Jéssica Andrade da Silva

**PAPEL DA TEMPORIZAÇÃO NORADRENÉRGICA
NA REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE MELATONINA PELA
GLÂNDULA PINEAL EM CULTURA: CARACTERÍSTICAS
FUNCIONAIS E MECANISMOS DE AÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

Jéssica Andrade da Silva

**PAPEL DA TEMPORIZAÇÃO NORADRENÉRGICA
NA REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE MELATONINA PELA
GLÂNDULA PINEAL EM CULTURA: CARACTERÍSTICAS
FUNCIONAIS E MECANISMOS DE AÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

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

Silva, Jéssica Andrade da.

Papel da temporização noradrenérgica na regulação da síntese de melatonina pela glândula pineal em cultura: características funcionais e mecanismos de ação / Jéssica Andrade da Silva. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Neuroendocrinologia.

Versão do título para o inglês: Role of norepinephrine synchronization on melatonin synthesis regulation of pineal gland culture: function and action mechanisms.

1. Glândula pineal 2. Melatonina 3. Noradrenalina 4. Temporização
5. Ritmicidade 6. Genes relógio I. Cipolla Neto, Prof. Dr. José II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB043/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jéssica Andrade da Silva.

Título da Dissertação: Papel da temporização noradrenérgica na regulação da síntese de melatonina pela glândula pineal em cultura: características funcionais e mecanismos de ação.

Orientador(a): Prof. Dr. José Cipolla Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

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) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **199** nas fls. **116** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **José Cipolla Neto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: ações centrais e a regulação circadiana da função metabólica*" do qual participam o(s) aluno(s) **Jéssica Andrade da Silva, Caroline Mendes, Rafael Maso Prévide, Ariane de Oliveira Turati, Angela Ramos Lobo, Rosana Fátima Dantas Ferreira, Ana Maria de Souza Lopes, Ronaldo Meira de Mello, Marco Taneda, Rafael Peres, Fernanda Gaspar do Amaral, Eliângela de Lima, Lia de Alencar Coelho, Daniella do Carmo Buonfiglio** e os pesquisadores **Fabio Bessa Lima, Silvana Bordin, Sara Schammah, Carla Roberta de Oliveira Carvalho, Solange Castro Afeche, Edson Amaro Jr.**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **24.01.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 27 de janeiro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico essa dissertação a todos as pessoas que estiveram presentes e puderam acompanhar de perto todo o caminho percorrido até aqui.

Principalmnte, dedico aos meus país Tânia e Antônio, que me deram muito mais do que a vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade de São Paulo, assim como ao Instituto de Ciências Biomédicas, ao Programa de Fisiologia Humana e à sua secretaria composta pelos Zé Maria e Paloma.

Agradeço também à CAPES por financiar durante 6 meses meu projeto. E à FAPESP, que sob o processo 2011/04359-8, financiou a pesquisa para que então essa dissertação fosse possível.

Agradeço muito ao Prof. Cipolla, por ter aberto suas portas anos atrás, quando eu ainda era apenas uma recém universitária. Obrigada professor, por ter engrandecido meu pensamento científico com todas as orientações e ensinamentos!

Agradeço à Prof^a Solange, que mais do que ceder espaço em seu laboratório para a realização da atividade enzimática, contribuiu de forma a engrandecer esse trabalho e meus conhecimentos sobre a glândula pineal. Obrigada!

Agradeço a Julieta! Que desde minha primeira semana no laboratório, há um pouco mais de 5 anos, agiu como uma “mãe de laboratório”, fornecendo todo o apoio e suporte emocional, assim como as enormes ajudas quanto aos experimentos! Obrigada por TODOS os conselhos Ju!

Agradeço também aos queridos companheiros de laboratório que me acompanharam por todos esses anos. Rô, obrigada por desde o início me pegar pela mão e me guiar pelos princípios da ciência. Obrigada inclusive pelas broncas e puxões de orelha! Valeu parceiro de pesquisa!

E mesmo após 5 anos, como poderia esquecer da primeira pessoa que encontrei encarando o HPLC? Rafa, muito obrigada por cada ensinamento, cada risada, cada idéia mirabolante de como poderíamos aprontar com a Ju! Obrigada por sempre me fazer tentar entender que sou capaz! Em outras palavras você sempre me diz isso, e eu jamais irei esquecer: he pohó na ka pohó, o ke akamai no ke hana a nui!

Dani, obrigada pelos conselhos, pelas longas conversas, pelas risadas e aventuras, além das dicas científicas desde a minha banca de TCC!

Fê, obrigada pelas dicas e ensinamentos não só no laboratório. E principalmente, obrigada pela ajuda na briga quase diária com o HPLC!

Angie, muito obrigada por mostrar que argentinos podem ser legais! Brincadeiras à parte, obrigada pelas conversas, desabafos e apoio durante todo esse tempo.

Rosinha, obrigada por sempre alegrar a todos nós com o seu bom humor! Obrigada pelas palavras de força e incentivo!

Ari, que conheço desde a graduação, obrigada pelas conversas filosóficas e a mãozinha em alguns experimentos!

Agradeço também a todas as outras pessoas, que fazem desse laboratório um lugar especial. Obrigada Carol, Ana, Cláudia, Lia, PH, Eduardo, Maria Alice e o recém chegado Sinésio.

Agradeço também aos amigos tão queridos, que apesar de não estarem diariamente presentes, estão sempre em meu coração, amo vocês. Kaká, obrigada pelas mensagens diárias que me dão força. Isis, obrigada pela força mental e espiritual. Cami, Fê, Lara, Lumi, Alinie, Má e Bia, muito obrigada por esses 10 anos de convivência! Não sei o que seria sem vocês! E principalmente, obrigada Bia por me fazer tia! Por ter trazido ao mundo a princesinha cheia de luz dessas tias babonas! Te amo Olívia!

Agradeço a você Geovane, por ter sido muito mais que um namorado, um grande amigo também! Obrigada pela força diária, pelas risadas, e palavras de carinho e incentivo. Obrigada pela paciência, só você mesmo para aguentar meus choros e ataques de pânico sem se estressar demais! Você tem sido meu ponto de recarga, onde adquiro mais forças. Te amo!

Meus enormes agradecimentos às duas pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, Tânia e Antônio! Obrigada por todo o conhecimento, educação, valores, risadas, companhia, amor e garra que me passaram ao longo desses anos. Obrigada pela paciência! Pai, obrigada por se esforçar tanto para que a vida fosse menos dura, que quebrasse menos a minha espinha! Obrigada por nos dias dos experimentos acordar tão cedo e me acompanhar em parte do caminho, ligando sempre para saber se fiz o trajeto bem. E mãe, minha companheira inseparável! Mais do que mãe, uma grande amiga! Obrigada por TUDO! Obrigada por me acompanhar nas noites de coleta, ou até mesmo enfrentar um fim de semana repleto de placas de PCR dormindo em cadeiras, sem reclamar e ainda me dando força, com paciência para aturar minhas crises de pânico! Não sei o que seria sem vocês! Essa dissertação não é só minha, é de vocês também! Amo vocês DEMAIS!

Além de todas essas pessoas maravilhosas, agradeço à vida dos animais que utilizei!

E enfim, agradeço a Deus por toda a luz e por fazer tudo isso possível, por ter me dado forças e sabedoria para enfrentar os obstáculos da melhor maneira possível.

“O distraído nela tropeçou...
O bruto a usou como projétil.
O empreendedor, usando-a, construiu.
O camponês, cansado da lida, dela fez assento.
Para meninos, foi brinquedo.
Drummond a poetizou.
Já Davíd, matou Golias, e Michelangelo extraiu-
lhe a mais bela escultura....
E em todos esses casos, a diferença não esteve
na pedra, mas no Homem!
Não existe ‘pedra’ no seu caminho que você não
possa aproveitá-la para o seu próprio
crescimento.”

(Fenelon Portilho)

RESUMO

Silva JA. Papel da temporização noradrenérgica na regulação da síntese de melatonina pela glândula pineal em cultura: características funcionais e mecanismos de ação. [dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A melatonina, hormônio sintetizado pela glândula pineal durante a fase escura, apresenta ritmo circadiano e sazonal de secreção. Uma vez que a glândula pineal não é uma estrutura oscilatória autônoma, sua produção é regulada principalmente pela noradrenalina (Nor) liberada na fase escura. Seu ritmo circadiano de expressão gênica é sustentado pelos genes relógio, e na cultura padrão de glândula pineal as glândulas não expressam modificação rítmica funcional. Para mimetizar o padrão fisiológico de liberação da noradrenalina na cultura de glândula pineal, desenvolvemos uma cultura temporizada com noradrenalina. Assim, esse estudo visa avaliar a manutenção da maquinaria do relógio circadiano da glândula pineal mediante cultura seguindo os protocolos agudo e temporizado com noradrenalina, assim como, investigar qual a via noradrenérgica envolvida nessa manutenção. Para o estudo *in vivo*, os ratos foram sacrificados circadianamente. Para o estudo *in vitro*, foram sacrificados na transição da fase clara para a escura e suas glândulas submetidas à cultura por 72 horas sob as condições: controle (sem Nor), agudo (Nor 10^{-6} nas primeiras 12h das últimas 24h), temporizado (desde o início da cultura: 12h presença/12h ausência da Nor 10^{-6}), temporizado com adição de prazosin (inibidor α_1), temporizado com adição de propranolol (inibidor β adrenérgico) e temporizado com adição dos dois bloqueadores combinados. Nas últimas 24 horas as glândulas e seus meios de cultura foram coletados a cada 3 horas. Realizou-se a análise da expressão gênica do RNAm por qPCR dos genes *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba*, *Dbp* e *Aanat*, a atividade enzimática da AANAT e a quantificação dos conteúdos de melatonina nos meios pelo método UHPLC. *In vivo* todos os genes analisados apresentaram padrão rítmico de expressão. À medida que foram colocados na condição *in vitro* controle e agudo, os ritmos observados foram abolidos. A manutenção da ritmicidade circadiana, apesar das diferentes acrofases, foi observada no grupo temporizado. Além disso, a temporização também foi capaz de promover aumento na duração do pico de atividade enzimática, assim como aumentar o conteúdo de melatonina produzida pelas glândulas. A adição de Prazosin na cultura temporizada gerou a redução das amplitudes de expressão, e em alguns casos o ritmo foi abolido. Já a adição de Propranolol, associado ou não com Prazosin, aboliu completamente qualquer variação circadiana existente nos genes analisados. Sendo assim, viu-se que a temporização noradrenérgica da cultura foi capaz de manter a expressão dos componentes do relógio circadiano na glândula pineal, resultando em melhora da fisiologia da glândula, e aumento da síntese de melatonina. Viu-se também que a ação temporizada da noradrenalina se dá principalmente via receptor β , potencializado pela via do receptor α_1 . Sendo assim a cultura temporizada com noradrenalina se mostra importante para evitar a disrupção da variação rítmica encontrada na cultura padrão de glândula pineal.

Palavras-chave: Glândula pineal. Melatonina. Noradrenalina. Temporização. Genes relógio. Ritmicidade.

ABSTRACT

Silva JA. Role of norepinephrine synchronization on melatonin synthesis regulation of pineal gland culture: function and action mechanisms. [Masters thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Melatonin, a hormone synthesized by the pineal gland on the dark phase, shows a circadian and seasonal rhythm of secretion. Since the mammal's pineal gland is not an autonomous oscillator, the melatonin production requires the release of norepinephrine (NE) on the dark phase. The circadian gene expression in pineal gland is sustained by clock genes. In the standard pineal culture, the gland is extracted and maintained on culture for 48 hours prior to treatment with NE. Under this condition, the glands do not express any functional rhythmic variation. To mimic the physiological pattern of NE release in the pineal gland culture, we develop a synchronized culture with NE. The aim of this study was to investigate the maintenance of circadian clock genes expression within rat pineal gland under acute and NE-synchronized culture. Also we have investigated by which noradrenergic pathway this maintenance occurs. For the in vivo experiments, the animals were sacrificed of a circadian way. For the in vitro, the rats were sacrificed on the transition of light to dark phase, and the glands were submitted to the culture for 72 h under conditions: control (without NE), acute (NE 10^{-6} for 12h after 48h), synchronized (since the begin of the culture: 12h presence/12h absence of NE), synchronized with Prazosin (α_1 blocker), synchronized with Propranolol (β blocker) and synchronized with both drugs. In the last 24h of culture, the glands and medium were collected every 3h. The mRNA expressions of *Aanat*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *Dbp*, *Per1*, *Per2* and *Rev-erba* were investigated by qPCR, as well as the AANAT activity and melatonin content by UHPLC method. All genes analyzed showed circadian rhythm expression in vivo. However, under in vitro, control and acute condition, every rhythm observed before were abolished. The presence of circadian rhythmicity, despite the differences of acrophase, was found in all genes in the synchronized group. Further, the synchronization was also able to improve the peak duration of the AANAT activity, as well as increase the melatonin content. The prazosin addition in the synchronized culture reduced the gene expression, and in some cases the rhythm was abolished. On the other hand, the propranolol addition, combined or not with prazosin, abolished every rhythmic expression variation in analyzed genes. Thus, the synchronization was able to maintain the circadian clock expression in the pineal gland, improving the melatonin synthesis. Also, the synchronized norepinephrine acts by β receptor, and the α_1 receptor pathway potentiates this. In conclusion, the synchronized culture method showed itself as a useful approach to avoid the disruption of rhythmic variations that are present in the standard culture.

Keywords: Pineal gland. Melatonin. Norepinephrine. Synchronization. Clock genes. Rhythmicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização anatômica da glândula pineal em humanos.	17
Figura 2 – Localização anatômica da glândula pineal em roedores.	18
Figura 3 – Fórmula estrutural da molécula melatonina.	19
Figura 4 – Representação da via retino hipotalâmica pineal (RHP).	20
Figura 5 – Via bioquímica de síntese da melatonina.	22
Figura 6 – Representação do processo regulatório dos principais genes relógio.	28
Figura 7 – Esquema da regulação da expressão de <i>Per1</i> estimulado pela noradrenalina em astrócitos espinhais.	30
Figura 8 – Desenho experimental dos grupos <i>in vitro</i> : controle, agudo e temporizado.	36
Figura 9 – Experimento <i>in vitro</i> : cultura temporizada com adição de Prazosin.	38
Figura 10 – Experimento <i>in vitro</i> : cultura temporizada com adição de propranolol.	39
Figura 11 – Experimento <i>in vitro</i> : cultura temporizada com adição combinada de prazosin e propranolol.	40
Figura 12 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Bmal1</i> <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (grupos controle, agudo e temporizado).	49
Figura 13 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry1</i> <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (grupos controle, agudo e temporizado).	50
Figura 14 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry2</i> <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (grupos controle, agudo e temporizado).	52
Figura 15 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per1</i> <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (grupos controle, agudo e temporizado).	54
Figura 16 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per2</i> <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (grupos controle, agudo e temporizado).	56
Figura 17 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Rev-erba</i> <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (grupos controle, agudo e temporizado).	58
Figura 18 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Dbp</i> <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (grupos controle, agudo e temporizado).	60
Figura 19 - Perfil diário de RNAm do gene <i>Aanat</i> <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (grupos controle, agudo e temporizado).	62
Figura 20 – Mapa das fases observadas nos grupos <i>in vivo</i> e temporizado.	63
Figura 21 – Atividade enzimática <i>in vitro</i> da AANAT.	64
Figura 22 – Síntese de melatonina <i>in vitro</i> sob as condições agudo e temporizado.	65

Figura 23 – Determinação da concentração ideal para Prasozin.	67
Figura 24 – Determinação da concentração ideal para Propranolol.	68
Figura 25 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Bmall in vitro</i> temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.	70
Figura 26 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry1 in vitro</i> temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.	72
Figura 27 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Cry2 in vitro</i> temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.	73
Figura 28 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per1 in vitro</i> temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.	75
Figura 29 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Per2 in vitro</i> temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.	77
Figura 30 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Rev-erba in vitro</i> temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.	79
Figura 31 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Dbp in vitro</i> temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.	81
Figura 32 – Perfil diário de RNAm do gene <i>Aanat in vitro</i> temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.	83
Figura 33 – Mapa das fases observadas nos grupos: temporizado e temporizado com bloqueadores noradrenérgicos.	84
Figura 34 – Atividade enzimática <i>in vitro</i> da AANAT, mediante a adição de bloqueadores noradrenérgicos na cultura temporizada.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados.	43
Tabela 2 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene <i>Bmal1</i> sob as condições <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> temporizado.	49
Tabela 3 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene <i>Cry1</i> sob as condições <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> temporizado.	51
Tabela 4 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene <i>Cry2</i> sob as condições <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> temporizado.	53
Tabela 5 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene <i>Per1</i> sob as condições <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> temporizado.	55
Tabela 6 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene <i>Per2</i> sob as condições <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> temporizado.	57
Tabela 7 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene <i>Rev-erba</i> sob as condições <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> temporizado.	59
Tabela 8 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene <i>BmalDbp1</i> sob as condições <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> temporizado.	60
Tabela 9 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene <i>Aanat</i> sob as condições <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> temporizado.	62
Tabela 10 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene <i>Bmal1</i> sob as condições temporizado e temporizado com adição de Prasozin.	70
Tabela 11 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene <i>Cry1</i> sob as condições temporizado e temporizado com adição de Prasozin.	72
Tabela 12 – Análise pelo Cosinor da curva de expressão de RNAm do gene <i>Cry2</i> sob a condição temporizado.	74
Tabela 13 – Análise pelo Cosinor da curva de expressão de RNAm do gene <i>Per1</i> sob a condição temporizado.	76
Tabela 14 – Análise pelo Cosinor da curva de expressão de RNAm do gene <i>Per2</i> sob a condição temporizado.	77
Tabela 15 – Análise pelo Cosinor da curva de expressão de RNAm do gene <i>Rev-erba</i> sob a condição temporizado.	79
Tabela 16 – Análise pelo Cosinor da curva de expressão de RNAm do gene <i>Dbp</i> sob a condição temporizado.	81

