonin and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol Cell Endocrinol.* 1995;115(1):59-64. Epub 1995/11/30.
69. Tursilli R, Casolari A, Iannuccelli V, Scalia S. Enhancement of melatonin photostability by encapsulation in lipospheres. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;40(4):910-4. Epub 2005/10/26.
70. Brady AK, Snyder KA, Vize PD. Circadian cycles of gene expression in the coral, *Acropora millepora*. *PLoS One.* 2011;6(9):e25072. Epub 2011/09/29.
71. Hoadley KD, Szmant AM, Pyott SJ. Circadian clock gene expression in the coral *Favia fragum* over diel and lunar reproductive cycles. *PLoS One.* 2011;6(5):e19755. Epub 2011/05/17.
72. Emery IF, Noveral JM, Jamison CF, Siwicki KK. Rhythms of *Drosophila* period gene expression in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(8):4092-6. Epub 1997/04/15.
73. Mazzotta GM, Sandrelli F, Zordan MA, Mason M, Benna C, Cisotto P, et al. The clock gene period in the medfly *Ceratitis capitata*. *Genet Res.* 2005;86(1):13-30. Epub 2005/09/27.
74. Rubin EB, Shemesh Y, Cohen M, Elgavish S, Robertson HM, Bloch G. Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular

- evolution of the circadian clock. *Genome Res.* 2006;16(11):1352-65. Epub 2006/10/27.
75. Uryu O, Tomioka K. Circadian oscillations outside the optic lobe in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J Insect Physiol.* 2010;56(9):1284-90. Epub 2010/04/27.
 76. Jung-Hynes B, Reiter RJ, Ahmad N. Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. *J Pineal Res.* 2010;48(1):9-19. Epub 2009/12/23.
 77. Torres-Farfan C, Rocco V, Monso C, Valenzuela FJ, Campino C, Germain A, et al. Maternal melatonin effects on clock gene expression in a nonhuman primate fetus. *Endocrinology.* 2006;147(10):4618-26. Epub 2006/07/15.
 78. Peliciari-Garcia RA, Zanutta MM, Andrade-Silva J, Gomes DA, Barreto-Chaves ML, Cipolla-Neto J. Expression of circadian clock and melatonin receptors within cultured rat cardiomyocytes. *Chronobiol Int.* 2011;28(1):21-30. Epub 2010/12/25.
 79. Blanc A, Vivien-Roels B, Pevet P, Attia J, Buisson B. Melatonin and 5-methoxytryptophol (5-ML) in nervous and/or neurosensory structures of a gastropod mollusc (*Helix aspersa maxima*): synthesis and diurnal rhythms. *Gen Comp Endocrinol.* 2003;131(2):168-75. Epub 2003/04/08.
 80. Bao X, Wang B, Zhang J, Yan T, Yang W, Jiao F, et al. Localization of serotonin/tryptophan-hydroxylase-immunoreactive cells in the brain and suboesophageal ganglion of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 2010;340(1):51-9. Epub 2010/02/24.
 81. Itoh MT, Nomura T, Sumi Y. Hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the silkworm (*Bombyx mori*). *Brain Res.* 1997;765(1):61-6. Epub 1997/08/08.
 82. Pandey A, Habibulla M, Singh R. Tryptophan hydroxylase and 5-HTP-decarboxylase activity in cockroach brain and the effects of p-chlorophenylalanine and 3-hydroxybenzylhydrazine (NSD-1015). *Brain Res.* 1983;273(1):67-70. Epub 1983/08/22.

Anexo 1: Quadro comparativo das espécies analisadas neste exemplar.

	<i>Bolinopsis vitrea</i>	<i>Lychnorhiza lucerna</i>	<i>Olindias sambaquiensis</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	<i>Phragmatopoma lapidosa</i>	<i>Echinaster brasiliensis</i>
Grupo	Ctenophora	Cnidaria - Scyphozoa	Cnidaria-Hydrozoa	Cnidaria - Anthozoa	Polychaeta	Echinodermata
Pico de melatonina	Noturno	Diurno	Noturno	Diurno	Diurno	Noturno
Horário do pico de melatonina	18:05h	14:00h	23:34h	11:40h	7:25h	21:00h
Padrão de melatonina mantido no escuro?	Não averiguado	Não averiguado	Sim	Não	Sim	Sim
Ação da suplementação com melatonina (1 μ M)	Induz atividade motora	Não averiguado	Induz atividade motora	Sincroniza expressão dos genes relógio	Nada observado	Induz atividade motora
Primeira descrição de melatonina no grupo?	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim

	<i>Bolinopsis vitrea</i>	<i>Lychnorhiza lucerna</i>	<i>Olindias sambaquiensis</i>	<i>Nematostella vectensis</i>	<i>Phragmatopoma lapidosa</i>
Enzimas da via de Melatonina no genoma	TPH e AANAT	Não averiguado	Apenas TPH	TPH e HIOMT	Apenas TPH
Genes relógio no genoma	Clock, Cry1, Per1	Não averiguado	Clock, Bmal, Cry1, Cry2, Per 1, Per2	Clock, Cycle (Bmal), Timeout, Cry1a, Cry1b, Cry2	Clock, Bmal, Cry1, Per1
Atividade da TPH?	Sim. Correlaciona-se à melatonina	Não averiguado	Sim. Correlaciona-se à melatonina	Sim. Apparently correlaciona-se à melatonina	Sim. Não diretamente correlacionada à melatonina
Atividade da AANAT?	Sim. Correlaciona-se à melatonina	Não averiguado	Sim. Correlaciona-se à melatonina	Não averiguado	Sim. Não diretamente correlacionada à melatonina
Atividade da HIOMT?	Não averiguado	Não averiguado	Não averiguado	Sim. Apparently correlaciona-se à melatonina	Não averiguado

Anexo 2: Alinhamentos

Anexo 2.1: Alinhamentos das sequencias obtidas para isoformas dos genes da via de produção de melatonina, genes constitutivos e genes relógio em *Bolinopsis vitrea*

RPL37a:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 14,763,360 sequences; 35,108,553,521 total letters
Query Length=301

Sequences producing significant alignments: Score E
(Bits) Value

ref NM_001100994.1	Rattus norvegicus ribosomal protein L37a ...	443	4e-121
ref NM_009084.4	Mus musculus ribosomal protein L37a (Rpl37a)...	374	2e-100
gb HQ326676.1	Heterocephalus glaber 60S ribosomal protein L3...	329	6e-87
gb HQ326675.1	Fukomys anselli 60S ribosomal protein L37a mRN...	325	7e-86
dbj AK346581.1	Sus scrofa mRNA, clone:MLN010015A03, expresse...	325	7e-86
ref XM_002749767.1	PREDICTED: Callithrix jacchus 60S ribosom...	311	2e-81
ref NM_000998.4	Homo sapiens ribosomal protein L37a (RPL37A)...	311	2e-81
ref NM_001132041.1	Pongo abelii ribosomal protein L37a (RPL3...	311	2e-81
ref NM_001035008.1	Bos taurus ribosomal protein L37a (RPL37A)...	307	2e-80
ref XM_001085048.2	PREDICTED: Macaca mulatta ribosomal prote...	306	7e-80
gb BC082239.1	Homo sapiens ribosomal protein L37a, mRNA (cDN...	306	7e-80

TPH:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 14,763,360 sequences; 35,108,553,521 total letters
Query Length=232

Sequences producing significant alignments: Score E
(Bits) Value

ref NM_001100634.2	Rattus norvegicus tryptophan hydroxylase ...	311	1e-81
ref NM_009414.2	Mus musculus tryptophan hydroxylase 1 (Tph1)...	257	2e-65
gb AY034600.1	Mesocricetus auratus tryptophane hydroxylase m...	250	3e-63
ref NM_004179.2	Homo sapiens tryptophan hydroxylase 1 (TPH1)...	215	7e-53
gb EU796672.1	Gorilla gorilla tryptophan hydroxylase 1 (TPH1)...	134	2e-28
gb EU796671.1	Pan troglodytes tryptophan hydroxylase 1 (TPH1)...	134	2e-28
gb EU796673.1	Pongo pygmaeus tryptophan hydroxylase 1 (TPH1)...	129	8e-27
gb EU796670.1	Pan paniscus tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) g...	129	8e-27
gb GU290195.1	Clarias gariepinus tryptophan hydroxylase mRNA...	111	2e-21
gb BC059550.1	Danio rerio tryptophan hydroxylase 1 (tryptoph...	107	3e-20
ref NM_178306.2	Danio rerio tryptophan hydroxylase 1 (trypto...	107	3e-20
ref NM_001081783.1	Equus caballus tryptophan hydroxylase 2 (...)	105	9e-20
gb BC154120.1	Danio rerio tryptophan hydroxylase 1b, mRNA (c...	102	1e-18
gb EU796675.1	Pan paniscus tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) g...	84.2	3e-13
gb EU796678.1	Pongo pygmaeus tryptophan hydroxylase 1 (TPH1)...	78.8	1e-11
gb EF490969.1	Carassius auratus tryptophan hydroxylase 1 (TR...	78.8	1e-11

AANAT:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
Query length=238

Sequences producing significant alignments: Score E
(Bits) Value

ref NM_012818.2	Rattus norvegicus arylalkylamine N-acetyltra...	188	1e-44
-----------------	---	-----	-------

gb|AF004108.1|AF004108 *Mus musculus* arylalkylamine N-acetyltr... 167 3e-38
 gb|AF317891.1| *Arvicanthus niloticus* arylalkylamine-N-acetyl-... 152 7e-34
 gb|AF092100.1|AF092100 *Mesocricetus auratus* arylalkylamine N-... 104 3e-19
 gb|DQ018371.1| *Psammomys obesus* arylalkylamine N-acetyltransf... 91.5 2e-15
 gb|FJ809749.1| *Octodon degus* arylalkylamine N-acetyltransfera... 84.2 3e-13
 gb|DQ864375.1| *Bos grunniens* arylalkylamine-N-acetyltransfera... 71.6 2e-09
 ref|NM_177509.2| *Bos taurus* arylalkylamine N-acetyltransferas... 71.6 2e-09
 ref|NM_001009461.1| *Ovis aries* aralkylamine N-acetyltransfera... 68.0 2e-08
 gb|GQ340971.1| *Solea senegalensis* arylalkylamine N-acetyltran... 46.4 0.080
 ref|NM_001124180.1| *Oncorhynchus mykiss* retinal arylalkylamin... 41.0 3.4

Clock:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=273

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
emb AM420293.1 <i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL2338 complete...	46.4	0.094
gb CP002217.1 <i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003 chromosome 1, comple...	44.6	0.33
emb FP103042.2 <i>Methylobacterium extorquens</i> DM4 str. DM4 chro...	42.8	1.1
gb EU332842.1 <i>Homo sapiens</i> fibroblast growth factor receptor...	42.8	1.1
gb CP000769.1 <i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5, complete genome	42.8	1.1
gb AC018921.22 <i>Homo sapiens</i> 12 BAC RP11-956E11 (Roswell Park...	42.8	1.1
emb AJ582817.3 <i>Streptomyces kanamyceticus</i> kanamycin biosynth...	42.8	1.1
gb U91327.1 HSU91327 Human chromosome 12p15 BAC clone CIT987S...	42.8	1.1
dbj AP010968.1 <i>Kitasatospora setae</i> KM-6054 DNA, complete genome	41.0	4.0
gb CP002299.1 <i>Frankia</i> sp. Eu11c, complete genome	41.0	4.0

Cry1:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 14,763,360 sequences; 35,108,553,521 total letters
 Query length=225