Tabela 17 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene <i>Aanat</i> sob as condições temporizado e temporizado com adição de Prasozin	83
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 A glândula pineal	17
<i>1.1.1 Anatomia e histologia</i>	17
<i>1.1.2 Melatonina: molécula e biossíntese</i>	18
<i>1.1.2.1 Triptofano hidroxilase (TPH)</i>	22
<i>1.1.2.2 Arilalquilamina-N-acetiltransferase</i>	23
<i>1.1.2.3 Hidroxindol-O-metiltransferase</i>	25
1.2 Ritmicidade e genes relógio	26
<i>1.2.1 Alça de retroalimentação dos genes relógio</i>	26
<i>1.2.2 A glândula pineal e os genes relógio: uma relação com a noradrenalina</i>	29
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Animais e design experimental	34
<i>3.1.1 Experimentos in vivo</i>	34
<i>3.1.2 Experimentos in vitro: culturas padrão e temporizada</i>	34
<i>3.1.3 Experimento piloto para determinação da melhor concentração de bloqueadores noradrenérgicos</i>	36
<i>3.1.4 Experimento in vitro: cultura temporizada com bloqueadores noradrenérgicos</i>	37
3.2 Extração de RNA	40
3.3 Obtenção de cDNA	41
3.4 Análise quantitativa da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	42
3.5 Clonagem e obtenção dos padrões	44
3.6 Dosagem da melatonina pelo UHPLC	46
3.7 Análise radiométrica da atividade enzimática da AANAT	46
3.8 Análise estatística	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Experimentos in vivo e in vitro (grupos controle, agudo e temporizado)	48
<i>4.1.1 Análise do perfil diário de RNAm dos genes relógio, gene dependente do relógio e do gene Aanat</i>	48
<i>4.1.1.1 Bmal1</i>	48
<i>4.1.1.2 Cry1</i>	50

4.1.1.3 <i>Cry2</i>	52
4.1.1.4 <i>Per1</i>	54
4.1.1.5 <i>Per2</i>	56
4.1.1.6 <i>Rev-erba</i>	58
4.1.1.7 <i>Dbp</i>	60
4.1.1.8 <i>Aanat</i>	62
4.1.2 <u>Atividade enzimática da AANAT</u>	64
4.1.3 <u>Quantificação do conteúdo de melatonina por UHPLC</u>	65
4.2 Experimento piloto para determinação da melhor concentração dos bloqueadores noradrenérgicos	66
4.2.1 <u>Prasozin</u>	67
4.2.2 <u>Propranolol</u>	68
4.3 Experimentos <i>in vitro</i>: associação entre o grupo temporizado e a utilização de bloqueadores noradrenérgicos	69
4.3.1 <u>Análise do perfil diário de RNAm dos genes relógio, gene dependente do relógio e do gene <i>Aanat</i></u>	69
4.3.1.1 <i>Bmal1</i>	69
4.3.1.2 <i>Cry1</i>	72
4.3.1.3 <i>Cry2</i>	74
4.3.1.4 <i>Per1</i>	76
4.3.1.5 <i>Per2</i>	78
4.3.1.6 <i>Rev-erba</i>	80
4.3.1.7 <i>Dbp</i>	82
4.3.1.8 <i>Aanat</i>	84
4.3.2 <u>Atividade enzimática da AANAT</u>	86
5 DISCUSSÃO	88
6 CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS	96
APÊNDICE – Artigo submetido sob revisão	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 A glândula pineal

1.1.1 Anatomia e histologia

A glândula pineal, também conhecida como órgão pineal, participa da organização temporal de ritmos biológicos, regulando processos fisiológicos fundamentais, como a regulação endócrina da reprodução, regulação do ciclo sono/vigília, sistema imunológico, entre outros. Essa glândula é uma estrutura epitalâmica localizada dorsalmente à região caudal do diencefalo e deriva-se de células neuroectodérmicas desenvolvendo-se a partir de uma evaginação dorsal do teto da parede do terceiro ventrículo ^(1, 2).

A localização da glândula pineal varia de acordo com a espécie. Em humanos esse órgão se encontra na região central do cérebro, no epitalamo, entre as comissuras habenular e posterior ⁽²⁾.

Figura 1 – Localização anatômica da glândula pineal em humanos.

A glândula pineal é encontrada na região central do cérebro, no epitalamo, entre as comissuras habenular e posterior

Fonte: Vollrath L (1981)⁽³⁾.

Já em roedores, como em ratos, a glândula pineal é dividida em três partes: pineal profunda, pedúnculo pineal e pineal superficial (Figura 2). A pineal profunda está localizada

entre as comissuras posterior e habenular, delimitando uma região ventricular conhecida como recesso pineal. Da porção dorsal da pineal profunda emerge o pedúnculo pineal que se comunica com a pineal superficial⁽⁴⁾.

Figura 2 – Localização anatômica da glândula pineal em roedores.

Representação da localização da glândula pineal no encéfalo de ratos e das três porções da glândula pineal de roedores: pineal superficial (seta preta), pedúnculo pineal (seta vermelha) e pineal profunda (seta verde).

Fonte: Modificado de Swanson LW (1998)⁽⁵⁾.

Independentemente da espécie animal a glândula pineal é composta principalmente por pinealócitos (estrutura responsável pela síntese de melatonina), além de apresentar células gliais, das quais algumas são astrócitos (célula responsável por secretar entre outras substâncias, o angiotensinogênio)^(2, 6), e tecido conjuntivo (para sua sustentação).

1.1.2 Melatonina: molécula e biossíntese

A glândula pineal de mamíferos é responsável pela produção e secreção do hormônio melatonina durante a noite. A produção apenas noturna caracteriza uma variação diária típica dos ritmos circadianos, ou seja, a produção ocorre ritmicamente a cada 24 horas⁽⁷⁻⁹⁾.

Esse hormônio é ubíquo, podendo ser encontrado em quase todos os seres vivos, de procariotos a eucariotos⁽¹⁰⁾. Muitas são as funções atribuídas a ele como, por exemplo: a capacidade de sequestrar radicais hidroxilas⁽¹¹⁾, de mobilizar mecanismos reparadores do DNA, de regular diretamente atividades de enzimas, além de atuar no metabolismo oxidativo (sendo um importante antioxidante), no transporte de elétron da mitocôndria e nos processos de apoptose⁽¹⁰⁾.

A molécula melatonina apresenta em sua estrutura química um grupamento metóxi no carbono 5 e um grupamento acil ligado ao nitrogênio do grupo amina. Essas duas estruturas

permitem que essa molécula apresente características anfifílicas, ou seja, esse hormônio é hidrofílico e lipofílico. Devido a essa propriedade, a melatonina pode ser encontrada em todos os compartimentos do organismo.

Além disso, os carbonos 2 e 3 do anel pirrólico possuem alta capacidade de doar elétrons, permitindo então que essa molécula apresente uma alta capacidade anti-oxidante sendo, portanto, um dos agentes anti-oxidantes naturais mais importantes ⁽¹²⁾ (Figura 3).

Figura 3 – Fórmula estrutural da molécula melatonina.

MELATONINA (N-acetil-5-metoxi-triptamina)

A molécula melatonina apresenta um grupamento metóxi (círculo verde) e grupamento acetil (círculo vermelho), responsáveis pela anfifilicidade da molécula. Além disso, há os carbonos 2 e 3 (círculos azuis) que possuem alta capacidade de doar elétrons, garantindo um alto poder anti-oxidante a esse hormônio.

Fonte: Modificado de Hardeland et al. (2006)⁽¹³⁾.

A melatonina pode agir de várias formas: no interior da própria célula que a produz (ações intrínsecas diretas) ou sair desta e exercer ações autócrinas, parácrinas e endócrinas mediadas ou não por receptores de membrana (MT1, MT2 e MT3) ^(8, 14, 15) e/ou nucleares (RZR/ROR) ^(10, 16-19).

Tanto anatomicamente quanto funcionalmente, a glândula pineal varia de acordo com a espécie. Em peixes e anfíbios a glândula é diretamente fotorreceptora, em aves a glândula pineal apresenta função fotorreceptora e secretória e em mamíferos a pineal não é exibida fotossensibilidade ⁽²⁾.

Sabendo-se dessa característica, se nota que a sincronização da produção de melatonina ao ciclo de iluminação ambiental em mamíferos depende de uma via neural que culmina na inervação simpática da glândula pineal ^(8, 20). Essa via neural regulatória se inicia nos núcleos paraventriculares do hipotálamo (PVH), passando pela coluna intermédia lateral da medula espinhal (IML), de onde partem ramificações pré-ganglionares que seguem até o gânglio cervical superior (GCS). A partir dessa estrutura se projetam fibras simpáticas que,

através do nervo conário e do ramo carotídeo interno invem a glândula pineal, culminando na liberação de noradrenalina no interstício glandular, o que leva à síntese de melatonina^(8, 21, 22).

Esse sistema é temporizado pelo relógio central, o núcleo supraquiasmático (NSQ), resultando na produção circadiana da melatonina. Como o NSQ está sincronizado através de uma via retino-hipotalâmica ao ciclo de iluminação ambiental, a produção de melatonina se dá exclusivamente durante a noite^(23, 24).

Portanto, a produção desse hormônio é regulada principalmente pela inervação simpática da glândula pineal via fibras noradrenérgicas originadas no gânglio cervical superior^(1, 21, 25). E a melatonina, em si, age como sinalizadora e agente sincronizadora nos núcleos supraquiasmáticos⁽²⁾ (Figura 4).

Figura 4 – Representação da via retino hipotalâmica pineal (RHP).

(RHP): projeção da via retino-hipotalâmica; (NSQ): núcleo supraquiasmático; (QO): quiasma óptico; (NPV): núcleo paraventricular; (IML): Coluna intermédio-lateral da medula espinhal; (GCS): gânglios cervicais superiores; (RCI): ramos carotídeos internos; (NC): nervos conários; (P): glândula pineal.

Fonte: Modificado de Klein DC (1993)⁽²⁶⁾.

A produção de outros indóis pineais, como a 5-hidroxitriptofano (5-HT), a serotonina, o ácido 5-hidroxi-indolacético e a N-acetilserotonina, também é regulada predominantemente pela inervação simpática da glândula pineal^(1, 25). Porém, a síntese desses indóis e da melatonina pode também ser regulada por aferências provenientes de áreas diencefálicas específicas, por sistemas peptidérgicos (com participação, por exemplo, do neuropeptídeo Y) e por polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) / polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP)⁽²⁷⁻²⁹⁾. Recentemente foi demonstrado que outras substâncias também podem modular a síntese de melatonina, como a angiotensina e a insulina

que agem estimulando a glândula à síntese, e o glutamato que age como um inibidor nessa modulação ^(6, 30-32).

A noradrenalina quando liberada no interstício glandular interage com os receptores noradrenérgicos. Uma vez ativado, o adrenorreceptor β_1 promove, através da mediação da proteína G estimulatória, o aumento da quantidade intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) pela ativação da enzima adenilato ciclase (AC). Esse mecanismo é potencializado pela ativação do adrenorreceptor α (α_{1B}). Quando isso acontece, sua proteína Gq ativa a fosfolipase C que hidrolisa os fosfoinositídeos de membrana produzindo diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP3). O IP3 se liga em seus receptores do retículo endoplasmático induzindo a liberação de cálcio dessas organelas, cuja concentração intracelular aumenta. Esse aumento pode ser caracterizado por um pico seguido de um platô. O cálcio e o DAG são importantes, pois serão os responsáveis por ativar a proteína quinase C (PKC) potencializando o aumento de AMPC. O cálcio intracelular e o AMPC são de fundamental importância na síntese de melatonina, pois irão participar da ativação da enzima AANAT, como será descrito posteriormente (arilalquilamina-N-acetiltransferase, a enzima passo limitante na síntese deste hormônio) ⁽³³⁻³⁷⁾.

A produção da melatonina inicia-se com o aminoácido triptofano que é hidroxilado pela triptofano hidroxilase (TPH) dando origem ao 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Esse por sua vez é descarboxilado pela enzima descarboxilase de L-aminoácido aromático (LAAD), formando a serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). A serotonina sofre ação da arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT ou NAT), transferindo um grupamento acetil para a serotonina, tendo como produto a N-acetilserotonina (NAS). Essa última sofre ação da enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), que substituindo o hidrogênio do grupamento hidroxila do carbono 5 do grupo indólico por um grupamento metil forma a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) ⁽²⁵⁾ (Figura 5). De forma clássica, a AANAT estabiliza sua atividade enzimática quando é fosforilada pela PKA ativada pelo AMPC, ocorrendo assim sua ligação com a proteína 14-3-3, formando um complexo AANAT/14-3-3. Essa associação impede que a AANAT seja metabolizada por um mecanismo de proteólise proteassomal ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾. Essas enzimas possuem características próprias e complementares que promovem uma melhor regulação da síntese de melatonina.

Figura 5 – Via bioquímica de síntese da melatonina.

Representação dos indóis envolvidos na via de síntese da melatonina e dos pontos de atuação das enzimas atuantes no processo.

Fonte: Modificado Arendt J (1995) ⁽²⁾.

1.1.2.1 Triptofano hidroxilase (TPH)

Como já mencionado anteriormente, a primeira enzima da via é a TPH. Na glândula pineal do rato, essa enzima apresenta um ritmo circadiano de atividade, com valores mais elevados na fase noturna, fazendo com que a síntese de 5-hidroxitriptofano concentre-se nesse

intervalo. Esse aumento da atividade de cerca de 2 vezes durante a noite se deve, principalmente, a mecanismos pós-transcricionais induzidos por estimulação noradrenérgica (ativação das vias do AMPc e PKA), promovendo então a fosforilação da proteína CREB que por sua vez promove transcrição da enzima TPH. A transcrição gênica inicia-se com a ligação do CREB fosforilado ao sítio do elemento responsivo ao AMPc (sítio CRE) do gene^(33, 34, 37, 41, 42). Após a transcrição e tradução, a enzima é então ativada promovendo o aumento da 5-HTP, que quando descarboxilada pela descarboxilase de L-aminoácido aromático dá origem à serotonina, principal substrato da AANAT⁽²⁵⁾.

1.1.2.2 Arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT)

A terceira enzima da via, a AANAT, é responsável pela acetilação da serotonina. Seus mecanismos de regulação variam de acordo com a espécie animal, sendo diferentes em humanos, ovinos, bovinos e roedores. Em ratos essa enzima está presente em diferentes tecidos, sendo encontrada principalmente na hipófise, no núcleo supraquiasmático, na retina e na pineal⁽³³⁾.

Durante muitos anos tentou-se clonar esse gene sem sucesso. Porém durante a década de 90, mais de um grupo de pesquisadores conseguiram realizar tal feito, de forma a revolucionar os estudos envolvendo glândula pineal e melatonina. Após a clonagem desse gene foi possível estudá-lo melhor.

O gene da *Aanat* em ratos possui 4 exons e em sua região promotora há uma sequência CRE-like, um CCAAT Box invertido (ligação de C/EBP), sítio de ligação para a proteína ativadora 1 (AP-1) e uma região denominada PIRE que se liga ao CRX (*Cone-rod homeobox protein*). Viu-se que a expressão gênica da *Aanat* apresenta variação rítmica de transcrição, sendo maior durante a noite, assim como, a atividade de seu correspondente protéico. Estudos mostraram que esse aumento seria de até 150 vezes durante a noite em ratos. Além disso, puderam também concluir que esse gene compunha uma nova família dentro da superfamília das acetiltransferases, aparecendo mais tardiamente na evolução, provavelmente no mesmo período em que a melatonina surgiu como sinal fotoquímico^(33, 43-45). A partir da clonagem desse gene, foi possível verificar a sua existência também em outros tecidos, como na retina e no testículo, porém com uma transcrição de menor amplitude⁽³³⁾.

A ativação da transcrição do gene da *Aanat* se dá através da fosforilação do CREB pelo AMPc após estímulo adrenérgico, sendo assim é possível notar também o ritmo circadiano da fosforilação do CREB. O pCREB se liga ao sítio CRE da região promotora

acima mencionado, estimulando a transcrição do gene^(44, 45). Além desse, outros fatores de transcrição como AP-1, Fra2 e CRX complementam a ação do pCREB⁽⁴⁶⁾.

Além de estimuladores da transcrição também existem os inibidores, como a proteína ICER (*inducible cAMP early repressor*) que compete com o pCREB pela ligação ao sítio CRE. Uma vez que ICER se ligue ao sítio CRE, há inibição da transcrição da *Aanat*. O ICER é estimulado noradrenergicamente, e portanto, também participa da regulação fina da enzima passo limitante da via de síntese da melatonina^(45, 47).

Sendo assim, concluiu-se que a redução do AMPc, e o aumento da proteína ICER são mecanismos importantes para a inibição da transcrição da *Aanat*. Além disso, foi visto que na primeira metade da noite os níveis de pCREB são mais elevados reduzindo, portanto, o efeito inibitório do ICER. Em 2003, um trabalho mostrou que a noradrenalina promove também a translocação do PSP1 (uma fosfatase) do citoplasma para o núcleo. Essa enzima então realizaria a rápida desfosforilação da pCREB, fazendo com que seus níveis caíssem na segunda metade da noite. Essa queda, promove a redução abrupta da relação entre pCREB e ICER, privilegiando a ação do ICER que reduz a transcrição da *Aanat*^(46, 48).