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
ref NM_198750.2 <i>Rattus norvegicus</i> cryptochrome 1 (photolyase...	316	3e-83
ref NM_007771.3 <i>Mus musculus</i> cryptochrome 1 (photolyase-like...	221	2e-54
ref XM_857660.1 PREDICTED: <i>Canis familiaris</i> similar to crypt...	170	3e-39
ref XM_002711421.1 PREDICTED: <i>Oryctolagus cuniculus</i> cryptoch...	165	1e-37
emb AJ606298.1 <i>Spalax judaei</i> mRNA for sCRY1 protein	163	4e-37
ref NM_004075.3 <i>Homo sapiens</i> cryptochrome 1 (photolyase-like...	147	3e-32
ref XM_002823690.1 PREDICTED: <i>Pongo abelii</i> cryptochrome 1 (p...	145	1e-31
ref NM_001105415.1 <i>Bos taurus</i> cryptochrome 1 (photolyase-lik...	140	4e-30
dbj AB074458.1 <i>Macaca fascicularis</i> mRNA for cryptochrome 1, ...	138	1e-29
ref NM_001129735.1 <i>Ovis aries</i> cryptochrome 1 (photolyase-lik...	136	5e-29
gb AY585716.1 <i>Erithacus rubecula</i> cryptochrome-1a (CRY1a) mRN...	86.0	8e-14
emb AJ632120.1 <i>Sylvia borin</i> mRNA for cryptochrome 1 (cry1 gene)	82.4	1e-12

Per 1:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=314

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
gb AC192469.4 <i>Pan troglodytes</i> BAC clone CH251-585B11 from ch...	44.6	0.38
emb FQ311473.1 <i>Sporisorium reilianum</i> SRZ2 chromosome 8 compl...	42.8	1.3
gb CP000304.1 <i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501, complete genome	42.8	1.3

gb|EF192032.2| Parajulis poecilepterus mitochondrion, complet... 41.0 4.6
 emb|FP929114.1| Leptosphaeria maculans v23.1.3 Im_SuperContig... 41.0 4.6
 emb|FN357311.1| Schistosoma mansoni genome sequence supercont... 41.0 4.6
 gb|AC207212.4| Pongo abelii BAC clone CH276-345C12 from chrom... 41.0 4.6

Anexo 2.2:

Alinhamentos das sequencias obtidas para isoformas dos genes da via de produção de melatonina, genes constitutivos e genes relógio em *Olindias sambaquiensis*:

RPL37a:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=390

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
ref NM_001108801.1 Rattus norvegicus ribosomal protein L37a ...	41.0	5.9
emb AM471589.2 Vitis vinifera contig VV78X171785.6, whole ge...	41.0	5.9
gb EF013665.1 Aenictogiton sp. ZAM02 wingless (wnt-1) gene, ...	41.0	5.9
ref NM_001100994.1 Rattus norvegicus ribosomal protein L37a ...	41.0	5.9
gb AC147633.3 Mus musculus BAC clone RP23-302B3 from chromos...	41.0	5.9
gb AC108947.5 Mus musculus BAC clone RP23-140A11 from chromo...	41.0	5.9
gb AC021582.13 Homo sapiens chromosome 9, clone RP11-687K5, ...	41.0	5.9

TPH:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=217

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
ref NM_001100634.2 Rattus norvegicus tryptophan hydroxylase ...	347	2e-92
ref NM_009414.2 Mus musculus tryptophan hydroxylase 1 (Tph1)...	293	3e-76
gb AY034600.1 Mesocricetus auratus tryptophane hydroxylase m...	289	4e-75
ref NM_004179.2 Homo sapiens tryptophan hydroxylase 1 (TPH1)...	257	2e-65
emb X52836.1 Human mRNA for tryptophan hydroxylase (EC 1.14....	257	2e-65
ref NM_001082272.1 Oryctolagus cuniculus tryptophan hydroxyl...	253	3e-64
gb EU796672.1 Gorilla gorilla tryptophan hydroxylase 1 (TPH1...	165	1e-37

Clock:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=331

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
tpg BK006916.1 TPA: TPA_inf: Anolis carolinensis protocadher...	46.4	0.12
ref XM_002431950.1 Pediculus humanus corporis reverse transc...	44.6	0.40
emb AM450666.2 Vitis vinifera contig VV78X065233.8, whole ge...	44.6	0.40
emb CT028004.1 Poplar cDNA sequences	44.6	0.40
emb FN357438.1 Schistosoma mansoni genome sequence supercont...	41.0	4.9
gb AC235736.1 Glycine max strain Williams 82 clone GM_WBa002...	41.0	4.9
gb AC210650.1 Populus trichocarpa clone POP004-K01, complete...	41.0	4.9
ref XM_001525998.1 Lodderomyces elongisporus NRRL YB-4239 hy...	41.0	4.9
dbj AB019259.1 Rattus norvegicus clock mRNA for CLOCK-S, spl...	41.0	4.9
ref NM_021856.1 Rattus norvegicus clock homolog (mouse) (Clo...	41.0	4.9

Bmal:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=188

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value

emb|CU633160.8| Zebrafish DNA sequence from clone CH73-22F16 ... 42.8 0.74
 ref|NM_007489.3| Mus musculus aryl hydrocarbon receptor nucle... 42.8 0.74
 ref|NM_024362.2| Rattus norvegicus aryl hydrocarbon receptor ... 42.8 0.74
 gb|CP000026.1| Salmonella enterica subsp. enterica serovar Pa... 42.8 0.74
 dbj|AB012600.1| Rattus norvegicus mRNA for BMAL1b, complete cds 42.8 0.74
 dbj|AB014494.1| Mus musculus mRNA for Arnt3, complete cds 42.8 0.74
 ref|XM_001095316.2| PREDICTED: Macaca mulatta aryl hydrocarbo... 41.0 2.6
 gb|EF015894.1| Homo sapiens aryl hydrocarbon receptor nuclear... 41.0 2.6
 dbj|D89722.1| Homo sapiens mRNA for BMAL1a, complete cds 41.0 2.6
 dbj|AB000814.1| Homo sapiens mRNA for BMAL1f, partial cds 41.0 2.6

Cry 1:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=233

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
ref NM_198750.2 Rattus norvegicus cryptochrome 1 (photolyase...	390	2e-105
ref NM_007771.3 Mus musculus cryptochrome 1 (photolyase-like...	264	2e-67
emb AJ606298.1 Spalax judaei mRNA for sCRY1 protein	217	2e-53
ref NM_004075.3 Homo sapiens cryptochrome 1 (photolyase-like...	201	2e-48
ref NM_001194159.1 Macaca mulatta cryptochrome 1 (photolyase...	192	8e-46
dref NM_001105415.1 Bos taurus cryptochrome 1 (photolyase-lik...	190	3e-45
ref NM_001129735.1 Ovis aries cryptochrome 1 (photolyase-lik...	181	2e-42
emb AJ632120.1 Sylvia borin mRNA for cryptochrome 1 (cry1 gene)	100	4e-18
ref NM_204245.1 Gallus gallus cryptochrome 1 (photolyase-lik...	96.9	5e-17
gb AC169125.2 Medicago truncatula chromosome 7 BAC clone mth...	51.8	0.002
gb CP000744.1 Pseudomonas aeruginosa PA7, complete genome	44.6	0.27
gb AC104331.2 Homo sapiens chromosome 3 clone RP11-543A18, c...	42.8	0.95
gb AY049033.1 Xenopus laevis cryptochrome 1 mRNA, complete cds	42.8	0.95

Cry2:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=329

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
emb CR456635.10 Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-1M3 i...	46.4	0.12
ref XM_003022415.1 Trichophyton verrucosum HKI 0517 hypothet...	42.8	1.4
ref XM_003011916.1 Arthroderma benhamiae CBS 112371 hypothet...	42.8	1.4
ref NM_001129736.1 Ovis aries cryptochrome 2 (photolyase-lik...	41.0	4.9
gb BC166416.1 Rattus norvegicus cryptochrome 2 (photolyase-l...	41.0	4.9
gb AC187502.3 MACACA MULATTA BAC clone CH250-44H12 from chro...	41.0	4.9
ref NM_133405.1 Rattus norvegicus cryptochrome 2 (photolyase...	41.0	4.9

Per 2:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=273

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
gb JI053551.1 TSA: Bombus insularis Contig9102.Boin mRNA seq...	41.0	4.0
ref XM_003096656.1 Caenorhabditis remanei hypothetical prote...	41.0	4.0
gb EZ982046.1 TSA: Spodoptera littoralis CL1Contig741.Spli m...	41.0	4.0
emb FN357435.1 Schistosoma mansoni genome sequence supercont...	41.0	4.0
ref XM_002179067.1 Phaeodactylum tricornutum CCAP 1055/1 pre...	41.0	4.0

gb|AC231668.1| Solanum tuberosum chromosome 11 clone RH067L08... 41.0 4.0
 gb|AC009424.2|AC009424 Homo sapiens, clone RP11-45E1, complet... 41.0 4.0

Anexo 2.3:

Alinhamentos das sequencias obtidas para isoformas dos genes da via de produção de melatonina, genes constitutivos e genes relógio em *Echinaster brasiliensis*:

RPL37a:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters

Query length=573

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gb HP122905.1 TSA: Patiria miniata isotig18143.Pminagast mRNA...	107	7e-20
gb EZ555044.1 TSA: Crepidula fornicata 14941.Cfedg, mRNA seq...	50.0	0.017
gb HP950875.1 TSA: Eulaema nigrita Contig20806.Euni mRNA seq...	44.6	0.73
gb HP837696.1 TSA: Apis florea Contig16364.Apfl mRNA sequence	44.6	0.73
gb CP001429.2 Blattabacterium sp. (Periplaneta americana) st...	44.6	0.73
ref XM_002428027.1 Pediculus humanus corporis hypothetical p...	44.6	0.73
emb CT573359.10 Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-106J3...	44.6	0.73
emb AM451674.2 Vitis vinifera contig VV78X108231.5, whole ge...	44.6	0.73
gb EZ563307.1 TSA: Crepidula fornicata 23205.Cfedg, mRNA seq...	42.8	2.6
gb AE014188.3 Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 12, compl...	42.8	2.6
gb AC140358.2 Mus musculus BAC clone RP24-234L7 from 3, comp...	42.8	2.6

TPH:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters

Query length=196

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
emb X53501.1 Rat mRNA for tryptophan hydroxylase (EC 1.14.16.4)	42.8	0.77
gb AF289664.1 AF289664 Mus musculus CYLN2, RFC2, WBSCR15, and...	41.0	2.7
gb AC166938.5 Mus musculus BAC clone RP23-85H24 from chromos...	41.0	2.7
gb EZ409885.1 TSA: Jatropha curcas Contig2604, mRNA sequence	39.2	9.4
gb AC186170.1 Ornithorhynchus anatinus chromosome UNK clone ...	39.2	9.4
gb AC122274.4 Mus musculus BAC clone RP23-228J3 from 14, com...	39.2	9.4
emb CR545462.25 Zebrafish DNA sequence from clone DKEYP-88F5...	39.2	9.4
gb AC099860.13 Mus musculus chromosome 1, clone RP23-5C23, c...	39.2	9.4

AANAT:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters

Query length=374

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gb GQ131771.1 Macaca fascicularis isolate Nc00097 MHC class ...	46.4	0.13
gb FJ267029.1 Plethodon caddoensis voucher DBS 1005 NADH deh...	46.4	0.13
emb AM295870.1 Macaca fascicularis partial mRNA for MHC clas...	46.4	0.13
gb FJ236925.1 Macaca mulatta clone T08A-99Pct-Ctg1 MHC class...	44.6	0.46
gb AC241602.2 Chlorocebus aethiops BAC clone CH252-146I12 fr...	44.6	0.46