Na estrutura protéica da AANAT há motifs A e B que a caracteriza como uma acetiltransferase. Apresenta também vários sítios de fosforilação, como o sítio para PKC e sítio para caseína quinase II. Além desses, há também o sítio RRXT/S (sítio de proteína quinase dependente de nucleotídeo cíclico) na porção N-terminal e C-terminal, de forma a mostrar a importância do AMPc como regulador dessa enzima⁽⁴⁵⁾.

Com o aumento dos níveis de AMPc devido ao estímulo noradrenérgico durante a noite, nota-se o aumento da atividade enzimática da AANAT nesse período⁽⁴⁹⁾. Em trabalhos posteriores viu-se que mesmo após certo tempo de estímulo adrenérgico, baixos níveis de AMPc ainda permanecem no interior da célula para a manutenção da atividade da AANAT⁽⁵⁰⁾.

Nesse mesmo trabalho, especulou-se que o desligamento da atividade da AANAT seria devido à queda abrupta de AMPc. Havendo exposição à luz durante a fase escura, os níveis de atividade dessa enzima reduziriam de maneira muito rápida por conversão de AANAT funcional em AANAT não funcional através de um processo chamado proteólise proteossomal^(49, 51). Essa queda do AMPc ainda não podia ser explicada na década dos anos 70. Porém, anos mais tarde, verificou-se que através do mecanismo da Nor/AMPc/PKA, os níveis da transcrição da fosfodiesterase 4B2 (PDE4B2) eram aumentados. Essa enzima tem sua transcrição, tradução e ativação disparada por estímulo adrenérgico, dessa forma foi possível concluir que na glândula pineal essa molécula apresenta maiores valores durante a

noite. A PDE4B2 é responsável pela desativação do AMPc (hidrolisando-o à AMP) e consequente inativação da PKA e redução da atividade da AANAT. Havendo, portanto, uma alça de *feedback* negativo, onde o aumento do AMPc pela noradrenalina promove o aumento da PDE4 que por sua vez promove a redução dos níveis de AMPc, inativação de PKA e redução da AANAT. Essa enzima realiza, portanto, a regulação fina da atividade da enzima passo limitante da síntese de melatonina ⁽⁵²⁾.

Como já mencionado anteriormente, a AANAT apresenta sítio de fosforilação para PKC. Essa proteína quinase contribui para o aumento da atividade da AANAT após estímulo noradrenérgico. Isso se deve ao fato de que a PKC fosforila a AANAT no resíduo de Thr29, aumentando a sua estabilidade, estado de fosforilação e, consequentemente, estado de ativação. Além disso, a PKC promove maior estabilidade à enzima, uma vez que essa fosforila em resíduo Thr29, criando um consenso de ligação do motif 14-3-3, facilitando a formação do complexo AANAT/14-3-3 ⁽⁵³⁾. Esse complexo é formado classicamente após a fosforilação da AANAT por PKA, mas como demonstrado por Choi e colaboradores (2004) ⁽⁵³⁾, também pode ser por fosforilação por PKC. Quando a AANAT não é fosforilada, não há a formação do complexo com a 14-3-3 e a enzima é então rapidamente degradada por proteólise proteossomal. Estudos posteriores mostraram que a proteína AANAT é degradada via porção N-terminal por proteólise proteossomal e a leucina na porção N-terminal teria um papel fundamental na regulação da degradação protéica ⁽⁵⁴⁾.

Um importante regulador do complexo AANAT/14-3-3 é o nível de AMPc. Quando esse diminui, a pAANAT se dissocia do complexo, e sua reassociação é bloqueada pela ação das fosfatases (que desfosforilam a pAANAT, transformando-a em AANAT novamente). Essa enzima não ligada é então destruída ⁽³⁹⁾. Em suma, a associação com a proteína 14-3-3 impede que a AANAT seja metabolizada por um mecanismo de proteólise proteossomal ^(39, 40, 52).

1.1.2.3 Hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT/ASMT)

A hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), última enzima da via de síntese de melatonina é uma enzima controversa e até hoje de difícil compreensão. Muitas questões ainda estão em aberto acerca dessa proteína, inclusive a sua nomenclatura: atualmente é chamada de ASMT (*N-Acetylserotonin-O-methyltransferase*), especificando sua ação sobre a metilação da NAS. Essa enzima age sobre a N-acetilserotonina (NAS), transformando-a em

melatonina. A atividade da enzima HIOMT/ASMT no período noturno apresenta um aumento de 1,5 vezes, enquanto o seu RNAm tem um aumento de 2 vezes. O ritmo circadiano do RNAm da HIOMT/ASMT é dependente da estimulação adrenérgica, da ativação do receptor β -adrenérgico e do aumento na concentração de AMPc. Já a regulação do ritmo de atividade da enzima HIOMT/ASMT parece ser dependente de eventos pós-transcricionais induzidos por neurotransmissores que aumentem o cálcio ^(55, 56), não estando diretamente relacionada com a noradrenalina assim como a transcrição.

1.2 Ritmicidade e genes relógio

Como já mencionado, a produção de melatonina apresenta variação circadiana. Sua produção é sincronizada ao dia e à noite, assim como às estações do ano pela informação luminosa transmitida pela via retino-hipotalâmica (RHP) e núcleos supraquiasmáticos (NSQ - também chamado de “relógio central”). Além de participar ativamente do controle da síntese da melatonina, o NSQ expressa genes relógio, que por definição são um grupo de genes que se autorregulam por alças de retroalimentação positivas e negativas em um período aproximado de 24 h. São genes relógio os genes: *Bmal1* (*Brain and muscle ARNT-like1*), *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*), *Rev-erba* (*Reverse strand of the c-erba gene*), *Per* (*Period*) 1, 2 e 3, *Cry* (*Chrytochrome*) 1 e 2. Também existem os genes controlados pelo relógio como o *Dbp* (*D-box binding protein*). Esses genes são responsáveis por sustentar o sistema circadiano de expressão gênica ⁽²³⁾.

A princípio acreditava-se que tais genes encontravam-se apenas nos núcleos supraquiasmáticos (NSQs), porém com o avanço dos estudos viu-se que são encontrados em muitas regiões cerebrais, assim como nos núcleos paraventricular e arqueado, *pars tuberalis*, bulbo olfatório e na glândula pineal. Da mesma forma, podem ser encontrados em órgãos e tecidos periféricos, como fígado, coração, rins, músculos, tecido adiposo, entre outros ^(7, 24, 56). Na glândula pineal de ratos em regime de 12h:12h claro/escuro, viu-se que a expressão rítmica de *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* e *Cry2* ⁽⁵⁷⁾ está presente.

1.2.1 Alça de retroalimentação dos genes relógio

Para que a ritmicidade seja mantida esses genes estão envolvidos em alças de retroalimentação. Os genes *Clock* e *Bmal1* são transcritos e traduzidos. Em seguida ocorre a heterodimerização das proteínas CLOCK e BMAL1 (PAS-bHLH), formando o complexo

CLOCK/BMAL1, que por sua vez irá se ligar às *E-boxes* (sequência específica de DNA encontrada na região promotora) dos genes *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, ativando a transcrição dos mesmos ^(7, 9, 58). Consequentemente, haverá a tradução de suas proteínas. Quando as proteínas PER1 e PER2 se acumulam no citoplasma formam um complexo negativador juntamente com proteínas CRY1 e CRY2, que entra no núcleo impedindo assim a ação transcricional do complexo CLOCK/BMAL (Figura 6).

Como proteínas fundamentais neste processo de ritmicidade temos as REV-ERB α e REV-ERB β , importantes na formação das oscilações circadianas de RNAm do *Bmal1*. Quando não há REV-ERB α nota-se o aumento de RNAm de *Bmal1*, e da expressão de diversos outros genes relógio no NSQ e tecidos periféricos. Sendo assim, a proteína REV-ERB α age como um inibidor de transcrição, uma vez que se liga ao sítio responsivo ao elemento ROR (RORE) existente no gene *Bmal1* interrompendo a sua transcrição. A REV-ERB β também funciona como uma proteína repressora. O sistema relógio até funciona sem as REV-ERBs, mas estas são as responsáveis pela sintonia fina da ritmicidade ^(7, 8, 59) (Figura 6).

Além das REV-ERBs, há também as RORs (*Retinoic acid receptor-related orphan receptor*), ambas pertencentes à família dos receptores órfãos nucleares. Assim como no gene *Rev-erb*, a transcrição de *Rora* é ativada pelo complexo CLOCK/BMAL. Como já mencionado, a REV-ERB α é capaz de reprimir a expressão de *Bmal1*. Opostamente, o ROR α se liga ao sítio responsivo ao elemento ROR (RORE) do gene *Bmal1* sendo, portanto, capaz de promover a transcrição desse gene ^(9, 59) (Figura 6). Sendo assim, nota-se a importância dessas duas proteínas para a regulação fina do funcionamento do relógio, uma maquinaria complexa.

Figura 6 – Representação do processo regulatório dos principais genes relógio.

As proteínas BMAL1 e CLOCK se heterodimerizam no citoplasma, migram ao núcleo e se ligam positivamente à região promotora dos genes *Per* e *Cry*. A transcrição e tradução desses genes ocorre, e no citoplasma há o vínculo entre CRY e PER, que irão agir negativamente o complexo BMAL1/CLOCK, exercendo portanto, ação regulatória sobre a própria expressão. Além disso, o complexo BMAL1/CLOCK também se liga à região promotora de *Rora/β/γ* e *Rev-erba/β*. Esses, por sua vez, serão transcritos e traduzidos. As RORs agem sobre a expressão de *Bmal1* de forma estimulatória, enquanto as REV-ERBs agem sobre a expressão de *Bmal1* de forma inibitória.

Fonte: Modificado de Duguay e Cermakian (2009)⁽⁹⁾.

Outras proteínas secundárias, que são controladas por genes do relógio, complementam o *feedback* e aumentam a amplitude do ritmo, como a proteína DBP (proteína ligante do elemento D albumina). O complexo BMAL1/CLOCK aumenta a transcrição do gene *Dbp* através de uma E-box no seu segundo íntron mostrando, portanto, que o gene *Dbp* é controlado pelos genes do relógio⁽⁵⁸⁾.

A proteína BMAL1 apresenta em sua estrutura um domínio bHLH (*heliz-loop-helix*) e um domínio PAS. Esses domínios permitem a heterodimerização entre BMAL1 e CLOCK⁽⁷⁾.

Os genes *Pers* apresentam domínios PAS (importante para interações proteína-proteína) e CLD (domínio de localização citoplasmática que ajuda a manter a proteína no citoplasma)⁽⁵⁸⁾. Além disso, sabe-se também que esse gene apresenta um sítio CRE de forma que a fosforilação de CREB induzida pela PKA causa a transcrição de *Per1*^(60, 61).

De acordo com o exposto acima, muitas são as formas e mecanismos de regulação e manutenção dos ritmos circadianos, envolvendo inclusive, mecanismos transcricionais e pós transcricionais. Assim sendo, é de suma importância que haja um balanço entre a síntese e a degradação dos RNAs dos genes envolvidos nesse processo^(7, 9).

1.2.2 A glândula pineal e os genes relógio: uma relação com a noradrenalina

Sabe-se que muitos genes relógio como, por exemplo: *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1*, *Rev-erba* e *Clock* são expressos na glândula pineal de roedores ^(23, 62-65). Em camundongos, os genes relógio presentes na glândula pineal possuem um papel importante que está relacionado com o controle do *timing* da atividade da AANAT ⁽⁶²⁾. Dessa forma, na espécie em questão podemos imaginar a importância da atuação sincronizada dos mesmos, modulando a produção do hormônio pineal.

Sabendo-se da importância da noradrenalina na sincronização da glândula pineal, faz-se interessante conhecer a função e a relação desse hormônio com a regulação desses genes relógio que sustentam o sistema circadiano.

Vários trabalhos envolvendo noradrenalina e os genes relógio foram realizados. Um deles foi o realizado pela Simonneaux et al. (2004) ⁽²³⁾, no qual foi possível verificar através da técnica de hibridização *in situ* que na glândula pineal de ratos Wistar existe a variação rítmica circadiana de vários genes relógio, como: *Per1*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* (que apresentam valores maiores na fase escura) e do gene *Bmal1* (que apresenta valores maiores na fase clara). Além disso, de acordo com seu trabalho após a injeção de isoproterenol (agonista β adrenérgico) intraperitonealmente nos animais, os genes *Per1* e *Cry2* apresentaram aumento na regulação da expressão gênica sugerindo um controle disparado pela noradrenalina. O mesmo não foi visto para os genes *Per3* e *Cry1*, que apresentariam, portanto, algum outro mecanismo de regulação ⁽²³⁾.

Outro trabalho também com objetivo de avaliar a relação existente entre genes relógio e noradrenalina foi realizado em 2009 por Wongchitrat e colaboradores. Assim como no trabalho supracitado, houve o sacrifício circadiano dos animais, para obtenção das glândulas pineais a fim de se verificar a expressão gênica por hibridização *in situ*. Sendo possível observar que em hamster sírio havia a expressão rítmica dos genes *Per1*, *Cry2*, *Bmal1*, *Rev-erba* e *Aanat*. Também nesse trabalho os genes *Per1*, *Cry2* e *Aanat* apresentaram maiores valores na fase escura, enquanto que *Bmal1* durante a fase clara. O *Rev-erba* mostrou expressão oposta à de *Bmal1*. Além disso, também foi realizada injeção intraperitoneal de propranolol (antagonista inespecífico de receptores β noradrenérgicos) nos animais durante a fase clara. Após 3 horas desse tratamento, viu-se que as expressões de *Per1*, *Cry2* e *Aanat* tiveram a amplitude de expressão reduzida, enquanto *Bmal1* e *Rev-erba* não foram afetados pelo tratamento ⁽⁶⁴⁾. Assim, esse trabalho corrobora o supracitado uma vez que se pôde notar variação rítmica na expressão de *Cry2*, *Per1* e *Aanat* em ambos os trabalhos. A regulação

dessa expressão é mediada pela ativação ou não dos receptores β adrenérgicos *in vivo*, levando a crer que apenas para esses genes a transcrição é disparada e regulada pela noradrenalina.

Além desses experimentos realizados *in vivo*, há outros trabalhos realizados *in vitro* estabelecendo relação entre a noradrenalina e a expressão gênica dos genes relógio. Um deles foi um estudo realizado por Sugimoto et al. (2011)⁽⁶⁶⁾. Nesse trabalho usou-se cultura primária de astrócitos medulares de ratos. As células foram então desafiadas agudamente com noradrenalina (1 μ M), coletadas e foram feitas análises de PCR em tempo real. A noradrenalina foi capaz de promover o aumento da expressão de *Per1* logo na primeira hora (voltando a seus níveis basais em menos de 3h), além de aumentar a expressão de *Cry1*, *Cry2* e *Bmal1*. Não exerceu efeito algum sobre *Per2* e *Clock*. Verificou-se também que o aumento visto na expressão gênica de *Per1* deu-se após a ativação dos receptores α_1 e β_2 . Em seguida, Sugimoto e colaboradores, verificaram que após a ativação do receptor α_1 houve o recrutamento de ERK e JNK por fosforilação. A JNK fosforilou a c-jun. Já ERK e c-jun agiram de alguma forma ainda não conhecida na expressão de *Per1*. Após a ativação de β_2 , através de uma proteína G estimulatória a adenilato ciclase foi ativada, aumentando AMPc e consequentemente ativando a PKA que promoveu a fosforilação do CREB. O pCREB por sua vez se ligou ao sítio CRE do gene *Per1* levando à sua transcrição (Figura 7)⁽⁶⁶⁾.

Figura 7 – Esquema da regulação da expressão de *Per1* estimulado pela noradrenalina em astrócitos medulares.

A expressão gênica do gene *Per1* é mobilizada após a ativação dos receptores α_1 e β_2 . A ativação dos mesmos pela noradrenalina leva a ativação de vias de sinalizações que culminam na expressão gênica do *Per1*, mostrando a relevância da noradrenalina na expressão desse gene. ERK: quinase regulada por sinal extracelular; JNK: quinase N-terminal c-jun; AC: adenilato ciclase; ATP: trifosfato de adenosina; AMPc: adenosina 3',5' – monofosfato cíclico; PKA: proteína quinase A; CREB: proteína de ligação responsiva à AMPc.

Fonte: Modificado de Sugimoto et al. (2011)⁽⁶⁶⁾.

Em trabalho recente, usando uma metodologia de cultura diferente da tradicional, foram usadas glândulas antes do período de 48 horas necessárias para a completa degeneração dos terminais simpáticos. Ou seja, nessa preparação havia terminais em degeneração e, conseqüentemente, liberação de noradrenalina. Nesse trabalho, Wongchitrat e colaboradores (2011) ⁽⁶⁷⁾ mostraram que as ritmicidades dos genes *Per2*, *Bmal1* e *Rev-erba* se mantinham, porém as de *Per1* e da *Aanat* atenuaram-se logo nas primeiras 24 h. Ainda nesse trabalho, a estimulação da cultura com Isoproterenol (um agonista β adrenérgico) foi capaz de aumentar a expressão de *Per1*, porém de mais nenhum outro gene. Ao estimular essa mesma cultura com fenilefrina (agonista α adrenérgico) notou-se o mesmo efeito, porém com menor amplitude. Dessa forma concluíram que apenas o gene *Per1* teria a sua ritmicidade dependente da estimulação noradrenérgica, sendo ativados tanto adrenoceptores α como β .

Como demonstrado acima, a cultura utilizada pecava pelo fato de não ter excluído o sinal noradrenérgico vindo dos terminais simpáticos em degeneração. A técnica de cultura mais habitual é a desenvolvida por Parfitt e colaboradores (1975) ⁽⁶⁸⁾. Nessa metodologia, as glândulas são extraídas dos animais e colocadas em um meio de cultura apropriado com temperatura e pH também adequados, permanecendo em cultura por 48 h antes de sua utilização em qualquer procedimento experimental. Este tempo é considerado necessário para que ocorra a degeneração completa dos terminais simpáticos. Após esse período a glândula pode ser considerada uma preparação exclusivamente pós-sináptica. Em geral, após 48 h as glândulas são estimuladas com noradrenalina e após 5 h da estimulação, são coletadas e as análises funcionais correspondentes são feitas.

Entretanto, em uma condição de cultura padrão as glândulas deixam de expressar qualquer modificação funcional rítmica, uma vez que, sabidamente, as pineais de mamíferos não são estruturas oscilatórias autônomas. Pelo contrário, sua oscilação circadiana é estritamente dependente de estruturas neurais centrais e impostas à glândula através principalmente da inervação simpática noradrenérgica ^(62, 69). Portanto, com a justificativa de tentar mimetizar condições funcionais das glândulas em cultura às condições que se observa *in vivo*, desenvolvemos um novo modelo de cultura, em que se administra noradrenalina ao meio de cultura de forma rítmica, alternando períodos de 12 h de estimulação com 12 h sem estimulação ^(31, 32). Pretendendo-se assim, manter um padrão rítmico circadiano que pelo menos quanto à disponibilidade de noradrenalina fosse semelhante ao encontrado no animal *in vivo*, reconstruindo-se *in vitro* um dia e uma noite induzidos. Esse protocolo de estimulação revelou que a temporização da cultura pela noradrenalina per se foi capaz de aumentar tanto a

síntese da melatonina quanto as atividades das enzimas TPOH e da AANAT, sem aumentar a transcrição dos RNAs mensageiros das mesmas, sugerindo uma regulação pós-traducional das atividades destas proteínas ^(31, 32).

Sabendo-se que a noradrenalina é ritmicamente liberada no interstício glandular, e que exerce um importante papel na manutenção da ritmicidade da glândula e sua produção de hormônio, a cultura temporizada pode ser importante para a melhora dessas alterações promovidas pela falta de ritmicidade. Podendo ser capaz, portanto, de manter a variação rítmica da expressão dos genes relógio, importantes para a manutenção do relógio circadiano. Sendo assim, também é importante validar a ação do tratamento temporizado com noradrenalina, além de se investigar quais são os mecanismos e possíveis vias envolvidas.

2 OBJETIVOS

Esse trabalho teve, portanto, como objetivo:

- estudar a ritmicidade dos genes relógio na glândula pineal *in vivo* de animais sincronizados ao ciclo de iluminação 12h:12h;
- estudar a ritmicidade dos genes relógio na glândula pineal *in vitro* mediante estimulação temporizada pela noradrenalina, comparando-a com a ciclagem *in vivo* de animais sincronizados ao ciclo de iluminação 12h:12h.;
- estudar o papel de bloqueadores noradrenérgicos específicos sobre os perfis circadianos da expressão dos genes relógio de glândulas em cultura sincronizada;
- avaliar os perfis de síntese do hormônio melatonina e a atividade da AANAT nas condições *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e design experimental

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar com peso corporal entre 150-180 g, fornecidos pelo biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil. Os animais foram mantidos em biotério sob um ciclo de claro/escuro 12 h:12 h (transição do escuro para o claro, – ZT (*zeitgeber time*) 0) e temperatura controlada (21 ± 2 °C), com comida e água *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, protocolo registrado sob nº 199 nas fls. 116 do livro 02.

Esses animais foram destinados para experimentos *in vivo* e *in vitro* (experimento comparativo entre culturas padrão e temporizada, experimento piloto para definição da melhor concentração para os bloqueadores noradrenérgicos prazosin e propranolol e experimento para avaliar a ação dos bloqueadores quando adicionados à cultura temporizada).

3.1.1 Experimentos *in vivo*

Para os experimentos *in vivo*, os animais foram sacrificados por decapitação e em seguida foram realizados cortes na região parieto-temporal, de forma que a calota craniana pudesse ser rebatida e a glândula pineal exposta, permitindo assim a sua coleta. Os sacrifícios para a coleta das glândulas pineais ocorreram a cada 3 h, durante 24 h (ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18, ZT21 e ZT24, sendo que, como dito acima, ZT0 começo do claro; ZT3 3 horas após a transição do período escuro para o período claro; ZT15 corresponde a 3 horas após a transição do período claro para o período escuro, e assim por diante). Em cada um desses pontos foram sacrificados 3 animais por bloco experimental. As glândulas extraídas foram congeladas a -80 °C, para posterior análise da expressão gênica.

3.1.2 Experimentos *in vitro*: culturas padrão e temporizada

Para os experimentos *in vitro*, a extração da glândula ocorreu logo após o sacrifício dos animais na transição da fase clara para a escura. As glândulas foram colocadas imediatamente em meio de cultura BGJb com fenol red (Fitton-Jackson Modification) modificado com BSA (Albumina Sérica Bovina) (mg/mL), acrescido de glutamina (2 mM),

ácido ascórbico (0,1 mg/mL) e penicilina (100 U/mL) – estreptomicina (100 mg/mL) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e mantidas em gelo. No fluxo laminar as glândulas foram transferidas para placas de cultura com 24 poços, sendo acondicionada 1 glândula por poço. Em cada poço havia 200 µL de meio de cultura e um disco de nylon de 4 mm de diâmetro, sobre o qual as glândulas foram colocadas. As placas foram então colocadas em uma câmara incubadora modular, preenchida com carbogênio (95% O₂ e 5% de CO₂), saturada de umidade, mantida na estufa de CO₂ a 37 °C ⁽⁷⁰⁾.

A partir daí, o grupo *in vitro* foi subdividido em três grupos: controle, estimulação noradrenérgica aguda (grupo agudo) e estimulação noradrenérgica temporizada (grupo temporizado), sendo que os dois primeiros foram realizados com a cultura padrão de glândula pineal e o terceiro pela cultura temporizada pela noradrenalina. Abaixo segue a explicação de cada um dos tipos de cultura:

- a) *Culturas padrão da glândula pineal*: As glândulas foram extraídas e mantidas em cultura por 48 h. Após a degeneração dos terminais simpáticos, as glândulas foram mantidas por mais 24 h em cultura, totalizando um período de 72 h. As glândulas foram transferidas para uma nova placa, com meio fresco, a cada 24 h e no último período de 24 h as glândulas foram estimuladas (Figura 8A) ou não (Figura 8B) pela noradrenalina (Nor) 1 µM. O grupo estimulado é chamado de agudo e o não estimulado de grupo controle ^(31, 32).
- b) *Cultura temporizada pela noradrenalina*: Após o sacrifício (imediatamente antes do início do período de escuro) e extração das glândulas, as mesmas foram colocadas em meio de cultura e sofreram estimulação rítmica de 12 h na presença e 12 h ausência de Nor 1 µM desde o primeiro dia até completar as 72 h de cultura ^(31, 32) (Figura 8C).

Figura 8 – Desenho experimental dos grupos *in vitro*: controle, agudo e temporizado.

(A) agudo: após 48 h de cultura houve uma estimulação com Nor 1 μ M; (B) controle: não houve nenhuma estimulação noradrenérgica; (C) temporizado: estimulação rítmica de 12 h na presença e 12 h ausência de Nor 1 μ M desde o primeiro dia até completar as 72 h de cultura. Em todas as condições, nas últimas 24 h foram coletadas 3 glândulas de cada ponto a cada 3 h. Linha tracejada: momento de troca do meio de cultura.

Importante frisar que em todos os grupos a troca do meio de cultura se deu no mesmo momento: na 12^a, na 36^a e na 60^a hora.

Em todas as culturas as glândulas e os meios de cultura foram coletados ao longo das últimas 24 horas, em intervalos de 3 h. As amostras foram mantidas em gelo seco, e acondicionadas a -80 °C. As glândulas foram posteriormente utilizadas para: extração de RNA e consequente avaliação da expressão gênica de diversos genes, além de serem destinadas à avaliação da atividade enzimática da AANAT. O conteúdo de melatonina foi mensurado pelo método UHPLC.

3.1.3 Experimento piloto para determinação da melhor concentração de bloqueadores noradrenérgicos

Esse experimento foi realizado para a determinação da melhor concentração para a ação dos antagonistas de receptores noradrenérgicos na cultura de glândula pineal. Para tanto uma cultura padrão foi realizada. Após 48h de cultura as glândulas sofreram tratamentos com

as drogas prazosin (bloqueador α_1 específico) ou propranolol (bloqueador inespecífico de receptor β) e 30 min após a adição das mesmas, as glândulas foram estimuladas com noradrenalina (Nor 1 μ M). Os dois bloqueadores adrenérgicos foram testados em várias concentrações, formando os seguintes grupos de tratamento:

- a) Nor 1 μ M após 48h, com estímulo de 5h.
- b) Após cultura de 48h: Prazosin [10^{-5}], e depois 30 min: Nor 1 μ M por 5h.
- c) Após cultura de 48h: Prazosin [10^{-7}], e depois 30 min: Nor 1 μ M por 5h.
- d) Após cultura de 48h: Prazosin [10^{-8}], e depois 30 min: Nor 1 μ M por 5h.
- e) Após cultura de 48h: Prazosin [10^{-10}], e depois 30 min: Nor 1 μ M por 5h.
- f) Após cultura de 48h: Propranolol [10^{-5}], e depois de 30: min Nor 1 μ M por 5h.
- g) Após cultura de 48h: Propranolol [10^{-7}], e depois de 30: min Nor 1 μ M por 5h.
- h) Após cultura de 48h: Propranolol [10^{-8}], e depois de 30: min Nor 1 μ M por 5h.
- i) Após cultura de 48h: Propranolol [10^{-10}], e depois de 30 min: Nor 1 μ M por 5h.

Os meios de cultura foram coletados após 5 horas de incubação e armazenados a -20 °C. Posteriormente o conteúdo de melatonina presente no meio de cultura foi mensurado pelo método de UHPLC.

Após a confirmação da melhor concentração dos bloqueadores noradrenérgicos foi realizado um experimento com cultura temporizada, a fim de verificar se de fato a Nor foi a responsável por modular as alterações vistas nas expressões dos genes.

3.1.4 Experimentos *in vitro*: cultura temporizada com bloqueadores noradrenérgicos

Para esse experimento foram montados os seguintes grupos *in vitro*: temporizado (considerado controle nesse caso), temporizado com adição de prazosin, temporizado com adição de propranolol e temporizado com adição dos antagonistas adrenérgicos combinados:

- a) Temporizado: esse grupo foi realizado como descrito na seção 3.1.2 e na Figura 8C.
- b) Temporizado com adição de prazosin: logo após o sacrifício no ZT12 (transição da fase clara para a fase escura), as glândulas foram colocadas em cultura temporizada como descrito na seção 3.1.2. Porém 30 min antes de

haver a estimulação com noradrenalina, foi adicionado ao meio prazosin 10^{-5} M. Após esse período a noradrenalina ($1 \mu\text{M}$) foi adicionada normalmente. Passadas 12 h o meio foi trocado, deixando a cultura sem qualquer uma dessas drogas durante esse tempo. Esse ciclo foi repetido 3 vezes completando o período de 72 h (Figura 9).

Figura 9 – Experimento *in vitro*: cultura temporizada com adição de Prazosin.

Logo após o sacrifício, as glândulas foram imediatamente postas em cultura, e sofreram a adição de prazosin 10^{-5} M. Após 30 min a noradrenalina (Nor, $1 \mu\text{M}$) foi adicionada. Após período de 12 horas, o meio foi trocado e o meio retirado, permanecendo nessa condição por mais 12 horas. Esse ciclo repetiu-se 3 vezes, até 72 horas completas. Nas últimas 24 h as glândulas foram coletadas a cada 3 h. Barra cinza = presença de Nor; Barra branca = ausência de Nor.

- c) Temporizado com adição de propranolol: logo após o sacrifício no ZT12 (transição da fase clara para a fase escura), as glândulas foram colocadas em cultura temporizada como descrito na seção 3.1.2. Porém 30 min antes de haver a estimulação com noradrenalina, foi adicionado ao meio propranolol 10^{-5} M. Após esse período, a noradrenalina foi adicionada normalmente. Passadas 12 h o meio foi então trocado, deixando a cultura sem qualquer uma dessas drogas durante esse tempo. Esse ciclo foi repetido 3 vezes completando o período de 72 h (Figura 10).

Figura 10 - Experimento *in vitro*: cultura temporizada com adição de propranolol.

Logo após o sacrifício, as glândulas foram imediatamente postas em cultura, e sofreram a adição de propranolol 10^{-5} M. Após 30 min a noradrenalina (Nor, 1 µM) foi adicionada. Após período de 12 horas, o meio foi trocado e o meio retirado, permanecendo nessa condição por mais 12 horas. Esse ciclo repetiu-se 3 vezes, até 72 horas completas. Nas últimas 24 h as glândulas foram coletadas a cada 3 h. Barra cinza = presença de Nor; Barra branca = ausência de Nor.

- d) Temporizado com adição de prazosin e propranolol combinados: logo após o sacrifício no ZT12 (transição da fase clara para a fase escura), as glândulas foram colocadas em cultura temporizada como descrito na seção 3.1.2. Porém 30 min antes de haver a estimulação com noradrenalina, foi adicionado ao meio prazosin e propranolol, ambas as drogas na concentração de 10^{-5} M. Após esse período, a noradrenalina foi adicionada normalmente. Passadas 12 h o meio foi então trocado, deixando a cultura sem qualquer uma dessas drogas durante esse tempo. Esse ciclo foi repetido 3 vezes completando o período de 72 h (Figura 11).

Figura 11 – Experimento *in vitro*: cultura temporizada com adição combinada de prazosin e propranolol.

Logo após o sacrifício, as glândulas foram imediatamente postas em cultura, e sofreram a adição de prazosin e propranolol combinados (ambos com 10^{-5} M). Após 30 min a noradrenalina (Nor, 1 μ M) foi adicionada. Após período de 12 horas, o meio foi trocado e o meio retirado, permanecendo nessa condição por mais 12 horas. Esse ciclo repetiu-se 3 vezes, até 72 horas completas. Nas últimas 24 h as glândulas foram coletadas a cada 3 h. Barra cinza = presença de Nor; Barra branca = ausência de Nor.

Mais uma vez, assim como mencionado na seção 3.1.2, o meio de cultura de todos os grupos foi trocado no mesmo horário: 12^a, 36^a e 60^a hora de cultura.

Em todos os grupos (temporizado, prazosin, propranolol e combinação das duas drogas), ao longo das últimas 24 h, as glândulas e os meios foram coletados a cada 3 h. Em cada tempo de coleta, 3 glândulas e seus respectivos meios de cultura foram coletadas para cada um dos grupos mencionados. As amostras foram mantidas em gelo seco, e acondicionadas a -80 °C. As glândulas foram destinadas à extração de RNA e consequente avaliação da expressão gênica de diversos genes, já o conteúdo de melatonina no meio de cultura foi mensurado pelo método da UHPLC.

3.2 Extração de RNA

Para que fosse realizada a extração do RNA, as glândulas foram descongeladas em gelo, evitando a degradação do RNA. Em seguida cada glândula foi homogeneizada em 800 μ L de Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) com o auxílio de um pistilo. Esse macerado foi deixado durante 5 min em temperatura ambiente. A seguir foi adicionado em cada amostra 160 μ L de clorofórmio, e as mesmas foram submetidas a homegeneização no Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, EUA). Essa mistura foi deixada mais uma vez em temperatura ambiente durante 10 min e levada para a centrifuga refrigerada (5417R, Eppendorf, Alemanha) durante 15 min a 4 °C e em uma velocidade de 12000 g. Em seguida, o sobrenadante aquoso foi transferido para uma nova série de tubos Eppendorfs® com 1 μ g

glicogênio. As amostras foram deixadas em temperatura ambiente e nelas foi acrescentado 400 µL de isopropanol, após mistura por inversão, cada amostra foi acondicionada a -20 °C, por um período de até 24 h.

Após esse período, as amostras foram levadas para a centrífuga durante 20 min a 4 °C e em uma velocidade de 12000 g, para a formação do precipitado. Após a centrifugação jogou-se fora o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado restante 800 µL de álcool etílico (EtOH) gelado a uma concentração de 75%. E mais uma vez as amostras foram levadas à centrífuga durante 10 min a 4 °C em uma velocidade de 12000 g. O precipitado foi localizado e o sobrenadante descartado, as amostras foram deixadas por 10 min em temperatura ambiente, para que o álcool anteriormente adicionado evaporasse por completo. Após esse período, foi adicionado em cada amostra 12 µL de H₂O deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) para dissolução do precipitado. As amostras sofreram rápida centrifugação e foram deixadas por mais 10 min em temperatura ambiente, para que houvesse certeza de que o precipitado foi dissolvido. A seguir as amostras foram armazenadas a -20 °C.

Após a extração de RNA, as amostras sofreram tratamento com DNase, utilizando-se o kit Turbo DNA-free™ (Ambion, Austin, Texas, EUA). Como o volume final da amostra foi de 12 µL, adicionou-se à própria amostra 1 µL da enzima Turbo DNase e 2 µL de Tampão Turbo DNase. As amostras foram misturadas por inversão e levadas à centrífuga para uma rápida centrifugação. Após foram deixadas a 37 °C por 30 min. Em seguida foram imediatamente colocadas em gelo e sofreram a adição de 2,2 µL do reagente de inativação do kit. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 2 min, homogeneizadas por inversão e centrifugadas por 1 min à velocidade de 10000 g. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para uma nova série de tubos Eppendorfs® e o precipitado foi descartado.