^a De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

gb|AF020687.1|AF020687 Saguinus oedipus MHC class I antigen S... 44.6 0.46
 gb|HQ113963.1| Macaca fascicularis MHC class I antigen (Mafa-... 42.8 1.6
 ref|NG_009778.1| Homo sapiens lecithin-cholesterol acyltransf... 42.8 1.6
 dbj|AB444917.1| Macaca mulatta Mamu-A mRNA for MHC class I an... 42.8 1.6
 gb|DQ995125.1| Plethodon metcalfi voucher RH 76539 NADH dehyd... 42.8 1.6
 gb|EF112536.1| Macaca mulatta MHC class I antigen (Mamu-A) ge... 42.8 1.6

Clock:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=400

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
emb FP565814.1 Salinibacter ruber M8 chromosome, complete ge...	42.8	1.7
ref NR_026907.1 Mus musculus Williams Beuren syndrome chromo...	42.8	1.7
gb AC013714.8 Homo sapiens chromosome , clone RP11-22P4, com...	42.8	1.7
dbj AK017044.1 Mus musculus adult male testis cDNA, RIKEN fu...	42.8	1.7
emb FN357374.1 Schistosoma mansoni genome sequence supercont...	41.0	6.1
ref XM_001441987.1 Paramecium tetraurelia hypothetical prote...	41.0	6.1
ref XM_746628.1 Aspergillus fumigatus Af293 nucleoporin SONB...	41.0	6.1
gb AF286884.4 Homo sapiens chromosome 8 clone RP11-597D18 ma...	41.0	6.1
emb Y09854.1 Ryegrass mosaic virus, complete genome	41.0	6.1

Bmal:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=342

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
dbj AB012600.1 Rattus norvegicus mRNA for BMAL1b, complete cds	587	2e-164
dbj AB012601.1 Mus musculus mRNA for BMAL1b', complete cds	518	7e-144
gb AY316534.1 Phodopus sungorus Bmal1 protein (Bmal1) mRNA, ...	504	2e-139
gb AF070917.1 AF070917 Mesocricetus auratus bHLH-PAS transcri...	500	2e-138
dbj D89722.1 Homo sapiens mRNA for BMAL1a, complete cds	477	2e-131
gb AF205219.1 AF205219 Gallus gallus clock protein (BMAL1) mR...	322	1e-84
gb AY150849.1 Tyto alba BMAL1 (Bmal1) mRNA, partial cds	304	3e-79
dbj AB086232.1 Mus musculus genes for BMAL1b', BMAL1b, BMAL1...	178	3e-41
dbj AB199911.1 Hyla japonica mRNA for BMAL-1, complete cds	159	8e-36
ggb DQ841151.1 Lutzomyia longipalpis cycle (bmal1) mRNA, comp...	66.2	1e-07

Cry 1:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=234

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
gb AF156986.1 AF156986 Mus musculus cryptochrome 1 (Cry1) mRN...	291	1e-75
ref XM_857660.1 PREDICTED: Canis familiaris similar to crypt...	250	4e-63
ref XM_002711421.1 PREDICTED: Oryctolagus cuniculus cryptoch...	246	4e-62
emb AJ606298.1 Spalax judaei mRNA for sCRY1 protein	241	2e-60
ref XM_002927658.1 PREDICTED: Ailuropoda melanoleuca cryptoc...	237	2e-59
ref NM_004075.3 Homo sapiens cryptochrome 1 (photolyase-like...	221	2e-54
dbj AB074458.1 Macaca fascicularis mRNA for cryptochrome 1, ...	212	9e-52
ref NM_001105415.1 Bos taurus cryptochrome 1 (photolyase-lik...	210	3e-51
ref NM_001129735.1 Ovis aries cryptochrome 1 (photolyase-lik...	206	4e-50
gb EF015898.1 Homo sapiens photolyase-like cryptochrome 1 (C...	123	4e-25
emb AJ632120.1 Sylvia borin mRNA for cryptochrome 1 (cry1 gene)	114	2e-22
ref NM_204245.1 Gallus gallus cryptochrome 1 (photolyase-lik...	111	2e-21

gb|DQ376040.1| Podarcis sicula cryptochrome 1 (CRY1) mRNA, co... 96.9 5e-17
 gb|AY049033.1| Xenopus laevis cryptochrome 1 mRNA, complete cds 57.2 4e-05
 ref|XM_001466503.1| Leishmania infantum hypothetical protein ... 41.0 3.3
 gb|AC007192.1|AC007192 Homo sapiens chromosome 19, cosmid R27... 41.0 3.3
 dbj|AB011133.1| Homo sapiens mRNA for KIAA0561 protein, parti... 41.0 3.3

Cry2:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=239

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
ref XM_001319614.1 Trichomonas vaginalis G3 hypothetical pro...	46.4	0.080
emb FR799610.1 Leishmania donovani BPK282A1 complete genome,...	42.8	0.98
emb FR796455.1 Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 23	42.8	0.98
emb FQ211347.1 Rattus norvegicus TL0ABA12YH06 mRNA sequence	42.8	0.98
ref NM_001129736.1 Ovis aries cryptochrome 2 (photolyase-lik...	42.8	0.98
gb BC166416.1 Rattus norvegicus cryptochrome 2 (photolyase-l...	42.8	0.98
ref XM_002592136.1 Branchiostoma floridae hypothetical prote...	41.0	3.4
ref XM_001780539.1 Physcomitrella patens subsp. patens predi...	41.0	3.4
emb AM479387.1 Vitis vinifera contig VV78X031251.3, whole ge...	41.0	3.4
gb AC096909.10 Rattus norvegicus 8 BAC CH230-88B13 (Children...	41.0	3.4

Per 2 a:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=353

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
ref NM_031678.1 Rattus norvegicus period homolog 2 (Drosophi...	42.8	1.5
gb EZ727036.1 TSA: Arachis hypogaea CL1Contig6052.Arhy mRNA ...	41.0	5.3
gb BC167236.1 Synthetic construct Mus musculus clone IMAGE:1...	41.0	5.3
ref XM_001805748.1 Phaeosphaeria nodorum SN15 hypothetical p...	41.0	5.3
ref NM_011066.3 Mus musculus period homolog 2 (Drosophila) (...)	41.0	5.3
dbj AK122253.1 Mus musculus mRNA for mKIAA0347 protein	41.0	5.3
gb AF035830.1 AF035830 Mus musculus PERIOD 2 (Per2) mRNA, com...	41.0	5.3

Per 2 b:

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=616

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
ref NM_001039025.2 Rattus norvegicus talin 1 (Tln1), mRNA	46.4	0.23
gb BC100262.1 Rattus norvegicus talin 1, mRNA (cDNA clone MG...	46.4	0.23
gb FJ185172.1 Callorhinchus milii prosapip1 (prosapip1), Ubo...	44.6	0.79
emb FP101909.6 Zebrafish DNA sequence from clone CH73-137I19...	44.6	0.79
gb AC189306.2 Brassica rapa subsp. pekinensis clone KBrB032C...	44.6	0.79
gb AC131039.7 Mus musculus chromosome 1, clone RP23-274I23, ...	44.6	0.79
emb AL669931.9 Mouse DNA sequence from clone RP23-31D18 on c...	44.6	0.79
dbj AP012052.1 Microbacterium testaceum StLB037 DNA, complet...	42.8	2.8
gb CP002383.1 Shewanella baltica OS678, complete genome	42.8	2.8
dbj AP009153.1 Gemmatimonas aurantiaca T-27 DNA, complete ge...	42.8	2.8
gb CP001252.1 Shewanella baltica OS223, complete genome	42.8	2.8
emb CU611034.5 Mouse DNA sequence from clone RP24-176O7 on c...	42.8	2.8
emb CR391965.9 Zebrafish DNA sequence from clone CH211-124O1...	42.8	2.8

gb|CP000891.1| *Shewanella baltica* OS195, complete genome 42.8 2.8
 gb|AC154497.2| *Mus musculus* BAC clone RP24-112C15 from chromo... 42.8 2.8
 emb|AL928630.15| Mouse DNA sequence from clone RP23-33P17 on ... 42.8 2.8
 emb|CR391414.1| *Gallus gallus* finished cDNA, clone ChEST654115 42.8 2.8

Anexo 2.4:

Alinhamentos das sequencias obtidas para isoformas dos genes da via de produção de melatonina, genes constitutivos e genes relógio em *Phragmatopoma lapidosa*:

RPL37a

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters

Query length=281

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
gb HP904114.1 TSA: <i>Exoneura robusta</i> Contig10563.Exro mRNA se...	42.8	1.2
gb EU369761.1 <i>Carica papaya</i> male Y chromosome BAC clone DM62K...	42.8	1.2
gb CP000885.1 <i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg, complete genome	42.8	1.2
gb CP000724.1 <i>Alkaliphilus metalliredigens</i> QYMF, complete ge...	42.8	1.2
gb AC126264.3 <i>Mus musculus</i> BAC clone RP23-376F13 from chromo...	42.8	1.2
gb CP000053.1 <i>Rickettsia felis</i> URRWXCal2, complete genome	42.8	1.2
gb EZ488175.1 TSA: <i>Mustela putorius furo</i> Ferret_c31736, comp...	41.0	4.1
gb AC238780.1 <i>Phlebotomus papatasi</i> BAC clone PLPAAEX-20H12 f...	41.0	4.1
emb FN357476.1 <i>Schistosoma mansoni</i> genome sequence supercont...	41.0	4.1
gb CP001186.1 <i>Bacillus cereus</i> G9842, complete genome	41.0	4.1
gb CP000440.1 <i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD chromosome 1, comp...	41.0	4.1
gb AC079386.23 <i>Homo sapiens</i> 12 BAC RP11-12K13 (Roswell Park ...	41.0	4.1
emb AL713921.15 Mouse DNA sequence from clone RP23-475A8 on ...	41.0	4.1

TPH

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters

Query length=212

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
ref NM_001100634.2 <i>Rattus norvegicus</i> tryptophan hydroxylase ...	349	4e-93
ref NM_009414.2 <i>Mus musculus</i> tryptophan hydroxylase 1 (Tph1)...	300	2e-78
gb AY034600.1 <i>Mesocricetus auratus</i> tryptophane hydroxylase m...	289	4e-75
ref NM_001197191.1 <i>Canis lupus familiaris</i> tryptophan hydroxy...	255	7e-65
ref NM_001099955.1 <i>Oryctolagus cuniculus</i> tryptophan hydroxyl...	250	3e-63
ref NM_204956.1 <i>Gallus gallus</i> secretion regulating guanine n...	208	1e-50
gb EU796671.1 <i>Pan troglodytes</i> tryptophan hydroxylase 1 (TPH1)...	161	1e-36
ref NM_001032676.1 <i>Takifugu rubripes</i> non-neuronal tryptophan...	152	7e-34
gb DQ334747.1 <i>Acanthopagrus schlegelii</i> tryptophan hydroxylas...	118	1e-23

Clock

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters

Query length=322

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
dbj AB019259.1 <i>Rattus norvegicus</i> clock mRNA for CLOCK-S, spl...	345	9e-92
gb AF000998.1 MAF000998 <i>Mus musculus</i> CLOCK (Clock) mRNA, com...	300	3e-78
emb AJ318059.1 <i>Spalax judaei</i> mRNA for clock protein	282	9e-73
gb BC126159.1 <i>Homo sapiens</i> clock homolog (mouse), mRNA (cDNA)...	246	6e-62
ref NM_001130932.1 <i>Ovis aries</i> clock homolog (mouse) (CLOCK),...	214	4e-52

ref|XM_002688257.1| PREDICTED: Bos taurus clock-like (LOC1003... 205 2e-49
 gb|AF097457.1|HSCLOCK16 Homo sapiens clock (CLOCK) gene, exon 20 174 3e-40
 gb|AF246959.1| Gallus gallus CLOCK (CLOCK) mRNA, complete cds 141 2e-30
 dbj|AB029889.1| Coturnix coturnix japonica qClock mRNA for ci... 136 8e-29

Bmal

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=393

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
gb HP228673.1 TSA: Placobranchus ocellatus 64829.Plocadult m...	51.8	0.003
gb AC022024.7 Homo sapiens chromosome 10 clone RP11-432B10, ...	50.0	0.012
gb CP000499.1 Pichia stipitis CBS 6054 chromosome 5, complet...	46.4	0.14
gb AC121290.6 Mus musculus chromosome 16, clone RP23-84N4, c...	46.4	0.14
dbj AB023042.1 Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome ...	44.6	0.49
gb AC243204.4 Rattus norvegicus Y Chr BAC RNECO-149P10 (Ampl...	42.8	1.7
gb AC120404.25 Mus musculus chromosome 6, clone RP24-405O23,...	42.8	1.7
gb AC079799.7 Homo sapiens BAC clone RP11-665O4 from 7, comp...	42.8	1.7
gb AC146759.29 Medicago truncatula clone mth2-173e19, comple...	42.8	1.7
gb CP000993.1 Borrelia recurrentis A1, complete genome	41.0	6.0
ref XM_001453585.1 Paramecium tetraurelia hypothetical prote...	41.0	6.0
emb AM447534.1 Vitis vinifera contig VV78X062970.18, whole g...	41.0	6.0

Cry1

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=432

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
gb AC206442.3 Pongo abelii BAC clone CH276-275I9 from chromo...	46.4	0.16
gb AC197623.5 Rhesus Macaque BAC CH250-509F3 () complete seq...	46.4	0.16
emb AL136524.24 Human DNA sequence from clone RP11-78L19 on ...	46.4	0.16
gb AC121113.13 Mus musculus chromosome 1, clone RP23-53N22, ...	44.6	0.54
gb AC005368.1 Homo sapiens chromosome 5, BAC clone 194j18 (L...	41.0	6.6
emb CR933577.9 Zebrafish DNA sequence from clone CH211-243G1...	41.0	6.6
emb CR858779.1 Pongo abelii mRNA; cDNA DKFZp469P0239 (from c...	41.0	6.6
gb AC007357.2 F3F19 Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC F3F...	41.0	6.6

Per1

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
 15,639,775 sequences; 36,185,985,577 total letters
 Query length=481

	Score	E
Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
dbj BA000019.2 Nostoc sp. PCC 7120 DNA, complete genome	44.6	0.61
ref XM_003107623.1 Caenorhabditis remanei hypothetical prote...	41.0	7.4
gb EZ958505.1 TSA: Bemisia tabaci BT_Q_ZJU_Singletons166335 ...	41.0	7.4
ref XM_001456537.1 Paramecium tetraurelia hypothetical prote...	41.0	7.4
gb CP000117.1 Anabaena variabilis ATCC 29413, complete genome	41.0	7.4
gb AC122520.2 Mus musculus BAC clone RP24-470M22 from 6, com...	41.0	7.4
gb AC004257.1 AC004257 Homo sapiens chromosome 19, cosmid R33...	41.0	7.4
gb AC134843.4 Mus musculus BAC clone RP24-388C21 from 3, com...	41.0	7.4

Anexo 3: Resultados do Microarranjo em *Nematostella vectensis*

3.1: Genes com variação de ao menos 10x ao longo do dia nos regimes claro-escuro, escuro constante e escuro constante com suplementação de melatonina

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
224942_fgenesl1_pg_scaffold_6757000	similar to GTP-binding protein	3.0E-21	Rattus norvegicus	mo:299312
001	Hs10801345	0 none		NA
143158_e_gw_751_3_1	Platelet-endothelial tetraspan antigen 3	1,40E-45	Mus musculus	NA
171463_estExt_gwp_C_1770062	NA	NA	NA	NA
238778_estExt_fgenesl1_pg_C_80109	NA	NA	NA	NA
233046_fgsh_est_C_scaffold_12300000	NA	NA	NA	NA
3	similar to RIKEN cDNA 1300018P11	2.4E-19	Rattus norvegicus	mo:297481
110469_e_gw_100_124_1	Hs7657313	0 none		NA
241591_estExt_fgenesl1_pg_C_470123	glycine-rich RNA-binding protein 8	1,70E-35	Arabidopsis thaliana	ath:At4g39260
246171_estExt_fgenesl1_pg_C_201001	Hs14211907	0 none		NA
135772_e_gw_361_16_1	zinc finger protein 62	0 none		2240,8652
244343_estExt_fgenesl1_pg_C_118006	Ggamma30A gene product	8,00E-18	Drosophila melanogaster	dme:CG3694
238752_estExt_fgenesl1_pg_C_80071	CG11686-PA	3,80E-14	Drosophila melanogaster	dme:CG11686
167199_estExt_gwp_C_840046	membrane-anchored cell surface protein	0 none		1093,7692
247162_estExt_fgenesl1_pg_C_273002	Hs7705724	0 none		NA
4	CE18732	0 none		NA
197093_fgenesl1_pg_scaffold_4000173	At4g28390	0 none		NA
103440_e_gw_68_150_1	Hs20562268	7,00E-28		NA
141488_e_gw_581_7_1	Hs6005733	8,10E-35		NA
1167_gw_405_4_1	Calmodulin (CaM)	0 Metridium senile		NA
67478_gw_69_244_1	CE27917	1,10E-07		NA
88970_e_gw_20_142_1	Extracellular matrix protein FRAS1 precursor	2.0E-11	Mus musculus	UniProtKB: Q80T14.1
99547_e_gw_53_232_1	casein kinase 2 beta	0	Danio rerio	dre:30428
198910_fgenesl1_pg_scaffold_1200013	CG11015 gene product	2,20E-24	Drosophila melanogaster	dme:CG11015
19259_gw_2090_1_1	52 kDa repressor of the inhibitor of the protein k	1.4E-40	Homo sapiens	UniProtKB: O43422.2
116927_e_gw_142_109_1	ATPase, H+ transporting, V0 subunit c	8,70E-26	Danio rerio	dre:192336
111202_e_gw_104_57_1	7292401	8,20E-17	none	NA
148023_e_gw_2234_2_1	Hs20562268	1,40E-24	none	NA
119155_e_gw_159_23_1	7293713	0 none		NA
137512_e_gw_402_32_1	RAB8A, member RAS oncogene family	0	Mus musculus	mmu:17274
86632_e_gw_13_399_1	similar to eIF-1A	8,20E-32	Rattus norvegicus	mo:317163
166681_estExt_gwp_C_770030	Hs18765735	0 none		NA
6272_gw_1795_6_1	DNA-binding protein HU homolog (Histone-like	2,90E-10	Mycobacterium smegmatis	NA
229104_fgenesl1_pm_scaffold_530000	60S ribosomal protein L24	1,20E-38	Danio rerio	NA
19	Hs22059732	5,00E-06	none	NA
76009_gw_53_305_1	52 kDa Death associated protein 4	0	Homo Sapiens	NA
130699_e_gw_283_35_1				
9531_gw_6558_1_1				
111202_e_gw_104_57_1				

3.2: Genes com variação de ao menos 10x ao longo do dia nos regimes claro-escuro e escuro constante.

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
127536_e_gw_239_69_1	KAT protein	2,00E-17	Homo sapiens	NA
240988_estExt_fgenesH1_pg_C_380007	UN	1,60E-10	Caenorhabditis elegans	cel:K09A9.6
241289_estExt_fgenesH1_pg_C_430046	NA	NA	NA	NA
231023_fgenesH1_pm_scaffold_347000002	similar to POLYPOSIS LOCUS PROTEIN 1	0	Rattus norvegicus	mo:364838
141604_e_gw_590_13_1	7301766	6,20E-31	none	NA
153808_e_gw_6595_1_1	Ficolin-2 precursor	1,50E-33	Rattus norvegicus	NA
208806_fgenesH1_pg_scaffold_97000039	Sialidase (Neuraminidase) (Major surface antigen)	1,10E-14	Trypanosoma cruzi	NA
238047_estExt_fgenesH1_pg_C_30078	Hypothetical protein	0	NA	1657,7546
243274_estExt_fgenesH1_pg_C_830095	NA	NA	NA	NA
118094_e_gw_151_51_1	similar to up-regulated gene 4	1,70E-18	Rattus norvegicus	mo:305493
221035_fgenesH1_pg_scaffold_643000001	Protein KIAA0690 homolog	2,30E-16	Gallus gallus	gi 71153786 sp Q5
184645_estExt_GenewiseH1_C_600185	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	0	Rattus norvegicus	mo:25050

3.3: Genes com variação de ao menos 10x ao longo do dia nos regime claro-escuro.

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
222341_fgenesl1_pg_scaffold_1550000001	Hs7706049	1,10E-07	NA	NA
248519_estExt_fgenesl1_pg_C_6090008	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	0	Homo sapiens	gij6648067 sp P40926
240423_estExt_fgenesl1_pg_C_290030	similar to RIKEN cDNA 2010001M09	3,6E-14	Rattus norvegicus	mo:291675
32913_gw_1_126_1	Fbn1; fibrillin 1	0.0	Mus musculus	mmu:14118
146705_e_gw_1751_3_1	Delta-like protein C precursor	2,50E-29	Danio rerio	NA
200173_fgenesl1_pg_scaffold_20000011	CD59 glycoprotein precursor	5,00E-06	Pongo pygmaeus	NA
197296_fgenesl1_pg_scaffold_5000102	Collagen alpha 1(XII) chain precursor	0.0	NA	NA
180603_estExt_GenewiseH_1_C_200237	Hs13376840	0	none	NA
170611_estExt_gwp_C_1510074	At5g58070	3,20E-13	none	NA
248713_estExt_fgenesl1_pg_C_14780002	Cell death specification protein 2	2,9E-9	Caenorhabditis elegans	gij2497477 sp Q94126
236522_estExt_fgenesl1_kg_C_200006	Calmodulin (CaM)	9,50E-42	Physarum polycephalum	NA
217041_fgenesl1_pg_scaffold_281000012	Ras-like protein 1	9,90E-42	Physarum polycephalum	NA
238099_estExt_fgenesl1_pg_C_30181	carbonyl reductase 1	0	Rattus norvegicus	mo:29224
206996_fgenesl1_pg_scaffold_75000090	NA	NA	NA	NA
142175_e_gw_646_4_1	similar to A1428795 protein	7,90E-18	Rattus norvegicus	mo:304558
228159_fgenesl1_pm_scaffold_8000030	HIST1H2BB, H2BFF; histone 1, H2bb	2,4E-37	Homo sapiens	hsa:3018
241309_estExt_fgenesl1_pg_C_430090	NA	NA	NA	NA
245997_estExt_fgenesl1_pg_C_1910004	NA	NA	NA	NA
243050_estExt_fgenesl1_pg_C_780026	Endoglucanase E precursor(Endo-1,4-beta-glucan	1,1E-9	Clostridium thermocellum	gij121827 sp P10477
61301_gw_1_495_1	Hs4505037	0	none	NA
104534_e_gw_73_152_1	Delayed Anaerobic Gene	3,30E-07	Saccharomyces cerevisiae	see:YJR151C
233027_fgsh_est_C_scaffold_119000011	NA	NA	NA	NA
109844_e_gw_97_149_1	NA	NA	NA	NA
228922_fgenesl1_pm_scaffold_43000001	Pre-mRNA splicing factor 18	0	Mus musculus	NA
238243_estExt_fgenesl1_pg_C_40172	Hypothetical protein ZK643.6 precursor	0,000101	Caenorhabditis elegans	NA
208279_fgenesl1_pg_scaffold_90000047	Hs22052480	0	NA	NA
231164_fgenesl1_pm_scaffold_414000002	Ribosomal protein L40 [KO:K02927]	5,70E-36	Drosophila melanogaster	dme:CG2960-PA
167304_estExt_gwp_C_850174	phosphatase [EC:3.1.3.16]	0	Caenorhabditis elegans	cel:T23F11.1
199838_fgenesl1_pg_scaffold_17000127	hypothetical protein	0.0	NA	NA
63023_gw_13_351_1	Tropomyosin (Allergen Ani s 3)	1,40E-35	Anisakis simplex	NA
238091_estExt_fgenesl1_pg_C_30163	similar to N-acetyltransferase 5	0	Rattus norvegicus	mo:362228