As amostras livres de DNA foram quantificadas no NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA). Os dados obtidos a partir dessa análise foram utilizados para calcular o volume necessário da amostra oriunda da extração de RNA total, para que houvesse uma concentração de 1 µg/µL de RNA em um volume final de 10 µL.

3.3 Obtenção de cDNA

Após esse procedimento as amostras sofreram a reação de transcriptase reversa pelo kit SuperScript™ III Antisense Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) para a obtenção de cDNA. Adicionou-se então à amostra 1 µL de dNTP mix e 1 µL de random

primers, tendo portando como volume final 12 μ L. Essas amostras foram colocadas no termociclador MyGene™ Series Gradient Thermal Cycler (LongGene®, EUA) que foi programado de acordo com as seguintes especificações de ciclo descritas pelo fabricante do kit: 65 °C por 5 min, retirou-se as amostras do aparelho e as mesmas foram postas em gelo durante 1 min e adicionou-se em cada amostra 8 μ L de um mix previamente preparado. Foram recolocadas no termociclador a 25 °C por 5 min, depois a 50 °C por 60 min e por fim 70 °C por 15 min para a desnaturação da enzima. O mix continha para cada amostra: 4 μ L de tampão de enzima, 2 μ L de DDT, 1 μ L de transcriptase reversa e 1 μ L de H₂O estéril.

Ao término da reação as amostras foram armazenadas a -20 °C.

3.4 Análise quantitativa da expressão gênica por reação de cadeia em polimerase (PCR) em tempo real

As amostras foram descongeladas em gelo e diluídas dez vezes em água Ultra-Pure™ Distilled Water (Gibco, EUA) para que chegassem à concentração de 5 ng/ μ L de cDNA. Para a preparação das placas utilizadas na corrida de PCR em tempo real foram pipetados em cada poço 2 μ L de amostra e também 10,5 μ L do mix, composto por: 6,25 μ L de Power SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), 3,25 μ L de água Ultra-Pure, 0,5 μ L de cada primer (sense e antisense) com concentração de 10 μ M, por cada gene investigado (volume final por poço de 12,5 μ L).

Os primers usados foram desenhados de modo que sua localização lhes permitisse flanquear um íntron, impossibilitando a amplificação de DNA genômico. A eficiência dos pares de primers foi testada e determinada por reação de PCR em tempo real utilizando diluições (10^7 a 10^2 cópias dos respectivos fragmentos clonados, nas mesmas condições e com o mesmo aparelho usado para todas as outras análises que se seguiram). A eficiência dos primers se deu pela análise da regressão linear feita utilizando o software 7500 versão 2.0.3 (Applied Biosystems, EUA). Os seguintes primers foram utilizados: *Rpl*, *B-actina*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, *Per2*, *Aanat* e *Dbp*, os quais foram desenhados a partir da sequência genômica de rato disponível no GenBank® (NCBI – NIH, EUA), e fabricados por IDT. A tabela com a sequência genômica dos primers utilizados se encontra na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos primers utilizados.

Primer	Nº Acesso	Sequências	Fragmento
<i>Aanat</i>	NM_012818.2	5' – CCGGAGGATGCCACCA – 3' 5' – CCGGATCTCATCCAAGTGGA – 3'	89bp
<i>B-actina</i>	NM_031144	5' – CTAGGAGCCAGGGCAGTAATCT – 3' 5' – AAGACCTCTATGCCAACACAGTG – 3'	97bp
<i>Bmal1</i>	NM_024362.2	5' – CCGATGACGAACTGAAACACC – 3' 5' – TCTTCCCTCGGTCACATCCT – 3'	77bp
<i>Cry1</i>	NM_198750.2	5' – TTCGCCGGCTCTTCCAA – 3' 5' – ATTGGCATCAAGGTCCTCAAGA – 3'	74bp
<i>Cry2</i>	NM_133405.1	5' – TCAGCGTGAATGCAGGCA – 3' 5' – AGGGCAGTAGCAGTGGAAGAAC – 3'	76bp
<i>Dbp</i>	NM_012543.2	5' – CTGCAGGGAAACAGCAAGC – 3' 5' – GAGGGCAGAGTTGCCTTGC – 3'	76bp
<i>Per1</i>	NM_001034125.1	5' – CTGCCTCAGGCCCTCGA – 3' 5' – GTCCGAGTGGCCAGGATCTT – 3'	71bp
<i>Per2</i>	NM_031678.1	5' – GCAGCCTTTCGATTATTCTCCC – 3' 5' – GGACCAGCTAGTGTCCAGTGTG – 3'	75bp
<i>Rev-erba</i>	NM_145775.1	5' – AGGTGACCCTGCTTAAGGCTG – 3' 5' – ACTGTCTGGTCCTTACGTTGA – 3'	81bp
<i>Rpl37a</i>	NM_001108801	5' – CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG – 3' 5' – GCCACTGTTTTTCATGCAGGAAC – 3'	93bp

Nessa tabela estão listados os primers utilizados, desenhados a partir das informações obtidas pela GenBank™ (NCBI – NIH, Bethesda, EUA), sendo informados também as sequências sense e antisense, além do tamanho dos fragmentos amplificados.

Fonte: NCBI – NHI, Bethesda, EUA.

Em cada placa, também foi adicionado um poço denominado normalizador. Esse poço continha a mesma amostra de cDNA (no caso extraído de fígado) em todas as placas, afim de se manter um controle entre placas. Além disso, a quantificação absoluta qPCR foi permitida devido a preparação de uma curva de DNA padrões para cada gene investigado, obtido a partir de clonagens e com um número de moléculas conhecido. Essa curva foi composta por valores de 10^2 a 10^6 moléculas.

Depois de pipetadas as amostras, a curva de padrões, a amostra controle e o normalizador o mix supracitado foi adicionado, e então as placas foram seladas e centrifugadas por 1 min em velocidade de 500 rpm. Após esse período foram levadas para o aparelho de PCR em tempo real 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA).

Para a amplificação do material contido na placa, foram utilizados os seguintes parâmetros: etapa inicial de ativação da enzima mantendo as amostras à 50 °C durante 1 min e 95 °C por 10 min. Em seguida as amostras foram submetidas a 40 ciclos que incluíram a desnaturação à 95 °C por 15 s, seguido por anelamento dos primers e a extensão a 60 °C por 1

min. Finalmente após essa série de ciclos, as amostras foram submetidas à 1 ciclo para análise do *melting* que consistiu em 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min e posterior aumento gradativo da temperatura até atingir 95 °C.

As curvas de *melting* e a quantificação do número de cópias de cada gene foram determinados pelo próprio software do equipamento.

A quantificação de número de cópias se baseia no método de derivação secundária, que se baseia na comparação entre o valor de amplificação de cada amostra, com a curva de padrões composta de diluições de plasmídeos recombinantes contendo cópias clonadas dos genes de interesse.

Os resultados obtidos das amostras após a reação de polimerase em cadeia em tempo real foram normalizados pela média entre os dois genes constitutivos: *Rpl37a* e *β-actina*.

3.5 Clonagem e obtenção dos padrões

Os pares de primers dos genes foram utilizados para a obtenção dos fragmentos amplificados para o gene de interesse

Após a amplificação, procedeu-se a eletroforese em gel de agarose 1,2% (Sigma Biochemical CO, EUA) e os pares de primers que apresentaram somente um fragmento amplificado no tamanho esperado foram escolhidos para serem usados nas reações subsequentes. Os procedimentos de clonagem foram feitos individualmente para cada fragmento.

Em seguida houve a ligação do fragmento amplificado ao vetor pGEM-T easy (Promega Corporation, , EUA) que foi feita adicionando 3 µL da reação de PCR que mostrou somente um fragmento amplificado à 5 µL do tampão de ligação, 0,5µL do vetor pGEM-T easy e 1 µL da enzima T4 DNA ligase. A reação foi gentilmente misturada e incubada a temperatura ambiente por 1 hora.

Com o fragmento inserido no vetor, a transformação de bactérias *E. coli* competentes foi feita adicionando 2 µL da ligação à 25 µL de bactérias TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A reação foi incubada em gelo por 20 min, seguidos de 50 s a 42 °C e de 2 min novamente no gelo. Esse procedimento de transformação é conhecido como *heat-shock*. As bactérias transformadas foram adicionadas a 200 µL de meio SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas a 37 °C por 1 hora, com agitação plana de 225 rpm.

As bactérias foram então semeadas em placas de cultura com meio LB (Luria Bertani) Agar adicionado de 50 µg/ml de ampicilina (KD Medical, Inc., Columbia, MD, EUA), 100

μL de IPTG (isopropil-B-D-tiogalactosídeo) e 20 μL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil-B-D-galactosídeo), ambos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 12 horas.

Devido à aplicação de IPTG e X-gal, pôde-se realizar a seleção das colônias bacterianas que possuíam o inserto de interesse. Colônias azuis não continham inserto, possuindo vetores intactos que puderam expressar β-galactosidase ativa capaz de reagir com X-gal e resultar na coloração azul. Colônias brancas por sua vez apresentavam o inserto que interrompeu a sequência codificadora da β-galactosidase (Sambrook e Russel, 2001).

Após incubação, 4 colônias brancas de cada fragmento foram adicionadas individualmente a tubos contendo 2 mL de meio LB (Luria Bertani, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) acrescidos de 2 μL de ampicilina (1 mg/mL, Sigma Biochemical CO, St. Louis, MO, EUA). As culturas líquidas foram incubadas a 37 °C por 12 horas, com agitação plana de 225 rpm.

As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min para formação do precipitado de bactérias, o sobrenadante foi descartado e a obtenção de *mini-prep* foi feita utilizando o kit QIAprep® Miniprep (Qiagen, Germantown, MD, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. As preparações tiveram suas concentrações aferidas pelo aparelho NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

O material genético das bactérias recombinantes obtido pela preparação de *mini-prep* foi submetido à análise de restrição com a enzima EcoRI (Fermentas Life Sciences, Burlington, Oregon, Canadá) e posterior eletroforese em gel de agarose 1,2% (Sigma Biochemical CO, St. Louis, EUA) para confirmação da presença do fragmento de interesse. As preparações que se evidenciaram positivas para presença do fragmento foram enviadas para sequenciamento utilizando os serviços da empresa Macrogen USA (Rockville, MD, EUA).

As sequências recebidas foram analisadas utilizando o *software* BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EUA) e comparadas à base de dados de nucleotídeos Entrez Nucleotide (NCBI – NIH, Bethesda, EUA) para análise da localização cromossômica e similaridade com a sequência genômica para os respectivos genes. Os fragmentos clonados foram considerados adequados para uso como padrão, nas reações de PCR em tempo real, quando apresentaram igualdade às sequências descritas para aqueles genes na referida base de dados.

A obtenção de 10⁹ cópias dos fragmentos clonados foi feita através de cálculos matemáticos utilizando a concentração e tamanho dos plasmídeos, o tamanho dos fragmentos

clonados e o número de Avogrado. Diluições seriadas (10^7 a 10^2 cópias) foram feitas em água MilliQ imediatamente antes de cada reação de PCR em tempo real. Cada diluição foi pipetada em duplicata e passou pelos mesmos procedimentos descritos para as amostras. Tanto amostras quanto diluições para curva padrão foram sempre amplificadas no mesmo bloco de reações.

3.6 Dosagem da melatonina pelo UHPLC

O conteúdo de melatonina presente no meio de cultura das glândulas pineais foi dosado por cromatografia líquida de ultra-alta performance (Dionex UHPLC Ultimate 3000) com detecção eletroquímica (Dionex/ESA) e injetor automático (WPS-3000TSL) e controlado pelo programa computacional Chromeleon. A melatonina foi separada em uma coluna Acclaim RSLC 120 C18 (partícula esférica de $2,2\mu\text{m}$, 120 Å, $100 \times 2,1 \text{ mm}$) O sistema cromatográfico foi isocraticamente operado com fase móvel: 0,1 M de acetato de sódio, 0,1 M de ácido cítrico, 0,15 mM EDTA, 30% de metanol, pH 3,7, em um fluxo de 0,135 mL/min. O potencial do detector eletroquímico foi ajustado para +750 mV na célula guarda e +700 mV na célula analítica modelo ESA 5041. O tempo de eluição da melatonina foi em torno de 7 min. O meio de cultura (70 μL de cada amostra) foi tratada com uma solução de ácido perclórico 0,1 M (60 μL), contendo 0,02% de EDTA e 0,02% de sódio bissulfito. Após a adição do ácido perclórico, as amostras foram postas na centrífuga refrigerada por 20 min à 4°C , e à velocidade de 14 000 g.

No início das dosagens, curvas de calibração com 5 concentrações conhecidas do padrão (melatonina) foram realizadas. As curvas de calibração foram obtidas pela relação das diferentes concentrações de cada padrão com as áreas dos picos correspondentes nos cromatogramas. A identificação do pico de melatonina das amostras foi realizada pela comparação de seu tempo de retenção com a dos padrões, e a quantificação foi realizada pelo programa computacional.

3.7 Análise radiométrica da atividade enzimática da AANAT

Esse método se baseia 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 N-acetiltransferase. O produto marcado foi extraído em clorofórmio e então a sua radioatividade foi medida⁽⁷¹⁾. Protocolo modificado por Parfitt et. al (1975)⁽⁶⁸⁾.

Sendo assim, foram adicionados aos tubos de microcentrífuga, contendo uma glândula pineal, 25 µl de triptamina (40mM), 25 µl de [3H] acetil CoA (2mM, atividade final = 4mCi / mmol) e 50 µl de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH=6,8), mantidos no gelo. As glândulas foram sonicadas e incubadas em banho seco a 37°C, por 20 min em um agitador. A seguir, em cada amostra, foi acrescentado 1 mL de clorofórmio saturado com água, sendo em seguida agitados por 1 min. Para a separação completa das fases aquosa e lipossolúvel, as amostras foram centrifugadas a 14000 g durante 1 min.

A fase aquosa foi removida e acrescentou-se 200 µl do tampão fosfato. Mais uma vez as amostras foram agitadas, centrifugadas e a fase aquosa foi removida. Foi então transferido 500 µl do clorofórmio contendo o produto de reação (3H-N-aceptramina) para o tubo de cintilação. As amostras ficaram em repouso até a total evaporação do clorofórmio com o produto de reação. Após essa etapa, foi acrescido o líquido de cintilação para amostras não aquosas (Optiphase Hisafe-PerkinElmer, EUA) e a radioatividade foi medida em contador β (Beckman – LS 6500, EUA).

3.8 Análise estatística

Os resultados obtidos a partir da expressão gênica, UHPLC e atividade enzimática foram representados como média ± EPM. Para cada grupo experimental havia n = 4 glândulas por ponto e cada condição foi replicada 3 vezes. Os grupos experimentais foram analisados através do teste ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni, para avaliar a influência da variável “tempo” em cada série temporal usando o programa computacional *Graphpad Prism data analysis and graph package* (v 5.01, Graphpad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Portanto, cada série temporal que apresentou variação ao longo das 24 h estatisticamente definida pela ANOVA de uma via, teve a sua ritmicidade avaliada pela aplicação do método do Cosinor que implica em ajustar, pelo método dos quadrados mínimos, uma curva cosseno aos dados e testar estatisticamente se a amplitude da curva obtida foi diferente ou não de zero. Foi considerado como variação significativa quando $p < 0,05$. Além disso, para cada série temporal, a acrofase, mesor e amplitude de cada curva ajustada foram calculadas. Quando apropriado esses parâmetros rítmicos foram comparados entre os grupos usando o teste T Student's ⁽⁷²⁾. Quando necessário também houve a análise estatística pela ANOVA de duas vias não pareadas, para verificar a influência do tratamento utilizado sobre o parâmetro analisado.

4 RESULTADOS

4.1 Experimentos *in vivo* e *in vitro* (grupos controle, agudo e temporizado)

4.1.1 Análise do perfil diário de RNAm dos genes relógio, genes dependente do relógio e do gene *Aanat*

Como já mencionado previamente, os genes analisados após todo o processamento das amostras e conseqüente análise pelo qPCR foram:

- a) os genes relógio: *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, *Per2* e *Rev-erba*.
- b) os genes dependentes do relógio: *Dbp*.
- c) o gene envolvido na síntese de melatonina: *Aanat*.

4.1.1.1 *Bmal1*

As extrações de RNA foram realizadas com alíquotas previamente obtidas de homogeneizados, como já descrito anteriormente. A análise quantitativa e qualitativa do RNA total pós extração e pós tratamento com DNase foi feita utilizando o NanoDrop™ 1000 como já mencionado.

A curva diária da expressão do RNAm do gene *Bmal1* apresentou variação no grupo *in vivo* (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,0001$) (Figura 12A). Após ser submetido à análise pelo Cosinor foi possível comprovar que essa variação foi rítmica ($p < 0,05$), dando origem aos parâmetros de mesor, amplitude (Tabela 2) e acrofase (Figura 20).

Uma vez que as glândulas foram submetidas à situação *in vitro*, notou-se a perda do padrão circadiano observado *in vivo*, tanto no grupo controle (sem estimulação noradrenérgica), quanto no grupo agudo (com estimulação noradrenérgica apenas por 12 h) demonstrado através da não variação entre os pontos após análise pela ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p > 0,05$) (Figura 12B e 12C, respectivamente).

De acordo com o esperado, após as glândulas serem submetidas à cultura com temporização adrenérgica, foi possível observar a manutenção da variação do gene *Bmal1* ao longo do período analisado, comprovado pelo teste ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p < 0,0001$) (Figura 12D).

Figura 12 – Perfil diário de RNAm do gene *Bmal1* *in vivo* e *in vitro* (grupos controle, agudo e temporizado).