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
171044_estExt_gwp_C_1660057	folliculin-like 1	0	Homo sapiens	hsa:11167
243391_estExt_fgenschl_pg_C_870058	Severin	0	Echinococcus granulosus	NA
88820_e_gw_19_157_1	uromodulin	3,60E-24	Rattus norvegicus	mo:25128
210012_fgenschl_pg_scaffold_115000020	Tropomyosin alpha 4 chain (Tropomyosin 4)	0.0	NA	NA
239726_estExt_fgenschl_pg_C_190019	C-reactive protein precursor	0,000266	Mus musculus	NA
176973_estExt_GenewiseH_1_C_10208	Spec2	5,00E-15	Drosophila melanogaster	dme:CG14672
176499_estExt_gwp_C_11480009	Tubulin alpha-2/alpha-4 chain	0	Patella vulgata	NA
164893_estExt_gwp_C_540142	Cyclin A/CDK2-associated protein p19	0	Homo sapiens]	gi 52783797 sp P63208
170558_estExt_gwp_C_1500043	Eukaryotic translation initiation factor3 subunit12	0	Homo sapiens	NA
242083_estExt_fgenschl_pg_C_560084	NA	NA	NA	NA
125664_e_gw_222_19_1	zgc:56136	2,70E-33	Danio rerio	dre:393167
235524_estExt_fgenschl_pm_C_1650001	Ras which interacts with Calmodulin	0	Drosophila melanogaster	dme:CG8418
3606_gw_402_20_1	Hs20562268	2,30E-23	none	NA
103742_e_gw_69_191_1	Hs4885559	1,50E-28	none	NA
229475_fgenschl_pm_scaffold_79000007	enolase 1, (alpha)	0	Homo sapiens	hsa:2023
87968_e_gw_17_235_1	CD209 antigen-like protein D	8,00E-21	Mus musculus	NA
162983_estExt_gwp_C_350242	Fkbp13 gene product from transcript CG9847-RB	4,20E-44	Drosophila melanogaster	dme:CG9847
244271_estExt_fgenschl_pg_C_1160035	similar to RIKEN cDNA 3010001K23 gene	0	Rattus norvegicus	mo:305623
91287_e_gw_26_192_1	Hs11068135	8,40E-35	none	NA
141095_e_gw_555_8_1	TPR repeat-containing protein KIAA1043	1,50E-15	Mus musculus	NA
191508_estExt_GenewiseH_1_C_2090019	CG13393 gene product	0	Drosophila melanogaster	dme:CG13393
208415_fgenschl_pg_scaffold_92000031	G2/mitotic-specific cyclin B3	0	Gallus gallus	NA
239270_estExt_fgenschl_pg_C_130108	NA	NA	NA	NA
221660_fgenschl_pg_scaffold_899000001	troponin T3a, skeletal, fast	0,000701	Danio rerio	dre:58084
2608_gw_2423_1_1	fibulin 6	0	Rattus norvegicus	mo:289094
93650_e_gw_33_176_1	similar to RIKEN cDNA 1110004B13	0	Rattus norvegicus	mo:287421

3.4: Genes com variação de ao menos 10x ao longo do dia nos regimes escuro constante e escuro constante com suplementação de melatonina

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
248122_estExt_fgenes1_pg_C_4240002	GTP-binding ADP-ribosylation factor protein evl-2	6.3E-27	Caenorhabditis elegans	NA
247629_estExt_fgenes1_pg_C_3270007	Translation initiation factor IF-2	1.34E-4	Mesorhizobium loti	gi 39931302 sp Q98BI8
80765_e_gw_3_600_1	Variant surface antigen D precursor	7.60E-07	Mycoplasma hyorhinis	NA
201160_fgenes1_pg_scaffold_260000089	ATP synthase protein 8 (ATPase subunit 8) (A6L)	3.00E-30	Metridium senile	NA
247005_estExt_fgenes1_pg_C_2610031	similar to RIKEN cDNA 2310068O22	0 NA	0 NA	NA
244012_estExt_fgenes1_pg_C_1040039	NA	NA NA	NA NA	NA
130673_e_gw_283_24_1	Tripartite motif protein 56 (RING finger protein 109)	1.4E-30	[Homo sapiens	gi 56749788 sp Q9BRZ2
245160_estExt_fgenes1_pg_C_1480011	Hs7705608	0 none	0 none	NA
217487_fgenes1_pg_scaffold_299000015	similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	5.9E-8	Rattus norvegicus	rno:302780
111058_e_gw_103_81_1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 23 kDa subunit	0	Mus musculus	NA
46075_gw_1836_3_1	60S ribosomal protein L13	2.00E-39	Ictalurus punctatus	NA
162114_estExt_gwp_C_270074	Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit	0	Torpedo marmorata	NA
238552_estExt_fgenes1_pg_C_60151	Microsomal glutathione S-transferase 1	2.00E-30	Rattus norvegicus	NA
137471_e_gw_401_17_1	Adenomatous polyposis coli homolog (APC protein)			NA
239595_estExt_fgenes1_pg_C_170015	ATP synthase gamma chain, mitochondrial precursor	0	Bos taurus	NA
216049_fgenes1_pg_scaffold_247000018	Hs22058824	1,70E-05	none	NA
228495_fgenes1_pm_scaffold_21000004	Histone H2B	0	Oncorhynchus mykiss	NA
190767_estExt_GenewiseH_1_C_1800042	Calumenin precursor	0	Homo sapiens	gi 5921197 sp Q43852
241995_estExt_fgenes1_pg_C_550017	NA	NA NA	NA NA	NA
245960_estExt_fgenes1_pg_C_1870024	Kinesin-like protein KIF1A	0	Homo sapiens	gi 2497523 sp Q12756
122461_e_gw_190_93_1	Hs13994129	5.00E-09	none	NA
197029_fgenes1_pg_scaffold_4000109	leucine-rich repeat family protein/extensin	3.40E-09	Arabidopsis thaliana	ath:At3g19020
238760_estExt_fgenes1_pg_C_80084	NA	NA NA	NA NA	NA
194326_estExt_GenewiseH_1_C_3610026	Voltage-dependent anion-selective channel 2	0	Meleagris gallopavo	NA
198390_fgenes1_pg_scaffold_9000179	similar to chemokine receptor		NA	NA
214431_fgenes1_pg_scaffold_200000013	RNA polymerase II transcription factor SIII	0	Rattus norvegicus	gi 48428883 sp P83941
235477_estExt_fgenes1_pm_C_1510005	Epsin 1	1.50E-18	Rattus norvegicus	rno:117277
225542_fgenes1_pg_scaffold_929300000	hydroxyproline-rich glycoprotein precursor	0.000493	Rattus norvegicus	rno:289281
101766_e_gw_61_306_1	Hypothetical protein K04G7.4a	0	Dictyostelium discoideum	ddi:ng729
230591_fgenes1_pm_scaffold_21600000	Protein C9orf64	0	Homo sapiens	NA
198111_fgenes1_pg_scaffold_8000152	Histone H2B	0	Salmo trutta	NA

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
247445_estExt_fgenesH1_pg_C_3030021	NA	NA NA	NA	NA
241672_estExt_fgenesH1_pg_C_490049	NA	NA NA	NA	NA
214250_fgenesH1_pg_scaffold_195000031	Protein C14orf152	1.7E-5	Homo sapiens	gi 68565220 sp Q8N9Y4
248880_estExt_fgenesH1_pg_C_71340001	NA	NA NA	NA	NA
237113_estExt_fgenesH1_kg_C_1180004	Hs13775200	1,26E-44	none	NA
69163_gw_1201_13_1	NA	NA NA	NA	NA
9075_gw_7542_5_1	Histone H2B	1.7E-33	Gallus gallus	gi 122050 sp P02279
88731_e_gw_19_198_1	Translocation protein SEC63 homolog	0	Homo sapiens	NA
206063_fgenesH1_pg_scaffold_660000003	Methylenetetrahydrofolate reductase	1.4E-33	Mus musculus	gi 10720103 sp Q9WU20
24738_gw_150_67_1	NACHT-, LRR- and PYD-containing protein 14	8,70E-42	Homo sapiens	NA
158857_estExt_gwp_C_50393	Gamma-aminobutyric acid type B receptor	0	Homo sapiens	gi 12643641 sp O75899
245041_estExt_fgenesH1_pg_C_1430004	Casein kinase II beta subunit (CK II beta)	0	Rattus norvegicus	gi 54037491 sp P67874
109917_e_gw_97_54_1	similar to CG32602-PA	1,50E-09	Rattus norvegicus	rno:302573
66354_gw_6659_3_1	NA	NA NA	NA	NA
245604_estExt_fgenesH1_pg_C_1690014	LOC298384; similar to RIKEN cDNA	0	Rattus norvegicus	rno:298384
236584_estExt_fgenesH1_kg_C_260018	Hs4826651	0	none	NA
235057_estExt_fgenesH1_pm_C_880008	similar to RIKEN cDNA 2010316F05	0	Rattus norvegicus	rno:289864
9033_gw_3821_1_1	Transcription intermediary factor 1-gamma	6.3E-12	Homo sapiens	gi 12643365 sp Q9JUPN9
169949_estExt_gwp_C_1360081	Coagulation factor V precursor	1,00E-35	Bos taurus	NA
206531_fgenesH1_pg_scaffold_700000068	HISTONE H1	NA	NA	NA
192646_estExt_GenewiseH_1_C_2520032	glutathione S-transferase	8.8E-29	Caenorhabditis elegans	cel:R07B1.4
213429_fgenesH1_pg_scaffold_176000012	Tubulin beta chain (Beta tubulin)	0	Paracentrotus lividus	NA
115087_e_gw_129_55_1	Nucleoside diphosphate kinase B	0	Rattus norvegicus	NA
244724_estExt_fgenesH1_pg_C_1320026	NA	NA NA	NA	NA
126046_e_gw_227_54_1	G2/mitotic-specific cyclin-B	0	Marthasterias glacialis	NA
128450_e_gw_250_34_1	mitochondrial ribosomal protein L38	0	Rattus norvegicus	rno:303685
35350_gw_13_150_1	mercaptopyruvate sulfurtransferase	0	Rattus norvegicus	rno:192172
201105_fgenesH1_pg_scaffold_260000034	Voltage-gated potassium channel	6,70E-07	Streptomyces lividans	NA
235516_estExt_fgenesH1_pm_C_1610003	proteasome subunit, alpha type, 3	0	Homo sapiens	hsa:5684
179589_estExt_GenewiseH_1_C_130196	Yippee-like protein 2	0	Cercopithecus aethiops	gi 55583876 sp Q65Z58
238420_estExt_fgenesH1_pg_C_50219	NA	NA NA	NA	NA

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
181063_estExt_GenewiseH_1_C_250015	GABA(A) receptor-associated protein-like 2	0	Homo sapiens	hsa:11345
225818_fgenesH1_pg_scaffold_12570000001	Tail-specific protease precursor (Protease Re)	0	Salmonella typhimurium	NA
117697_e_gw_148_72_1	Cathepsin Z precursor	0	Mus musculus	NA
158576_estExt_gwp_C_40293	farnesyltransferase, CAAX box, alpha	0	Homo sapiens	hsa:2339
92405_e_gw_30_233_1	ETS domain protein Elk-3 ETS-related protein	5.5E-28	Homo sapiens	gi 1171688 sp P41970
134340_e_gw_335_11_1	Emopamil-binding protein-like	0	Mus musculus	NA
248354_estExt_fgenesH1_pg_C_5250005	NA	NA	NA	NA
13173_gw_197_7_1	similar to RIKEN cDNA	0	Rattus norvegicus	rno:313521
139284_e_gw_469_27_1	selenoprotein T, 1b	2,20E-43	Danio rerio	dre:352921
108930_e_gw_92_43_1	Hs8923657	0	none	NA
140687_e_gw_538_45_1	NA	NA	NA	NA
173646_estExt_gwp_C_2620006	40S ribosomal protein S4	0	Cricetulus griseus	NA
191841_estExt_GenewiseH_1_C_2180085	peptidylprolyl isomerase B	0	Mus musculus	mmu:19035
246319_estExt_fgenesH1_pg_C_2110022	Selenoprotein S	1,10E-26	Homo sapiens	NA
171933_estExt_gwp_C_1940073	polymerase (RNA) II polypeptide L, 7.6kDa	4,50E-41	Homo sapiens	hsa:5441
243086_estExt_fgenesH1_pg_C_790033	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0	Mus musculus	NA
164353_estExt_gwp_C_490075	Cytochrome c	0	Meleagris gallopavo	NA
195585_estExt_GenewiseH_1_C_7360021	growth factor receptor-bound protein 2	2,38E-44	Homo sapiens	hsa:2885
242285_estExt_fgenesH1_pg_C_610004	ADP ribosylation factor 79F	0	Drosophila melanogaster	dme:CG8385
202514_fgenesH1_pg_scaffold_35000102	NA	NA	NA	NA
240003_estExt_fgenesH1_pg_C_230020	LOC362056; similar to RIKEN cDNA	4,6E-23	Rattus norvegicus	rno:362056
245162_estExt_fgenesH1_pg_C_1480013	40S ribosomal protein S16	0	Heteropneustes fossilis	NA
165919_estExt_gwp_C_660144	Thioredoxin-like protein 1	0	Mus musculus	NA
179696_estExt_GenewiseH_1_C_130405	CE04834	2,90E-39	none	NA
189079_estExt_GenewiseH_1_C_1350026	macrophage migration inhibitory factor		NA	NA
181446_estExt_GenewiseH_1_C_280093	Hs7705819	1,50E-32	none	NA
49232_gw_3929_3_1	Cytochrome c oxidase polypeptide Vlb	2.1E-18	Mus musculus	gi 3023546 sp P56391
28519_gw_123_37_1	BBF-2 (drosophila) homolog	0	Rattus norvegicus	rno:362339
63059_gw_310_136_1	UN	1,50E-08	Saccharomyces cerevisiae	sce:YLR154W
100746_e_gw_58_327_1	NF-X1 type zinc finger containing protein	7.2E-43	rattus norvegicus	rno:364700
131805_e_gw_300_12_1	solute carrier family 16, member 10		NA	NA

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
112961_e_gw_115_68_1	Phosphoglyceromutase 1	0	Methanosarcina acetivorans	gij27734313 sp Q8TMl6
189130_estExt_GenewiseH_1_C_1350152	Flotillin-2a (Reggie-1a) (REG-1)	0	Danio rerio	NA
154398_e_gw_7285_33_1	NA	NA	NA	NA
29324_gw_132_85_1	Cysteine string protein (CCCS1)	2,10E-37	Torpedo californica	NA
2155_gw_3320_1_1	Dynein heavy chain (DYHC)	7,90E-24	Oncorhynchus mykiss	NA
240847_estExt_fgenesH1_pg_C_350075	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+]	0	Takifugu rubripes	gij6016144 sp O57656
215499_fgenesH1_pg_scaffold_229000043	IN	8,60E-09	Caenorhabditis elegans	cel:C11G6.3
12479_gw_291_4_1	NA	NA	NA	NA
105181_e_gw_76_208_1	similar to nuclear transplantation upregulated 1	4,60E-19	Rattus norvegicus	rno:307081
161775_estExt_gwp_C_240220	discs, large homolog 1 (Drosophila)	0	Mus musculus	mmu:13383
76946_gw_2815_3_1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	0	Metridium senile	NA
169537_estExt_gwp_C_1280092	Protein FAM18B	0	Mus musculus	NA
186301_estExt_GenewiseH_1_C_820044	zinc finger protein 259	0	Mus musculus	mmu:22687
242065_estExt_fgenesH1_pg_C_560039	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin) (OICA1)	0	Oryzias latipes	NA
240907_estExt_fgenesH1_pg_C_370006	Transmembrane 9 superfamily protein member 4	0	Rattus norvegicus	rno:296279
17799_gw_229_69_1	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit	5,60E-38	Bos taurus	NA
245654_estExt_fgenesH1_pg_C_1710020	phosphoethanolamine N-methyltransferase 2	6,80E-18	Arabidopsis thaliana	ath:At1g48600
198406_fgenesH1_pg_scaffold_9000195	Hs7657015	0	none	NA
101050_e_gw_59_85_1	DS RNA binding protein A	6,60E-15	Xenopus laevis	NA
96919_e_gw_44_154_1	Peptide methionine sulfoxide reductase msrB	0	Pseudomonas syringae	NA
59245_gw_2243_12_1	notch gene homolog 2, (Drosophila)	4,40E-32	Rattus norvegicus	rno:29492
145781_e_gw_1509_2_1	Pancreatic secretory granule GP2	8,30E-11	Canis familiaris	NA
236708_estExt_fgenesH1_kg_C_420001	Mitochondrial 28S ribosomal protein S6	2,10E-19	Mus musculus	NA
236730_estExt_fgenesH1_kg_C_450002	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	0	Drosophila melanogaster	gij136643 sp P25867
108600_e_gw_91_123_1	similar to RIKEN cDNA 4921513E08	2,66E-44	Rattus norvegicus	rno:289716
216843_fgenesH1_pg_scaffold_274000007	IN	1,70E-14	Plasmodium falciparum	pfa:PFL1670c
139297_e_gw_469_14_1	arylsulfatase B	0	Rattus norvegicus	rno:25227
29018_gw_132_84_1	Prostaglandin E synthase-2	0	Homo sapiens	gij73921741 sp Q9H7Z7
248582_estExt_fgenesH1_pg_C_7050005	Amidophosphoribosyltransferase precursor	0	Rattus norvegicus	NA
245736_estExt_fgenesH1_pg_C_1740017	NA	NA	NA	NA
63047_gw_316_114_1	NA	NA	NA	NA
55299_gw_174_44_1	Contactin (Cell recognition molecule Caspr2)	4,10E-27	Mus musculus	NA

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
55299_gw_174_44_1	Contactin (Cell recognition molecule Caspr2 similar to Ac1147	4,10E-27	Mus musculus	NA
19508_gw_233_85_1	Hs5453880	9,00E-15	Rattus norvegicus	rno:310926
241423_estExt_fgenesH1_pg_C_450021	\N	7,10E-05	none	NA
248044_estExt_fgenesH1_pg_C_4080002	\N	2,30E-29	Plasmodium falciparum	pfa:PFL0625c
245501_estExt_fgenesH1_pg_C_1630050	\N	2,30E-29	Plasmodium falciparum	pfa:PFL0625c
206717_fgenesH1_pg_scaffold_73000012	Zinc finger HIT domain containing protein 4	1,10E-41	no tax name	NA
143488_e_gw_825_1_1	N-acetyllactosaminide beta-1,3	7,10E-35	Bos taurus	NA
129797_e_gw_269_76_1	MAM domain anchor protein 1 precursor	1,20E-18	Homo sapiens	NA
105021_e_gw_75_99_1	similar to RIKEN cDNA D930035B09	0	Rattus norvegicus	rno:362615
216516_fgenesH1_pg_scaffold_263000001	Caspase-8 precursor (CASP-8)	1,40E-07	Mus musculus	NA
6833_gw_624_1_1	\N	2,20E-07	Plasmodium falciparum	pfa:PF11
162365_estExt_gwp_C_300262	Hs11761621	0	none	NA
239603_estExt_fgenesH1_pg_C_170029	Hs14727149	0	none	NA
187690_estExt_GenewiseH_1_C_1050058	ribosomal protein S23	0	Homo sapiens	hsa:6228
239337_estExt_fgenesH1_pg_C_130224	Calcitonin gene-related peptide	5,00E-34	Homo sapiens	gi 20532033 sp O75575
135518_e_gw_357_117_1	\N	2,60E-11	Saccharomyces cerevisiae	sce:YLR162W
148111_e_gw_2264_4_1	prefoldin 2	3,30E-26	Homo sapiens	hsa:5202
116212_e_gw_136_54_1	\N	0	Homo sapiens	hsa:9652
143005_e_gw_729_6_1	similar to SPRR1b	3,70E-13	Rattus norvegicus	rno:365847
159210_estExt_gwp_C_60482	ubiquitin-conjugating enzyme E2H	0	Homo sapiens	hsa:7328
196130_fgenesH1_pg_scaffold_1000061	Substance-K receptor (SKR)	2,2E-19	Cavia porcellus	gi 2494984 sp Q64077
240549_estExt_fgenesH1_pg_C_310023	tolA protein-related	1,40E-05	Arabidopsis thaliana	ath:At1g61410
236613_estExt_fgenesH1_kg_C_300010	Hs8922601	0	none	NA
7987_gw_7172_4_1	Hs14971411	3,80E-24	none	NA
233533_fgsh_est_C_scaffold_262000006	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	0	Homo sapiens	hsa:5160
92432_e_gw_30_297_1	Hs7662350	1,60E-28	none	NA
186732_estExt_GenewiseH_1_C_880328	calcium binding protein p22	0	Rattus norvegicus	rno:64152

3.5: Genes com variação de ao menos 10x ao longo do dia nos regimes claro-escuro e escuro constante com suplementação de melatonina