(A) *In vivo*; (B) *In vitro* – Controle; (C) *In vitro* – estimulação aguda com Nor 1µM; (D) *In Vitro* – estimulação temporizada com Nor 1µM. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. . ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e D e $p > 0,05$ em B e C. Dados plotados como média±EPM. Barra branca = claro/sem estimulação noradrenérgica; Barra preta = período de escuro; Barra listrada = estimulação com Nor 1µM (n = 3 glândulas em A; n = 4 glândulas por ponto em B, C e D).

Após a análise realizada pelo Cosinor demonstrou-se que essa variação do grupo *in vitro* temporizado foi circadiana e determinaram-se os valores de mesor e amplitude observados na Tabela 2, e de acrofase observado na Figura 20.

Tabela 2 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene *Bmal1* sob as condições *in vivo* e *in vitro* temporizado.

	In Vivo	Temporizado
Mesor	2,40 ± 0,24	3,41 ± 0,19*
Amplitude	1,26 ± 0,35	1,79 ± 0,26

Valores comparados entre si através do Teste-T bicaudal não pareado. * $p < 0,05$, In Vivo x Temporizado. Média ± EPM.

De acordo com a Tabela 2, nota-se que o mesor do grupo *in vitro* temporizado foi maior que o do grupo *in vivo*. Porém os valores de amplitude não foram diferentes entre si.

Os valores de acrofase foram plotados em um mapa de fase demonstrado pela Figura 20. As acrofases da curva de *Bmal1* para os grupos *in vivo* ($0,28 \pm 1,03$) e *in vitro*

temporizado ($10,32 \pm 0,34$, equivalente a um “ZT” 22,32, ou seja pico no fim da fase escura), plotados no mapa de fase foram submetidos ao Teste-T bicaudal não pareado. Não foi encontrada diferença estatística entre esses dois pontos ($p > 0,05$). Ou seja, ambas as curvas apresentam o seu ponto máximo no fim da fase escura e início da fase clara.

4.1.1.2 *Cry1*

No grupo *in vivo* a curva do RNAm do gene *Cry1* variou ao longo do dia (Figura 13A). Essa variação foi rítmica de acordo com o Cosinor ($p < 0,01$), dando origem aos parâmetros de mesor, amplitude e acrofase demonstrados na Tabela 3 e na Figura 20. Assim que as glândulas foram submetidas aos grupos controle e agudo houve perda de variação no período (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p > 0,05$) (Figura 13B e 13C).

Ao serem submetidas à cultura com temporização adrenérgica, observou-se a manutenção da variação circadiana encontrada em *Cry1* (Figura 13D).

Figura 13 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry1* *in vivo* e *in vitro* (grupos controle, agudo e temporizado).

(A) *In vivo*; (B) *In vitro* – Controle; (C) *In vitro* – estimulação aguda com Nor 1μM; (D) *In vitro* – estimulação temporizada com Nor 1μM. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. . ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e D e $p > 0,05$ em B e C. Dados plotados como média±EPM. Barra branca = claro/sem estimulação noradrenérgica; Barra preta = período de escuro; Barra listrada = estimulação com Nor 1μM (n = 3 glândulas em A; n = 4 glândulas por ponto em B, C e D).

Outro detalhe importante a ser observado, é a relação existente entre o perfil de expressão *in vivo* de *Cry1* e *Bmall*. O momento de maior expressão de *Bmall* coincide com o momento de menor expressão de *Cry1*, exibindo perfis de expressão opostos. Esse perfil não foi observado no grupo *in vitro* temporizado.

Uma vez verificada a presença de variação entre os pontos nos perfis diários nos grupos *in vivo* e temporizado, as curvas foram submetidas à análise pelo Cosinor. Em ambos os casos foram verificados a presença de uma variação rítmica, dando origem aos parâmetros rítmicos mesor e amplitude, mostrados na Tabela 3 e o parâmetro acrofase mostrado na Figura 20.

Tabela 3 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene *Cry1* sob as condições *in vivo* e *in vitro* temporizado.

	In Vivo	Temporizado
<i>Mesor</i>	0,38 ± 0,02	0,93 ± 0,06*
<i>Amplitude</i>	0,12 ± 0,02	0,48 ± 0,08*

Valores comparados entre si através do Teste-T bicaudal não pareado. * $p < 0,05$, In Vivo x Temporizado. Média ± EPM.

De acordo com a Tabela 3, viu-se que os parâmetros mesor e amplitude foram modificados após as glândulas serem submetidas à condição *in vitro* temporizado.

Com relação aos valores de acrofase (Figura 20), viu-se que as acrofases da curva de *Cry1* para os grupos *in vivo* ($18,11 \pm 0,47$) e *in vitro* temporizado ($9,53 \pm 0,40$, equivalente à um “ZT” 21,32), plotados no mapa foram considerados diferentes entre si após o Teste-T bicaudal não pareado, com $p < 0,01$. Mesmo com essa diferença estatística presente entre os pontos máximos da curva, ambas as curvas exibem a acrofase durante a fase escura.

4.1.1.3 *Cry2*

Semelhantemente aos genes já mencionados, o gene *Cry2* exibiu curva diária de RNAm com variação entre os pontos no grupo *in vivo* (Figura 14A). Após ser submetido à análise pelo Cosinor foi possível comprovar que essa variação também foi rítmica ($p < 0,001$), dando origem aos parâmetros de mesor, amplitude e acrofase demonstrados na Tabela 4 e na figura 20.

E da mesma forma que aconteceram aos outros genes, quando as glândulas foram submetidas à situação *in vitro*, houve a perda do padrão rítmico, tanto no grupo controle quanto no agudo, demonstrado através da não variação entre os pontos ao longo do dia após análise pelo teste ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p > 0,05$) (Figura 14B e 14C, respectivamente).

E confirmando o anteriormente visto, uma vez que as glândulas foram submetidas à cultura com temporização adrenérgica, foi novamente possível observar a manutenção da variação circadiana encontrada em *Cry2* (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni com $p < 0,0001$) (Figura 14D).

Figura 14 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry2* *in vivo* e *in vitro* (grupos controle, agudo e temporizado).

(A) *In vivo*; (B) *In vitro* – Controle; (C) *In vitro* – estimulação aguda com Nor 1μM; (D) *In Vitro* – estimulação temporizada com Nor 1μM. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. . ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e D e $p > 0,05$ em B e C. Dados plotados como média±EPM. Barra branca = claro/sem estimulação noradrenérgica; Barra preta = período de escuro; Barra listrada = estimulação com Nor 1μM (n = 3 glândulas em A; n = 4 glândulas por ponto em B, C e D).

Importante observar a relação existente entre o perfil de expressão *in vivo* de *Cry2* e *Bmal1*. O momento de maior expressão de *Bmal1* coincide com o momento de menor expressão de *Cry2* (uma vez que seus pontos de maior expressão se dão no início da fase escura e no fim da fase clara), exibindo, portanto, um padrão de expressão oposto. Esse perfil

também não pode ser observado no grupo *in vitro* temporizado, uma vez que tanto em *Bmal1*, quanto em *Cry2* os momentos de maior expressão foram aqueles próximos ao fim do período escuro.

Assim, como nos outros genes, uma vez verificada a presença de variação entre os pontos nos perfis diários nos grupos *in vitro* e temporizado, as curvas foram então submetidas à análise pelo Cosinor. Em ambos os casos foram verificados a presença de uma variação rítmica, dando origem aos parâmetros rítmicos mesor, amplitude (mostrados na Tabela 4) e acrofase (Figura 20).

Tabela 4 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene *Cry2* sob as condições *in vivo* e *in vitro* temporizado.

	In Vivo	Temporizado
<i>Mesor</i>	3,12 ± 0,19	3,56 ± 0,33
<i>Amplitude</i>	1,66 ± 0,28	1,76 ± 0,47

Valores comparados entre si através do Teste-T bicaudal não pareado. $p > 0,05$, In Vivo x Temporizado. Média ± EPM.

A partir dos dados contidos na Tabela 4, observou-se que os parâmetros mesor e amplitude não foram modificados após as glândulas serem submetidas à condição *in vitro* temporizado, afinal após a realização do Teste-T bicaudal não pareado obteve-se um $p > 0,05$.

Com relação aos valores de acrofase (Figura 20), viu-se que as acrofases da curva de *Cry1* para os grupos *in vivo* ($15,46 \pm 0,38$) e *in vitro* temporizado ($8,29 \pm 1,02$, equivalente a um “ZT” 20,29), plotados no mapa foram considerados diferentes entre si após o Teste-T bicaudal não pareado, com $p < 0,05$. Assim como em *Cry1*, apesar dessa diferença estatística presente entre os pontos máximos da curva, ambas as curvas exibem a acrofase durante a fase escura.

4.1.1.4 *Per1*

Como já visto em todos os genes anteriores, a curva diária do RNAm do gene *Per1* também apresentou variação ao longo do dia no grupo *in vivo* (Figura 17A). Após ser submetido à análise pelo Cosinor foi possível comprovar que essa variação também foi circadianamente rítmica ($p < 0,001$), dando origem aos parâmetros de mesor, amplitude e acrofase demonstrados na Tabela 5 e na Figura 20.

Mais uma vez, ao submeter glândulas à condição *in vitro*, houve a perda do padrão circadiano observado *in vivo*, tanto no grupo controle quanto no grupo agudo, demonstrado através da não variação entre os pontos ao longo do dia após análise pelo teste ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p > 0,05$) (Figura 15B e 15C, respectivamente).

E assim como demonstrado anteriormente, após as glândulas serem submetidas à cultura com temporização adrenérgica, foi possível observar a manutenção da variação circadiana (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni com $p < 0,001$) (Figura 15D).

Figura 15 – Perfil diário de RNAm do gene *Per1* *in vivo* e *in vitro* (grupos controle, agudo e temporizado).

(A) *In vivo*; (B) *In vitro* – Controle; (C) *In vitro* – estimulação aguda com Nor 1µM; (D) *In Vitro* – estimulação temporizada com Nor 1µM. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. . ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e D e $p > 0,05$ em B e C. Dados plotados como média±EPM. Barra branca = claro/sem estimulação noradrenérgica; Barra preta = período de escuro; Barra listrada = estimulação com Nor 1µM (n = 3 glândulas em A; n = 4 glândulas por ponto em B, C e D).

Sobre a relação existente entre o perfil de expressão *in vivo* de *Per1* e *Bmal1*, é possível perceber que no momento de maior expressão de *Bmal1* (transição entre fase escura e clara) houve a menor expressão de *Per1* e vice-versa, no meio da fase escura houve maior expressão de *Per1*, e uma baixa expressão de *Bmal1*. Esse perfil também não pôde ser

observado no grupo *in vitro* temporizado, uma vez que tanto em *Bmal1*, quanto em *Per1* houve momentos coincidentes de maior expressão.

Uma vez verificada a presença de variação entre os pontos nos perfis diários nos grupos *in vitro* e temporizado, as curvas foram então submetidas à análise pelo Cosinor. Em ambos os grupos foram verificados a presença de uma variação rítmica, dando origem aos parâmetros rítmicos mesor, amplitude (Tabela 5) e acrofase (Figura 20).

Tabela 5 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene *Per1* sob as condições *in vivo* e *in vitro* temporizado.

	In Vivo	Temporizado
<i>Mesor</i>	0,94 ± 0,10	1,43 ± 0,21
<i>Amplitude</i>	0,68 ± 0,14	1,12 ± 0,30

Valores comparados entre si através do Teste-T bicaudal não pareado. $p > 0,05$, In Vivo x Temporizado. Média ± EPM.

A partir dos parâmetros obtidos e exibidos na Tabela 5, observou-se que mesor e amplitude não foram modificados após as glândulas serem submetidas à condição *in vitro* temporizado, afinal após a realização do Teste-T bicaudal não pareado obteve-se um $p > 0,05$.

Com relação aos valores de acrofase (Figura 20), viu-se que as acrofases da curva de *Per1* para os grupos *in vivo* ($17,05 \pm 0,48$) e *in vitro* temporizado ($7,11 \pm 1,01$, equivalente à um “ZT” 19,29), plotados no mapa não foram considerados diferentes entre si após o Teste-T bicaudal não pareado, com $p > 0,05$, ambas acrofases presentes na fase escura do dia.

4.1.1.5 *Per2*

Assim como em *Per1*, a curva diária do RNAm do gene *Per2* também apresentou variação ao longo do dia no grupo *in vivo* (Figura 16A). Após ser submetido à análise pelo Cosinor foi possível comprovar que essa variação também foi circadianamente rítmica ($p < 0,001$), dando origem aos parâmetros de mesor, amplitude e acrofase demonstrados na Tabela 6 e na Figura 20.

Na condição *in vitro*, houve a perda do padrão circadiano observado *in vivo*, tanto no grupo controle quanto no grupo agudo, demonstrado através da não variação entre os pontos ao longo do dia após análise pelo teste ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p > 0,05$) (Figura 16B e 16C, respectivamente).

E como nas análises dos outros genes, após as glândulas serem submetidas à cultura com temporização adrenérgica, foi possível observar a manutenção da variação circadiana, após-teste ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,0001$ (Figura 16D).

Figura 16 – Perfil diário de RNAm do gene *Per2* *in vivo* e *in vitro* (grupos controle, agudo e temporizado).

(A) *In vivo*; (B) *In vitro* – Controle; (C) *In vitro* – estimulação aguda com Nor 1 μ M; (D) *In vitro* – estimulação temporizada com Nor 1 μ M. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e D e $p > 0,05$ em B e C. Dados plotados como média $\pm$ EPM. Barra branca = claro/sem estimulação noradrenérgica; Barra preta = período de escuro; Barra listrada = estimulação com Nor 1 μ M. (n = 3 glândulas em A; n = 4 glândulas por ponto em B, C e D).

Sobre a relação existente entre o perfil de expressão *in vivo* de *Per2* e *Bmal1*, é possível perceber que no momento de maior expressão de *Bmal1* (transição entre fase escura e clara) houve a menor expressão de *Per2* e vice-versa, no meio da fase escura houve maior expressão de *Per2*, e uma baixa expressão de *Bmal1*, exibindo, portanto, um padrão de expressão não coincidente. Esse perfil também não pôde ser observado no grupo *in vitro* temporizado, uma vez que tanto em *Bmal1*, quanto em *Per2* houve momentos coincidentes de maior expressão.

Uma vez verificada a presença de variação entre os pontos nos perfis diários nos grupos *in vitro* e temporizado, as curvas foram então submetidas à análise pelo Cosinor. Em ambos os grupos foram verificados a presença de uma variação rítmica, dando origem aos parâmetros rítmicos mesor, amplitude (mostrados na Tabela 6) e acrofase (Figura 20).

Tabela 6 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene *Per2* sob as condições *in vivo* e *in vitro* temporizado.

	In Vivo	Temporizado
<i>Mesor</i>	0,32 ± 0,03	0,27 ± 0,02
<i>Amplitude</i>	0,14 ± 0,04	0,10 ± 0,02

Valores comparados entre si através do Teste-T bicaudal não pareado. $p > 0,05$, In Vivo x Temporizado. Média ± EPM.

Após análise dos dados contidos na Tabela 6, pôde-se notar que os parâmetros mesor e amplitude não foram modificados após as glândulas serem submetidas à condição *in vitro* temporizado, afinal após a realização do Teste-T bicaudal não pareado obteve-se um $p > 0,05$.

Com relação aos valores de acrofase (Figura 20), viu-se que as acrofases da curva de *Cry1* para os grupos *in vivo* ($17,56 \pm 1,06$) e *in vitro* temporizado ($6,27 \pm 0,50$, equivalente a um “ZT” 18,27), plotados no mapa não foram considerados diferentes entre si após o Teste-T bicaudal não pareado, com $p < 0,05$. Assim como em *Per1*, ambas as curvas exibiram seu ponto máximo durante a fase escura.

4.1.1.6 *Rev-erba*

O gene *Rev-erba* realiza o ajuste fino da ritmicidade do relógio, atuando na alça de feedback negativo e impedindo a transcrição do gene *Bmal1*.

Após a análise do perfil diário de RNAm desse gene, viu-se que na glândula pineal há a variação ao longo do período no grupo *in vivo* (Figura 17A). E após a análise pelo Cosinor foi possível comprovar que essa variação também foi circadianamente rítmica ($p < 0,001$), dando origem aos parâmetros de mesor, amplitude e acrofase encontrados na Tabela 7 e na Figura 20.

Como aconteceu em todos os outros genes já analisados, o perfil diário de *Rev-erba* perdeu seu padrão rítmico quando as glândulas foram submetidas à situação *in vitro* (grupos controle e agudo). Essa não variação durante o período foi observada após análise do teste ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p > 0,05$) (Figura 17B e 17C).

E repetindo o comportamento dos outros genes mediante à cultura temporizada, o perfil diário apresenta variação entre os pontos ao longo do dia, como comprovado pela ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p < 0,0001$) (Figura 17D).

Figura 17 – Perfil diário de RNAm do gene *Rev-erba* *in vivo* e *in vitro* (grupos controle, agudo e temporizado).

(A) *In vivo*; (B) *In vitro* – Controle; (C) *In vitro* – estimulação aguda com Nor 1µM; (D) *In Vitro* – estimulação temporizada com Nor 1µM. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e D e $p > 0,05$ em B e C. Dados plotados como média±EPM. Barra preta = período de escuro; Barra listrada = estimulação com Nor 1µM. (n = 3 glândulas em A; n = 4 glândulas por ponto em B, C e D).