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
123583_e_gw_201_121_1	At2g21660	1,20E-24 none	NA	NA
232380_fgsh_est_C_scaffold_43000004	NA	NA NA	NA	NA
131687_e_gw_299_13_1	Histidine-rich glycoprotein precursor	2,30E-15 Plasmodium lophurae	NA	NA
7854_gw_3516_2_1	Histone H2B	0 Oncorhynchus mykiss	NA	NA
143489_e_gw_825_4_1	glycine-rich RNA-binding protein7	1,20E-25 Arabidopsis thaliana	ath:At2g21660	
204928_fgensch1_pg_scaffold_550000035	Cathepsin F precursor	0 Mus musculus	NA	
2483_gw_648_5_1	Fibrillin-1 precursor (MP340)	0 Bos taurus	gi 1706768 sp P98133	
206164_fgensch1_pg_scaffold_670000009	BTG1 PROTEIN	2,30E-35 Gallus gallus	NA	
147953_e_gw_2198_1_1	NA	NA NA	NA	
241141_estExt_fgensch1_pg_C_4000072	Surfeit locus protein 4 homolog	0 Drosophila melanogaster	gi 6094371 sp O18405	
138173_e_gw_424_6_1	Calumenin precursor (Crocalbin)	0 Homo sapiens	gi 5921197 sp O43852	
90748_e_gw_25_86_1	Translocon-associated protein A subunit precu	0 Homo sapiens	NA	
176975_estExt_GenewiseH_1_C_10211	Ribosomal protein L12	0 Drosophila melanogaster	dme:CG3195	
48062_gw_1844_5_1	ribosomal protein S9	3,70E-26 Homo sapiens	hsa:6203	
76367_gw_1146_7_1	Glycine-rich RNA-binding protein 7	4,3E-23 Arabidopsis thaliana	gi 544424 sp Q03250	
241784_estExt_fgensch1_pg_C_510073	Mitotic apparatus protein p62	0 Lytechinus pictus	NA	
114661_e_gw_127_61_1	\N	2,20E-31 Dantio retio	dre:393167	
242269_estExt_fgensch1_pg_C_600041	\N	9,00E-09 Caenorhabditis elegans	cel:ZK909.4	
29793_gw_191_81_1	HISTONE H1-DELTA	4,60E-27 Strongylocentrotus purpu	NA	
239775_estExt_fgensch1_pg_C_190133	nA	na na	na	
99507_e_gw_53_304_1	DNA-binding protein HU homolog (Histone-li	8,10E-12 Mycobacterium smegmat	NA	
148833_e_gw_2651_3_1	eukaryotic initiation factor 4a	5,20E-41 Schizosaccharomyces poi spo:SPAC1006.07		
145340_e_gw_1400_6_1	similar to NOD3	1,30E-20 Rattus norvegicus	mo:287070	
54560_gw_137_109_1	Px19-like protein	0 Gallus gallus	gi 29839592 sp Q90673	
116912_e_gw_142_75_1	transcription elongation factor B (SIII)	4,20E-45 Homo sapiens	hsa:6923	
104509_e_gw_73_243_1	14-3-3 protein epsilon	0 Bos taurus	gi 71153779 sp P62261	
2955_gw_1783_3_1	Hs22041746	1,10E-05 none	NA	
153502_e_gw_6228_4_1	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3D	9,2E-17 Homo sapiens	gi 23396812 sp O95685	
137658_e_gw_408_40_1	ubiquitin-conjugating enzyme E2N	0 Homo sapiens	hsa:7334	
3250_gw_648_6_1	Fibrillin-1 precursor	0,00E+00 Sus scrofa	gi 13626617 sp Q9TV36	

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
143422_e_gw_805_4_1	similar to chromosome 13 orf 12	1,80E-30	Rattus norvegicus	mo:288455
165764_estExt_gwp_C_640160	Programmed cell death protein 5 (TFAR19)	2,80E-37	Mus musculus	NA
228132_fgenesl1_pm_scaffold_8000003	ADP-ribosylation factor 4	0	Xenopus laevis	gij1703378 sp P51644
233523_fgsh_est_C_scaffold_260000001	NO HIT	NA	NA	NA
202084_fgenesl1_pg_scaffold_320000096	similar to RIKEN cDNA 5730434I03 gene	0	Rattus norvegicus	mo:366434
37776_gw_1_343_1	PK C-binding protein NELL2 precursor	0	Mus musculus	NA
131227_e_gw_291_13_1	Calcyphosine	3,8E-38	Homo sapiens	gij2493439 sp Q13938
156878_e_gw_13038_2_1	myosin regulatory light chain MRCL3	0	Homo sapiens	hsa:10627
2130_gw_3298_1_1	fibulin 6	0	Rattus norvegicus	mo:289094
145940_e_gw_1547_12_1	Enhancer of rudimentary homolog	9,60E-39	Aedes aegypti	NA
242697_estExt_fgenesl1_pg_C_690084	ribosomal protein L13	0	Danio rerio	dre:378961
14650_gw_315_19_1	O-methyltransferase family 3 protein	4,00E-42	Arabidopsis thaliana	ath:At3g62000
105672_e_gw_78_76_1	coagulation factor C homolog	na	na	na
238606_estExt_fgenesl1_pg_C_70022	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase (PHS)	0	Gallus gallus	NA
90548_e_gw_24_261_1	Succinate dehydrogenase cytochrome b subunit	7,50E-31	Mus musculus	NA
224850_fgenesl1_pg_scaffold_6232000001	CG7102 gene product	0,000404	Drosophila melanogaster	dme:CG7102
152710_e_gw_5237_1_1	similar to RIKEN cDNA 2310008M10	0	Rattus norvegicus	mo:362040
96658_e_gw_43_130_1	similar to RIKEN cDNA 1110046B24	0	Rattus norvegicus	mo:291314
241231_estExt_fgenesl1_pg_C_420043	NA	NA	NA	NA
184426_estExt_GenewiseH_1_C_570174	Glutathione S-transferase Mu 1 (GSTM1-1)	0	Rattus norvegicus	gij121717 sp P04905
88816_e_gw_19_165_1	uromodulin	5,00E-24	Mus musculus	mmu:22242
89657_e_gw_22_319_1	Hs7705817	3,30E-33	none	NA
147359_e_gw_1969_3_1	Transcriptional repressor AP-2rep	0	homo sapiens	gij17369933 sp Q9Y4X4
147883_e_gw_2178_2_1	uromodulin	8,70E-25	Rattus norvegicus	mo:25128
28706_gw_88_143_1	FK506 binding protein 2	0	Mus musculus	mmu:14227
223041_fgenesl1_pg_scaffold_2198000002	NA	NA	NA	NA
232242_fgsh_est_C_scaffold_31000006	Lysosome-associated glycoprotein 1 precursor	2,2E-22	Gallus gallus	gij126372 sp P05300
216575_fgenesl1_pg_scaffold_265000004	NA	NA	NA	NA
139520_e_gw_479_7_1	Reticulon-4 (Neurite outgrowth inhibitor)	0	Homo sapiens	gij17369290 sp Q9NQC3
143738_e_gw_854_1_1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6	0	Metridium senile	NA
233829_fgsh_est_C_scaffold_1032000001	NA	NA	NA	NA

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
236919_estExt_fgeshl_kg_C_730007	60S ribosomal protein L6	0	Rattus norvegicus	NA
148729_e_gw_2577_2_1	ribosomal protein L24	8,40E-37	Danio rerio	dre:192301
244101_estExt_fgeshl_pg_C_1090026	similar to inositolphosphorylceramide synthase	1,10E-25	Cyanidioschyzon merolae	cme:CML255C
183153_estExt_GenewiseH_1_C_440230	NA	NA	NA	NA
8491_gw_8555_1_1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	0	Metridium senile	NA
243338_estExt_fgeshl_pg_C_850073	nuclear factor of activated T-cells 5	1,70E-32	Homo sapiens	hsa:10725
235152_estExt_fgeshl_pm_C_980020	CDP-diacylglycerol synthase 2	0	Homo sapiens	hsa:8760
177378_estExt_GenewiseH_1_C_20577	Adenylate cyclase-inhibiting G alpha protein	0	Asterina pectinifera	NA
117241_e_gw_145_42_1	similar to methylmalonyl-CoA epimerase	0	Rattus norvegicus	rno:293829
232537_fgsh_est_C_scaffold_55000008	NA	NA	NA	NA
152355_e_gw_4880_3_1	50 kDa hatching enzyme precursor (proteinase)	5,90E-21	Hemicentrotus pulcherrimus	NA
207446_fgeshl_pg_scaffold_800000069	NA	NA	NA	NA
15302_gw_116_63_1	matrix metalloproteinase 3	0	Homo sapiens	hsa:4314
140400_e_gw_521_6_1	NA	NA	NA	NA
127212_e_gw_236_109_1	phosphatidylethanolamine-binding protein putati	na	na	na
199717_fgeshl_pg_scaffold_170000006	carboxypeptidase A	0	Danio rerio	dre:246092
145714_e_gw_1492_1_1	Zinc finger protein 93 (Zinc finger protein HTF3)	0	Homo sapiens	gi 12643428 sp P35789
88314_e_gw_18_342_1	HIG1 1A (Hypoxia-inducible)	9,9E-14	Homo sapiens	gi 74753465 sp Q9Y241
233752_fgsh_est_C_scaffold_464000001	CD63 antigen	1,30E-41	Bos taurus	NA
238351_estExt_fgeshl_pg_C_50095	Testican-3 precursor	5,4E-9	Mus musculus	NA
232099_fgsh_est_C_scaffold_200000017	Cytochrome c oxidase polypeptide VIIc	5,30E-12	Tarsius syrichta	NA
218116_fgeshl_pg_scaffold_331000001	FRAS1-related matrix protein 2 precursor	1,8E-33	Mus musculus	NA
36094_gw_10_149_1	similar to Hypothetical protein FLJ14810	0	Rattus norvegicus	rno:311861
25565_gw_50_59_1	O-methyltransferase mdmC	1,70E-37	S. mycarofaciens	gi 417289 sp Q00719
84327_e_gw_9_641_1	7300136	7,20E-16	none	NA
224096_fgeshl_pg_scaffold_38890000001	GTT1-like	3,10E-36	Rattus norvegicus	rno:296128
925_gw_405_3_1	similar to NOD3	0	Rattus norvegicus	rno:287070
158355_estExt_gwp_C_30525	Hs14731618	8,70E-38	none	NA
233333_fgsh_est_C_scaffold_1880000004	cytochrome c oxidase subunit VIIa	6,50E-09	Danio rerio	dre:335751
164778_estExt_gwp_C_530147	\N	0	Caenorhabditis elegans	cel:Y105C5B.9
215109_fgeshl_pg_scaffold_2180000029	peptidylprolyl isomerase B	0	Mus musculus	mmu:19035