Um detalhe importante a ser observado é a relação existente entre o perfil de expressão *in vivo* de *Rev-erba* e *Bmal1*. É possível perceber que no momento de maior expressão de *Bmal1* (transição entre fase escura e clara) houve a menor expressão de *Rev-erba* e vice-versa, nos meios da fase escura e da fase clara houve momentos de maior expressão de *Rev-erba*, e uma baixa expressão de *Bmal1*, exibindo, portanto, perfis de expressão opostos. Esse perfil não pôde ser observado no grupo *in vitro* temporizado, uma vez que tanto em *Bmal1*, quanto em *Rev-erba* houve momentos coincidentes de maior expressão.

Sabendo-se da existência da variação ao longo do período, submeteram-se os valores da curva de expressão desse gene à análise do Cosinor. Após essa análise verificou-se que a expressão de *Rev-erba* no grupo *in vitro* temporizado é rítmica com $p < 0,05$. A partir dessa

verificação originaram-se os parâmetros de mesor, amplitude (Tabela 7) e acrofase (Figura 20).

Tabela 7 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene *Rev-erba* sob as condições *in vivo* e *in vitro* temporizado.

	In Vivo	Temporizado
<i>Mesor</i>	10,80 ± 0,54	12,62 ± 1,26
<i>Amplitude</i>	5,97 ± 0,76	6,37 ± 1,78

Valores comparados entre si através do Teste-T bicaudal não pareado. $p > 0,05$, In Vivo x Temporizado. Média ± EPM.

A partir dos parâmetros obtidos e exibidos na Tabela 7, observou-se que mesor e amplitude não foram modificados após as glândulas serem submetidas à condição *in vitro* temporizado, afinal após a realização do Teste-T bicaudal não pareado obteve-se um $p > 0,05$.

Com relação aos valores de acrofase (Figura 20), viu-se que as acrofases da curva de *Dbp* para os grupos *in vivo* (12,05 ± 0,29) e *in vitro* temporizado (12,00 ± 1,04, equivalente à um “ZT” 0), plotados no mapa foram considerados diferentes entre si após o Teste-T bicaudal não pareado, com $p < 0,05$. E, além disso, o ponto de máxima dos perfis diários de *in vivo* e *in vitro* temporizado encontrou-se em oposição, uma vez que um deles está na fase escura e outro na fase clara. Havendo, entre pontos uma diferença de 12 h, uma exata oposição de fase.

4.1.1.7 *Dbp*

O perfil diário do RNAm desse gene dependente do relógio também foi avaliado como os genes relógio descritos acima. A curva de expressão do *Dbp*, apresentou variação ao longo do período no grupo *in vivo* (Figura 18A). Após a análise pelo Cosinor foi possível comprovar que essa variação também foi circadianamente rítmica ($p < 0,0001$), dando origem aos parâmetros de mesor, amplitude e acrofase demonstrados na Tabela 8 e na Figura 20.

Assim como o observado na expressão dos genes relógio, o presente gene dependente do relógio também perdeu seu padrão rítmico após as glândulas serem colocadas *in vitro* (grupos controle e agudo). Característica demonstrada através da não variação entre os pontos ao longo do período após análise pelo teste ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p > 0,05$) (Figura 18B e 18C, respectivamente).

E se comportando da mesma maneira que os genes relógio, após as glândulas serem submetidas à cultura com temporização adrenérgica foi possível observar a manutenção da

variação circadiana do gene *Dbp* (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni com $p < 0,001$) (Figura 18D).

Figura 18 – Perfil diário de RNAm do gene *Dbp* *in vivo* e *in vitro* (grupos controle, agudo e temporizado).

(A) *In vivo*; (B) *In vitro* – Controle; (C) *In vitro* – estimulação aguda com Nor 1 μ M; (D) *In vitro* – estimulação temporizada com Nor 1 μ M. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e D e $p > 0,05$ em B e C. Dados plotados como média $\pm$ EPM. Barra branca = claro/sem estimulação noradrenérgica; Barra preta = período de escuro; Barra listrada = estimulação com Nor 1 μ M. (n = 3 glândulas em A; n = 4 glândulas por ponto em B, C e D).

Uma vez verificada a presença de variação entre os pontos nos perfis diários nos grupos *in vitro* e temporizado, as curvas foram então submetidas à análise pelo Cosinor. Em ambos os grupos foram verificadas a presença de uma variação rítmica, dando origem aos parâmetros rítmicos mesor, amplitude (mostrados na Tabela 8) e acrofase (Figura 20).

Tabela 8 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene *Dbp* sob as condições *in vivo* e *in vitro* temporizado.

	In Vivo	Temporizado
Mesor	4,91 $\pm$ 0,35	2,11 $\pm$ 0,18*
Amplitude	3,33 $\pm$ 0,50	0,90 $\pm$ 0,26*

Valores comparados entre si através do Teste-T bicaudal não pareado. * $p < 0,05$, In Vivo x Temporizado.

A partir dos parâmetros obtidos e exibidos na Tabela 8, observou-se que mesor e amplitude foram modificados após as glândulas serem submetidas à condição *in vitro* temporizado, afinal após a realização do Teste-T bicaudal não pareado obteve-se um $p < 0,05$.

Com relação aos valores de acrofase (Figura 20), viu-se que as acrofases da curva de *Dbp* para os grupos *in vivo* ($14,01 \pm 0,34$) e *in vitro* temporizado ($18,29 \pm 1,06$, equivalente a um “ZT” 6,29), plotados no mapa foram considerados diferentes entre si após o Teste-T bicaudal não pareado, com $p < 0,05$. E, além disso, os pontos de máxima dos perfis diários de *in vivo* e *in vitro* temporizado se encontraram em oposição, uma vez que um deles está na fase escura e outro na fase clara. Havendo, entre eles uma diferença de 16 h.

4.1.1.8 *Aanat*

A *Aanat* é um gene muito importante para a síntese de melatonina, uma vez que codifica a enzima passo-limitante dessa via bioquímica.

O perfil diário de RNAm desse gene também foi analisado, e notou-se a variação entre os pontos ao longo do período no grupo *in vivo* (Figura 19A). Após ser submetido à análise pelo Cosinor foi possível comprovar que essa variação foi rítmica ($p < 0,0001$), dando origem aos parâmetros de mesor, amplitude e acrofase (Tabela 9 e Figura 20, respectivamente).

Diferentemente dos outros genes, o comportamento da expressão gênica da *Aanat* não se alterou ao ser submetido à condição *in vitro* agudo. De fato, na condição controle as respostas continuam as mesmas com total perda da variação entre os pontos ao longo do período, comprovada pela ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni com $p > 0,05$ para essa condição (Figura 19B). Porém, na condição *in vitro* com estimulação padrão de noradrenalina, se notou um padrão diferente dos outros genes, uma vez que nesse caso pôde-se notar a variação entre os pontos ao longo do período, verificado pela ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p < 0,05$) (Figura 19C), havendo portanto a manutenção da variação circadiana da *Aanat*.

Na situação *in vitro* temporizado, a resposta se assemelha com o ocorrido em outros genes, e com o próprio grupo agudo para esse gene: há a manutenção da variação entre os pontos ao longo do período (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,0001$) (Figura 19D).

Figura 19 – Perfil diário de RNAm do gene *Aanat* *in vivo* e *in vitro* (grupos controle, agudo e temporizado).

(A) *In vivo*; (B) *In vitro* – Controle; (C) *In vitro* – estimulação aguda com Nor 1μM; (D) *In Vitro* – estimulação temporizada com Nor 1μM. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A, B e D e $p > 0,05$ em B. Dados plotados como média±EPM. Barra branca = claro/sem estimulação noradrenérgica; Barra preta = período de escuro; Barra listrada = estimulação com Nor 1μM. (n = 3 glândulas em A; n = 4 glândulas por ponto em B, C e D).

Uma vez que foi verificada a presença de variação entre os pontos nos perfis diários nos grupos *in vitro* agudo e temporizado, as curvas foram então submetidas à análise pelo Cosinor. Em ambos os grupos foram verificados a presença de uma variação rítmica, dando origem aos parâmetros rítmicos mesor, amplitude (mostrados na Tabela 9) e acrofase (Figura 20).

Tabela 9 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene *Aanat* sob as condições *in vivo* e *in vitro* temporizado.

	In Vivo	Agudo	Temporizado
Mesor	495,86 ± 171,06	118,36 ± 33,77	112,15 ± 17,52*
Amplitude	828,37 ± 241,91	177,10 ± 47,76*	148,97 ± 24,78*

Valores comparados entre si através do Teste-T bicaudal não pareado. * $p < 0,05$, In Vivo vs Agudo e In Vivo VS Temporizado. $p > 0,05$ Agudo vs temporizado.

A partir dos parâmetros obtidos e exibidos na Tabela 9, observou-se que de uma maneira geral os parâmetros foram modificados quando a glândula foi colocada nas situações *in vitro* agudo e temporizado. Porém, o mesor do grupo *in vitro* agudo comparado com o grupo *in vivo*, não apresentou diferença estatística, após o Teste-T bicaudal não pareado ($p > 0,05$).

Outra característica importante a ser observada com relação à Tabela 9, é que não houve diferença estatística entre os parâmetros analisados (mesor e amplitude) dos grupos *in vitro* agudo e temporizado, como demonstrado através da análise Teste-T bicaudal não pareado com $p > 0,05$.

Referente às acrofases (Figura 20), viu-se que as da curva de *Aanat* para os grupos *in vivo* ($20,39 \pm 1,07$), *in vitro* agudo ($5,43 \pm 1,02$, equivalente a um “ZT” 17,43) e *in vitro* temporizado ($6,41 \pm 0,38$, equivalente a um “ZT” 18,41), plotados no mapa não foram considerados diferentes entre si após o Teste-T bicaudal não pareado, com $p > 0,05$. Todos os pontos máximos ocorreram na fase escura.

Como não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos *in vitro* agudo e temporizado, pode-se concluir que *in vitro* a presença de noradrenalina é essencial para as alterações vistas no perfil de expressão da *Aanat*, seja o tratamento com noradrenalina agudo ou temporizado.

Figura 20 – Mapa das fases observadas nos grupos *in vivo* e temporizado.

As acrofases foram aqui plotadas no chamado mapa de fases para efeito de comparação entre os grupos *in vivo* e *in vitro* temporizado. Apenas os genes *Cry1*, *Cry2*, *Dbp* e *Rev-erba* exibiram diferenças estatísticas após o Teste T bicaudal não pareado, $*p < 0,05$ In Vivo x Temporizado. Todos os outros genes e testes apresentaram $p > 0,05$. Média±EPM.

4.1.2 Atividade enzimática da AANAT

Levando em consideração que a AANAT é a enzima passo limitante para a síntese de melatonina, essa proteína se torna um alvo bastante interessante para o estudo. Como sua expressão já foi vista na última sessão, torna-se importante avaliar a atividade dessa enzima.

De acordo com a análise enzimática da AANAT, estimulação aguda da cultura com noradrenalina já foi capaz de promover mudança no perfil de atividade quando comparado com o grupo controle. Foi encontrada variação entre os pontos ao longo do período como comprovado pelo teste ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p < 0,05$) para os grupos agudo e temporizado. O protocolo de temporização foi capaz de aumentar a atividade enzimática quando comparada com o grupo agudo (Figura 21), diferentemente do que ocorreu com a expressão do RNAm do gene, no qual ambos não apresentaram diferenças significativas entre si. Foram observadas duas diferenças pontuais nos pontos 9 e 12 h após o estímulo noradrenérgico, havendo uma maior atividade nesses dois pontos no grupo temporizado, diferença essa determinada estatisticamente pela ANOVA de duas vias, com $p < 0,05$ para os dois pontos supracitados. Nenhuma variação foi observada no grupo controle.

Figura 21 – Atividade enzimática *in vitro* da AANAT.

Os valores foram expressos como pmols/glândula/h, plotado como média $\pm$ EPM. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni com pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ para os grupos Agudo e Temporizado, com exceção do grupo Controle. ANOVA de duas vias com pós-teste Bonferroni com $p = 0,001$, p para interação tratamento $\times$ horas após Nor, $p < 0,0001$ para o fator tratamento e $p < 0,0001$ para o fator tempo, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ 9 e 12 h do grupo agudo vs temporizado, respectivamente. $N = 6$ glândulas por ponto de coleta para cada grupo. Barra listrada = presença de Nor. Barra branca = ausência de Nor.

4.1.3 Quantificação do conteúdo de melatonina por UHPLC

Para validar o protocolo de estimulação utilizado nesse trabalho, ao longo de 24 h o conteúdo de melatonina presente no meio de cultura, onde estava a glândula pineal foi analisada por UHPLC. De acordo com essa análise, pode-se notar que houve uma sensibilização da glândula à noradrenalina, uma vez que o aumento de síntese foi observado já nas primeiras horas após o estímulo noradrenérgico (Figura 22A), antes do aumento visto no grupo agudo. O tratamento agudo mostrou a clássica regulação da síntese de melatonina dependente de noradrenalina, porém de maneira menos sensível que o grupo temporizado. Esse aumento de sensibilidade pode ser notado pelo avanço de fase da síntese de melatonina, que pode ser notado pelos pontos 3, 6 e 9 h. Ao fim do período de estimulação pela noradrenalina, o conteúdo de melatonina tanto do grupo temporizado como do grupo agudo voltou aos valores basais permanecendo nesta condição até o fim das coletas. Essa facilitação à produção de melatonina promovida pela temporização foi capaz de promover o aumento na síntese de melatonina nessas glândulas, como pode ser visto pela análise da área sobre a curva (Figura 22B).

Figura 22 – Síntese de melatonina *in vitro* sob as condições agudo e temporizado.

(A) A quantidade de melatonina é expressa como ng/200 µL de meio, plotado como média±EPM. Foi utilizada análise ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, com pós-teste Bonferroni, e $p < 0,05$ para todos os grupos. A ANOVA de duas vias com pós-teste Bonferroni, também foi utilizada, com $*p < 0,05$ vs 3, 6 e 9 h após Nor comparado com o grupo Agudo. N = 6 glândulas por ponto de coleta por grupo. Barra listrada = presença de Nor; Barra branca = ausência de Nor. (B) Área sobre a curva obtida a partir do gráfico de síntese de melatonina. Foi utilizado teste T-Student's de uma cauda, $*p < 0,05$ vs Agudo.

Outro ponto interessante a ser observado, foi o perfil do conteúdo de melatonina do grupo temporizado onde há um pico 6 horas após a noradrenalina ser adicionada ao meio,

seguido por uma pequena queda nos valores, permanecendo ainda em valores altos até o ponto 12, oferecendo ao pico do perfil um aspecto mais largo (maior tempo de duração) e um pico secundário com valor menor (Figura 21A).

4.2 Experimento piloto para determinação da melhor concentração dos bloqueadores noradrenérgicos

Para a determinação da melhor concentração a ser utilizada de bloqueador noradrenérgico na cultura, realizou-se um experimento piloto como já descrito anteriormente em materiais e métodos.

Foram utilizadas quatro concentrações diferentes, sendo elas: 10^{-10} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M e 10^{-5} M.

Após as 48 horas de cultura, o bloqueador noradrenérgico foi adicionado e apenas 30 min depois a noradrenalina foi adicionada à cultura. Os meios foram então coletados e o conteúdo de melatonina foi dosado por UHPLC.

4.2.1 Prasozin

A concentração de prasozin com maior capacidade de bloqueio foi a de 10^{-5} M, como mostrado na Figura 23. Apenas a concentração 10^{-5} M obteve diferença estatística após a análise por ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p < 0,05$) quando comparada com o grupo no qual apenas houve a adição de noradrenalina (1μ M).

Figura 23 – Determinação da concentração ideal para Prasozin.

Após 48h de cultura padrão, as glândulas foram separadas em três grupos: (Nor) incubação com Nor 1 μ M; (Pra 10^{-10} M) incubação com prasozin na concentração de 10^{-10} M; (Pra 10^{-8} M) incubação com prasozin na concentração de 10^{-8} ; (Pra 10^{-7} M) incubação com prasozin na concentração de 10^{-7} ; (Pra 10^{-5} M) incubação com prasozin na concentração de 10^{-5} M. Apenas após 30 min a noradrenalina (1 μ M) foi adicionada nesses grupos. As glândulas ficaram sob tratamento por 5 horas. Após esse período o meio foi coletado e dosado em UHPLC. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, com pós-teste Bonferroni, * $p < 0,05$ vs Nor.

Com relação ao grupo Nor, a concentração de 10^{-5} de prasozin causou uma diminuição de 37% no conteúdo de melatonina.

4.2.2 Propranolol

A concentração de propranolol com maior capacidade de bloqueio também foi a de 10^{-5} M, como mostrado na Figura 24. Apenas a concentração 10^{-5} M obteve diferença estatística após a análise por ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p < 0,05$) quando comparada com o grupo noradrenalina.

Figura 24 – Determinação da concentração ideal para Propranolol.

Após 48h de cultura padrão, as glândulas foram separadas em três grupos: (Nor) incubação com Nor 1 μ M; (Pro 10^{-10} M) incubação com propranolol na concentração de 10^{-10} M; (Pro 10^{-8} M) incubação com propranolol na concentração de 10^{-8} ; (Pro 10^{-7} M) incubação com propranolol na concentração de 10^{-7} ; (Pro 10^{-5} M) incubação com propranolol na concentração de 10^{-5} M. Apenas após 30 min a noradrenalina (1 μ M) foi adicionada nesses grupos. As glândulas ficaram sob tratamento por 5 horas. Após esse período o meio foi coletado e dosado em UHPLC. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, com pós-teste Bonferroni, * $p < 0,05$ vs Nor.

Com relação ao grupo Nor, a concentração de 10^{-5} de propranolol causou uma diminuição de 56% no conteúdo total de melatonina.