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
9145_gw_2459_1_1	Pancreatic secretory glycoprotein GP2 precursor	2,40E-24	Canis familiaris	NA
230299_fgnesl1_pm_scaffold_166000005	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5e	0	Homo sapiens	hsa:8665
68935_gw_1862_2_1	Cathepsin L precursor	1,80E-23	Canis familiaris	NA
64833_gw_3_635_1	Hs22047533	3,00E-06	none	NA
159419_estExt_gwp_C_70455	protein phosphatase 3 regulatory subunit B	0	Homo sapiens	hsa:5534
219949_fgnesl1_pg_scaffold_458000007	Neurofilament triplet H protein	2,4E-10	Mus musculus	gi 128127 sp P19246
201621_fgnesl1_pg_scaffold_29000103	Hs20539005	4,50E-12	none	NA
154387_e_gw_7279_15_1	Hs4503609	1,10E-16	none	NA
97011_e_gw_45_146_1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	1,1E-24	Drosophila melanogaster	gi 136643 sp P25867
86049_e_gw_12_133_1	Hs20536571	0	none	NA
208040_fgnesl1_pg_scaffold_88000005	NA	NA	NA	NA
121733_e_gw_182_87_1	microtubule-associated protein 1 light chain 3a	1,60E-40	Rattus norvegicus	rn:362245
203178_fgnesl1_pg_scaffold_41000017	IN	3,10E-35	Danio rerio	dre:321875
226527_fgnesl1_kg_scaffold_33000007	Centrin-3	0	Mus musculus	NA
170702_estExt_gwp_C_1540086	Hs4757768	0	none	NA
116948_e_gw_142_49_1	lysosomal-associated protein transmembrane 4A	5,20E-42	Mus musculus	mmu:17775
122332_e_gw_189_10_1	SPFH domain protein 1 precursor	0	Mus musculus	NA
178050_estExt_GenewiseH_1_C_50291	heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	8,40E-38	Homo sapiens	hsa:3336
237547_estExt_fgnesl1_kg_C_3270001	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide	1,00E-29	Homo sapiens	hsa:481
178746_estExt_GenewiseH_1_C_80141	ribosomal protein L10	0	Homo sapiens	hsa:6134
223620_fgnesl1_pg_scaffold_3071000002	t-complex-associated-testis-expressed 1-like 1	0	Homo sapiens	hsa:6993
95950_e_gw_41_117_1	Hs20562268	1,40E-25	none	NA
245394_estExt_fgnesl1_pg_C_1580002	60S ribosomal protein L7	0	Bos taurus	NA
147667_e_gw_2090_2_1	Uromodulin precursor	1,50E-16	Rattus norvegicus	NA
160631_estExt_gwp_C_140318	7290598	2,00E-28	none	NA
79473_e_gw_1_761_1	expressed protein	5,70E-16	Arabidopsis thaliana	ath:Atlg14870
191169_estExt_GenewiseH_1_C_1950090	CG13018 gene product	1,90E-16	Drosophila melanogaster	dme:CG13018
200105_fgnesl1_pg_scaffold_19000097	low similarity to glycoamylases	na	na	na
202813_fgnesl1_pg_scaffold_38000043	Zinc finger protein 313	1,10E-05	Rattus norvegicus	NA
165493_estExt_gwp_C_610212	Proteasome subA type2 Multicatalytic	0	Xenopus laevis	NA
137650_e_gw_408_57_1	IN	0	Danio rerio	dre:335335

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
129274_e_gw_263_15_1	Wiskott-Aldrich syndrome protein family m3	0	no tax name	NA
245689_estExt_fgeshl_pg_C_1720032	expressed protein	1,70E-13	Arabidopsis thaliana	ath:At1g14870
39845_gw_60_155_1	Protease inhibitor (McpI)	4,20E-13	Melithaea caledonica	NA
161158_estExt_gwp_C_180384	Sorting nexin-6	0	Pongo pygmaeus	NA
118229_e_gw_152_65_1	Hemagglutinin/amebocyte factor precursor	na	na	na
152496_e_gw_5022_1_1	uromodulin	2,30E-24	Rattus norvegicus	rno:25128
247562_estExt_fgeshl_pg_C_3150019	7291298	0	none	NA
235494_estExt_fgeshl_pm_C_1570005	Hs20542220	4,70E-40	none	NA
238274_estExt_fgeshl_pg_C_40232	NA	NA	NA	NA
102755_e_gw_66_68_1	tropomodulin 1	0	Homo sapiens	hsa:7111
95836_e_gw_41_137_1	Caspase recruitment domain protein15 (Nod2)	5,6E-19	Mus musculus	gi 29427819 sp Q8K3Z0
212635_fgeshl_pg_scaffold_159000029	Proteasome subunit alpha type 1	5,1E-32	Mus musculus	gi 9910833 sp Q9R1P4
115865_e_gw_134_48_1	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3A	1,4E-18	Mus musculus	gi 52000837 sp Q99MR9
234970_estExt_fgeshl_pm_C_780008	60S ribosomal protein L8	0	Xenopus tropicalis	NA
206833_fgeshl_pg_scaffold_74000029	Probable mitochondrial ribosomal protein S10	2,50E-16	Danio rerio	NA
89807_e_gw_22_69_1	thioredoxin-like 2	0	Mus musculus	mmu:30926
240152_estExt_fgeshl_pg_C_250079	cytochrome c oxidase subunit IV	1,30E-16	Danio rerio	dre:326975
179566_estExt_GenewiseH_1_C_130133	Protein KIAA0152 precursor	0	Homo sapiens	gi 2495712 sp Q14165
61368_gw_9_270_1	Calreticulin precursor	0	Mus musculus	NA
54581_gw_133_186_1	ribosomal protein S7	0	Homo sapiens	hsa:6201
137996_e_gw_419_26_1	mRpS10	5,00E-36	Drosophila melanogaster	dme:CG4247
223215_fgeshl_pg_scaffold_2426000001	FRAS1-related matrix protein2 precursor	1,4E-27	Mus musculus	gi 73620905 sp Q6NVD0
162224_estExt_gwp_C_280123	60S ribosomal protein L17 (L23)	0	Podocoryne carnea	NA
7349_gw_2067_9_1	NA	NA	NA	NA
155247_e_gw_8276_1_1	Caspase recruitment domain protein15 (Nod2)	2,5E-21	Mus musculus	gi 29427819 sp Q8K3Z0
141892_e_gw_616_28_1	similar to RIKEN cDNA 1190003A07	0	Rattus norvegicus	rno:366276
198135_fgeshl_pg_scaffold_8000176	NA	NA	NA	NA
178799_estExt_GenewiseH_1_C_80206	40S ribosomal protein S2	0	Urechis caupo	NA
198116_fgeshl_pg_scaffold_8000157	Histone H2B.a/g/h/k/l	2,0E-37	Homo sapiens	gi 51317345 sp P62807
139259_e_gw_468_1_1	ribosomal protein L24	4,70E-37	Danio rerio	dre:192301
6436_gw_4954_2_1	zonadhesin	1,10E-17	Mus musculus	mmu:22635

JGI_ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
141801_e_gw_608_10_1	CG11686-PA	3,30E-16	Drosophila melanogaste	dme:CG11686
127893_e_gw_243_87_1	nuclear factor, erythroid-derived 2	5,20E-29	Danio rerio	dre:317765
80454_e_gw_3_195_1	Cyclin-dependent kinase-like 1	0	Homo sapiens	gi 68571510 sp Q00532
241170_estExt_fgfnesh1_pg_C_410015	RING finger and CHY zinc finger domain	5.3E-14	Homo sapiens	gi 327000088 sp Q96PM5
238114_estExt_fgfnesh1_pg_C_30205	Gastrulation-specific protein G12	9.5E-5	Danio rerio	gi 1346058 sp P47805
123220_e_gw_197_32_1	Ficolin-2 precursor	0	Rattus norvegicus	NA
109079_e_gw_93_202_1	Elongation factor 2 (EF-2)	2,30E-30	Gallus gallus	NA
189255_estExt_GenewiseH_1_C_1390015	26S protease regulatory subunit 7	0	Xenopus laevis	NA
176630_estExt_gwp_C_17810002	GFAT 2	6.7E-26	homo sapiens	gi 6226820 sp O94808
16783_gw_69_21_1	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3A	1,80E-17	Mus musculus	NA
39872_gw_19_158_1	Pancreatic secretory glycoprotein GP2 prec	1,80E-15	Canis familiaris	NA
151557_e_gw_4244_2_1	similar to RIKEN cDNA 2310008M10	3,40E-35	Rattus norvegicus	rno:362040
35024_gw_22_94_1	GTT1-like	0	Rattus norvegicus	rno:296128
173264_estExt_gwp_C_2430022	Ras suppressor protein 1	0	Mus musculus	mmu:20163
225333_fgfnesh1_pg_scaffold_8176000001	NA	NA	NA	NA
98049_e_gw_48_54_1	Torsin A precursor	0	Macaca fascicularis	NA
132262_e_gw_307_32_1	similar to scribbler CG5580-PA	0	Rattus norvegicus	rno:365316
17113_gw_179_25_1	Caspase recruitment domain protein 15 (N	1.1E-17	Homo sapiens	gi 20137973 sp Q9HC29
231845_fgsh_est_C_scaffold_5000036	NA	NA	NA	NA
207412_fgfnesh1_pg_scaffold_80000035	Pathogen Related in Sc	na	na	na
166728_estExt_gwp_C_770095	Microsomal signal peptidase 18 kDa subuni	0	Homo sapiens	gi 54039634 sp P67812
241092_estExt_fgfnesh1_pg_C_3900080	NA	NA	NA	NA
217964_fgfnesh1_pg_scaffold_320000009	Ubiquitin-63E	0	Drosophila melanogaste	dme:CG11624
247019_estExt_fgfnesh1_pg_C_2620020	RNA-directed DNA polymerase	3.0E-6	Drosophila funebris	gi 134082 sp P21329
217778_fgfnesh1_pg_scaffold_312000019	NA	NA	NA	NA
233389_fgsh_est_C_scaffold_207000003	NA	NA	NA	NA
9448_gw_7304_1_1	Pancreatic secretory glycoprotein GP2 prec	1,60E-23	Canis familiaris	NA
193084_estExt_GenewiseH_1_C_2720009	mitochondrial inner membrane protease sub	7.6E-31	Candida albicans	cal:orf19.61
191787_estExt_GenewiseH_1_C_2170113	proteasome subunit, beta type 1	0	Mus musculus	mmu:19170

3.6: Genes com variação de ao menos 10x ao longo do dia no regime de escuro constante com suplementação de melatonina (apenas os 20 genes com maior variação)

JGI ID	BEST_HIT	E	TAXON	KEGG
230451_fgenes1_pm_scaffold_190000004	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1	0	Rattus norvegicus	rno:309004
6224_gw_6991_1_1	Rhodopsin	8,20E-15	Sepia officinalis	NA
35325_gw_35_91_1	Neural cell adhesion molecule L1 precursor (N-CAM L1)	3,10E-19	Takifugu rubripes	NA
248122_estExt_fgenes1_pg_C_4240002	Hs9506653	0	none	Hs9506653
88758_e_gw_19_156_1	Pancreatic secretory granule glycoprotein GP2 precursor	8,50E-26	Canis familiaris	NA
164541_estExt_gwp_C_510141	TAF5-like RNA polymerase II p300/CBP-associated factor	0	Mus musculus	NA
96464_e_gw_43_116_1	polypyrimidine tract binding protein 1	0	Homo sapiens	hsa:5725
116530_e_gw_139_132_1	conserved hypothetical protein	1,20E-28	Candida albicans	cal:orf19.3539
238525_estExt_fgenes1_pg_C_60110	NA	NA	NA	NA
198116_fgenes1_pg_scaffold_8000157	Hs10800138	1,00E-37	none	Hs10800138
105798_e_gw_79_138_1	\N	0	Caenorhabditis elegans	cel:F13D12.7
80696_e_gw_3_684_1	Hs21704265	8,50E-42	none	Hs21704265
150407_e_gw_3444_15_1	\N	2,40E-35	Danio rerio	dre:386920
34520_gw_48_121_1	Galactoside 3-L-fucosyltransferase	1,70E-36	Drosophila melanogaster	NA
29089_gw_47_103_1	Phospholipase A2 2 precursor	3,00E-30	Naja atra	NA
136694_e_gw_380_1_1	WD repeat domain 3	0	Homo sapiens	hsa:10885
199154_fgenes1_pg_scaffold_13000161	NA	NA	NA	NA
91326_e_gw_27_25_1	WD-repeat protein 17	0	Homo sapiens	NA
245476_estExt_fgenes1_pg_C_1620017	NA	NA	NA	NA
83818_e_gw_8_265_1	Histone H2B	0	Gallus gallus	NA