Os valores atingidos com a concentração 10^{-5} M para ambas as drogas foram diferentes entre si segundo o Teste-T bicaudal não pareado ($p < 0,05$), portanto, o propranolol provoca um maior bloqueio à noradrenalina, culminando em um menor conteúdo de melatonina.

4.3 Experimentos *In Vitro*: associação entre o grupo temporizado e a utilização de bloqueadores noradrenérgicos

4.3.1 Análise do perfil diário de RNAm dos genes relógio, gene dependente do relógio e do gene *Aanat*

Assim como na seção anterior, os genes analisados após todo o processamento das amostras e conseqüente análise pelo qPCR foram:

- a) os genes relógio: *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, *Per2* e *Rev-erba*.
- b) os genes dependentes do relógio: *Dbp*.
- c) o gene envolvido na síntese de melatonina: *Aanat*.

4.3.1.1 *Bmal1*

Como já visto anteriormente, a temporização da noradrenalina foi fundamental para a manutenção do ritmo dos genes analisados. Para responder qual a principal via que media esse efeito, realizou-se cultura temporizada com a adição de bloqueadores noradrenérgicos. Sendo eles o prazosin (bloqueador específico do receptor α_1), propranolol (bloqueador inespecífico de receptor β adrenérgico) e a combinação dessas duas drogas.

O perfil diário da expressão de RNAm do gene *Bmal1* pode ser visto na Figura 25. De acordo com a figura, é possível notar que o tratamento temporizado de fato promoveu a manutenção da variação diária ao longo do período como já pôde ser visto, e mostrado novamente nessa seção (Figura 25A). A variação entre os pontos foi verificada após a realização do teste ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,0001$. Após ser submetido à análise pelo Cosinor foi possível comprovar que essa variação foi rítmica ($p < 0,01$), dando origem aos parâmetros de mesor, amplitude e acrofase demonstrados na Tabela 10.

Uma vez que a cultura temporizada sofreu adição do bloqueador α_1 prazosin, foi possível verificar uma alteração no perfil de expressão do gene, porém a variação entre os pontos ao longo do período permaneceu como observado após a análise pela ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p < 0,05$) (Figura 25B). Verificada a existência dessa variação diária, a curva de expressão foi submetida ao Cosinor, confirmando a presença da ritmicidade circadiana ($p < 0,001$), gerando os parâmetros observados na Tabela 10 e na Figura 33.

Figura 25 – Perfil diário de RNAm do gene *Bmal1* *in vitro* temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.

(A) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M; (B) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin 10 μ M; (C) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de propranolol 10 μ M; (D) *In Vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin e propranolol, ambos com 10 μ M. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e B e $p > 0,05$ em C e D. Dados plotados como média $\pm$ EPM. Barra branca = sem estimulação noradrenérgica; Barra listrada = estimulação com Nor 1 μ M. (n = 4 glândulas).

Tabela 10 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene *Bmal1* sob as condições temporizado e temporizado com adição de Prazosin.

	Temporizado	Prazosin
<i>Mesor</i>	$3,47 \pm 0,28$	$3,19 \pm 0,15$
<i>Amplitude</i>	$2,13 \pm 0,40$	$0,83 \pm 0,22^*$

Valores comparados entre si através do Teste-T bicaudal não pareado. * $p < 0,05$, Prazosin vs Temporizado. Média $\pm$ EPM.

De acordo com os dados encontrados na Tabela 10, pôde-se notar que a droga prazosin não alterou o mesor, porém foi capaz de influenciar na amplitude, reduzindo-a significativamente (Teste-T bicaudal não pareado, com $p < 0,05$).

As acrofases correspondentes ao *Bmal1* podem ser vistas no mapa de fases da Figura 33. A adição de prazosin na cultura temporizada não promoveu uma alteração no momento de

ponto máximo dos perfis diários de expressão do *Bmal1*, sendo $10,09 \pm 0,43$ para o grupo temporizado e $12,20 \pm 1,00$ para o grupo prazosin (Teste-T bicaudal não pareado, $p > 0,05$).

Ao se adicionar propranolol na cultura temporizada notou-se a total perda de variação ao longo do dia (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, com $p > 0,05$) (Figura 25C). O mesmo padrão de resposta pôde ser observado no grupo *in vitro* temporizado com adição combinada de prazosin e propranolol, no qual se nota a ausência de variação entre os pontos da curva (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p > 0,05$) (Figura 25D). Os perfis de expressão desses dois grupos foram semelhante ao observado no grupo *in vitro* controle (Figura 12B), o qual não havia estímulo noradrenérgico, e consequentemente exibiu ausência de variação entre os pontos ao longo do período.

4.3.1.2 *Cry1*

A manutenção da ritmicidade circadiana do gene *Cry1* promovida pela temporização com noradrenalina da cultura, também se repetiu nesse segundo *set* de experimentos (Figura 26A). Afinal pôde ser notada a variação dos pontos ao longo do período (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p < 0,0001$) com a existência de ritmo circadiano (Cosinor com $p = 0,001$). A partir dessa curva rítmica foi possível determinar os pontos de mesor, amplitude (Tabela 11) e acrofase (Figura 33).

Após a adição de prazosin na cultura, foi possível verificar que o perfil de expressão do gene sofreu alterações. Mesmo com essas alterações, a variação entre os pontos ao longo do período ainda permaneceu, como comprovado através da ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p < 0,01$) (Figura 26B). Após ser submetida ao Cosinor, que confirmou a presença da ritmicidade circadiana da curva ($p < 0,001$), obtiveram-se os parâmetros observados na Tabela 11 e na Figura 33.

Da mesma forma que ocorreu com o gene *Bmal1*, ao se adicionar propranolol na cultura temporizada notou-se a total perda de variação ao longo do dia do gene *Cry1* (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, com $p > 0,05$) (Figura 26C). O mesmo padrão de resposta pôde ser observado no grupo *in vitro* temporizado com adição combinada de prazosin e propranolol, no qual se nota a ausência da variação entre os pontos da curva (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p > 0,05$) (Figura 26D). Os padrões dos perfis desses dois grupos foram semelhante ao observado no grupo *in vitro* controle (Figura 13B), o qual não havia nenhum estímulo noradrenérgico, e consequentemente ausência de variação entre os pontos ao longo do período.

Figura 26 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry1* *in vitro* temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.

(A) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M; (B) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin 10 μ M; (C) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de propranolol 10 μ M; (D) *In Vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin e propranolol, ambos com 10 μ M. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e B e $p > 0,05$ em C e D. Dados plotados como média $\pm$ EPM. Barra branca = sem estimulação noradrenérgica; Barra listrada = estimulação com Nor 1 μ M. (n = 4 glândulas).

Tabela 11 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene *Cry1* sob as condições temporizado e temporizado com adição de Prazosin.

	Temporizado	Prazosin
<i>Mesor</i>	$0,86 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,03^*$
<i>Amplitude</i>	$0,34 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,04^*$

Valores comparados entre si através do Teste-T bicaudal não pareado. * $p < 0,05$, Prazosin vs Temporizado. Média $\pm$ EPM.

De acordo com a Tabela 11, o prazosin foi capaz de alterar os valores de mesor e amplitude, diminuindo ambos os valores (Teste-T bicaudal não pareado, com $p < 0,05$).

As acrofases correspondentes ao *Cry1* podem ser vistas no mapa de fases da Figura 33. E como demonstrado, a adição de prazosin na cultura temporizada foi capaz também de alterar o ponto de máximo da curva. Através do Teste-T bicaudal não pareado, viu-se que o valor de acrofase do grupo temporizado ($9,40 \pm 0,26$) e no grupo com adição de prazosin

($6,21 \pm 0,56$) foi diferente entre si ($p < 0,05$), havendo, portanto, um atraso de fase de aproximadamente 3 h no grupo temporizado com adição de prazosin.

4.3.1.3 *Cry2*

Como já mencionado, a temporização da cultura garante a manutenção da ritimicidade circadiana do perfil diário de RNAm (Figuras 14A e 27A), determinando assim os pontos de mesor, amplitude (Tabela 12) e acrofase (Figura 33) do grupo temporizado.

Após a adição de prazosin na cultura, verificou-se a não existência de variação entre os pontos ao longo do período como comprovado através da ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, com $p > 0,05$ (Figura 27B). O perfil diário de RNAm também se mostrou alterado com a adição de propranolol e das duas drogas combinadas, com a inexistência de diferenças entre os pontos ao longo da curva (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni com $p > 0,05$ para ambas as curvas) (Figura 27C e D, respectivamente).

Figura 27 – Perfil diário de RNAm do gene *Cry2* *in vitro* temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.

(A) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M; (B) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin 10 μ M; (C) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de propranolol 10 μ M; (D) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin e propranolol 10 μ M. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e B e $p > 0,05$ em C e D. Dados plotados como média $\pm$ EPM. Barra branca = sem estimulação noradrenérgica; Barra listrada = estimulação com Nor 1 μ M. (n = 4 glândulas).

Uma vez que nenhum dos grupos temporizados com adição de bloqueadores noradrenérgicos apresentou diferenças entre os pontos ao longo do período, os perfis diários dos mesmos não foram submetidos à análise do Cosinor. Os parâmetros observados no grupo temporizado podem ser visualizados na Tabela 12.

Tabela 12 – Análise pelo Cosinor da curva de expressão de RNAm do gene *Cry2* sob a condição temporizado.

	Temporizado
<i>Mesor</i>	$0,86 \pm 0,03$
<i>Amplitude</i>	$0,34 \pm 0,04$

Valores de mesor e amplitude do perfil de RNAm do gene *Cry2*. Média $\pm$ EPM.

De acordo com o observado na Tabela 12, verificou-se que os parâmetros encontrados nesse experimento são semelhantes ao já encontrado e demonstrado previamente na Tabela 4.

Da mesma maneira que esses parâmetros, a acrofase vista na Figura 33 ($8,00 \pm 0,46$) foi semelhante ao já visto na Figura 14 ($8,29 \pm 1,02$).

4.3.1.4 *Per1*

Na Figura 28A, a manutenção da ritmicidade pela temproização da cultura é mais uma vez demonstrada com a repetição da análise do gene *Per1* do grupo temporizado. A partir desse perfil pôde-se verificar que há variação dos pontos ao longo do período (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p < 0,0001$) com a existência de ritmo circadiano (Cosinor com $p = 0,043$). A partir dessa curva rítmica determinou-se os pontos de mesor, amplitude (Tabela 13) e acrofase (Figura 33) do grupo temporizado.

Com a adição de prazosin na cultura, mais uma vez houve alteração do perfil de expressão de RNAm (Figura 28B). Nessa condição de tratamento, houve a variação entre os pontos ao longo do período (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni com $p = 0,0001$), permitindo que a curva fosse submetida à análise do Cosinor. Porém, após essa análise verificou-se a ausência de ritmicidade circadiana ($p > 0,05$). Apesar dessa não ritmicidade gerada pela adição do bloqueador de receptor alfa adrenérgico, se faz interessante notar que no grupo temporizado o pico de expressão de *Per1* é composto por dois picos secundários, enquanto que ao se incubar a glândula com prazosin o segundo pico foi eliminado da curva.

A alteração promovida pela adição de propranolol à cultura temporizada foi mais intensa do que a causada pelo prazosin, assim como visto, nos outros genes analisados. Após análise através da ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, viu-se que não houve diferença entre os pontos ao longo do período de perfil diário de expressão de RNAm de *Per1* ($p > 0,05$) (28C). O mesmo pôde ser observado para o grupo que sofreu tratamento com a combinação dos dois tipos de bloqueadores (28D).

Figura 28 – Perfil diário de RNAm do gene *Per1* *in vitro* temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.

(A) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M; (B) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin 10 μ M; (C) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de propranolol 10 μ M; (D) *In Vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin e propranolol, ambos com 10 μ M. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e B e $p > 0,05$ em C e D. Dados plotados como média $\pm$ EPM. Barra branca = sem estimulação noradrenérgica; Barra listrada = estimulação com Nor 1 μ M. (n = 4 glândulas).

Assim como o ocorrido na última subseção com o gene *Cry2*, os grupos que não apresentaram variação ao longo do dia não foram submetidos à análise do Cosinor, afinal não demonstraram ritmicidade. Já o grupo temporizado, apresentou ritmicidade e seus parâmetros podem ser observados na Tabela 13.

Tabela 13 – Análise pelo Cosinor da curva de expressão de RNAm do gene *Per1* sob a condição temporizado.

	Temporizado
<i>Mesor</i>	$1,48 \pm 0,19$
<i>Amplitude</i>	$0,95 \pm 0,27$

Valores de mesor e amplitude do perfil de RNAm do gene *Per1*. Média $\pm$ EPM.

Mais uma vez, os valores observados na Tabela 13 foram semelhantes aos valores encontrados na Tabela 5.

Os valores de acrofase de *Per1* também exibiram valores semelhantes entre si. A acrofase vista na Figura 33 ($6,36 \pm 1,04$) foi semelhante à já vista na Figura 20 ($7,11 \pm 1,01$).

4.3.1.5 *Per2*

Como nos genes anteriormente descritos, o perfil diário de RNAm de *Per2* mediante a temporização da cultura teve sua ritmicidade mantida. Na Figura 29A, a manutenção da ritmicidade pela temporização da cultura é mais uma vez demonstrada com a repetição da análise do gene *Per2* do grupo temporizado. A partir desse perfil pôde-se verificar que houve variação dos pontos ao longo do período (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p < 0,01$) com a existência de ritmo circadiano (Cosinor com $p < 0,05$). A partir dessa curva rítmica originaram-se os pontos de mesor, amplitude (Tabela 14) e acrofase (Figura 33) do grupo temporizado.

Ao se adicionar prazosin à cultura temporizada, alterações no perfil de expressão de RNAm ocorreram (Figura 29B). Nessa condição de tratamento não houve a variação entre os pontos ao longo do período (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p > 0,05$). Não sendo necessário, portanto, a análise pelo método Cosinor.

Assim como ocorrido em *Per1*, a alteração promovida em *Per2* pela adição de propranolol à cultura temporizada foi mais intensa do que a causada pelo prazosin. Após análise através da ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, viu-se que não houve diferença entre os pontos ao longo do período de perfil diário de expressão de RNAm de *Per1* ($p > 0,05$) (Figura 29C).

Quando adicionou-se as duas drogas à cultura temporizada, o mesmo comportamento foi visto, com a ausência de variação entre os pontos da curva (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p > 0,05$) (Figura 29D).

Figura 29 – Perfil diário de RNAm do gene *Per2* *in vitro* temporizado e temporizado com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.

(A) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M; (B) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin 10 μ M; (C) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de propranolol 10 μ M; (D) *In Vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin e propranolol, ambos com 10 μ M. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e B e $p > 0,05$ em C e D. Dados plotados como média $\pm$ EPM. Barra branca = sem estimulação noradrenérgica; Barra listrada = estimulação com Nor 1 μ M. (n = 4 glândulas).

Uma vez que apenas o grupo temporizado apresentou diferença estatística entre os pontos ao longo do período e que também mostrou ritmicidade circadiana pelo Cosinor, apenas para esse grupo foi possível a determinação de parâmetros rítmicos como mesor, amplitude (Tabela 14) e acrofase (Figura 33).

Tabela 14 – Análise pelo Cosinor da curva de expressão de RNAm do gene *Per2* sob a condição temporizado.

	Temporizado
Mesor	0,30 $\pm$ 0,02
Amplitude	0,10 $\pm$ 0,02

Valores de mesor e amplitude do perfil de RNAm do gene *Per2*. Média $\pm$ EPM.

Os valores de mesor e amplitude vistos na Tabela 14 para a curva de expressão de *Per2*, foram semelhantes à aqueles vistos na Tabela 6. Da mesma forma os valores de acrofase de *Per2* exibiram valores semelhantes entre si. A acrofase vista na Figura 33 ($5,50 \pm 0,52$) foi semelhante à já vista na Figura 20 ($6,17 \pm 0,50$).

4.3.1.6 *Rev-erba*

O perfil diário de RNAm de *Rev-erba* mediante a temporização da cultura teve sua ritmicidade mantida. A manutenção da ritmicidade pela temporização da cultura é mais uma vez demonstrada com a repetição observada na Figura 31A. Mais uma vez a curva apresentou diferenças entre os pontos ao longo do período (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p < 0,0001$) com a existência de ritmo circadiano (Cosinor com $p < 0,05$). Os parâmetros mesor, amplitude (Tabela 15) e acrofase (Figura 33) foram determinados à partir dessa curva rítmica através do Cosinor.

Uma vez adicionado prazosin à cultura temporizada, alterações no perfil de expressão de RNAm ocorreram (Figura 30B). Nessa condição de tratamento houve variação entre os pontos ao longo da curva (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p > 0,05$). Mesmo com uma tendência à ritmicidade observada pela Figura 31B, não houve ritmicidade circadiana determinada pelo Cosinor ($p > 0,05$). Através da figura pôde-se notar uma redução do valor do ponto máximo atingido pela curva, o que seria uma redução em sua amplitude caso a curva fosse rítmica.

No grupo temporizado em que houve adição de propranolol, notou-se a não variação entre os pontos ao longo da curva, como observado em todos os genes até o momento para essa condição (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p > 0,05$). Se não houve variação, consequentemente não houve ritmicidade (Figura 30C).

O mesmo perfil foi encontrado quando a cultura temporizada sofreu tratamento com a combinação dos dois bloqueadores noradrenérgicos, a não variação entre os pontos diagnosticada pela ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p > 0,05$) (Figura 30D).

Figura 30 – Perfil diário de RNAm do gene *Rev-erba* *in vitro* temporizado e com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.

(A) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M; (B) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin 10 μ M; (C) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de propranolol 10 μ M; (D) *In Vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin e propranolol, ambos com 10 μ M. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e B e $p > 0,05$ em C e D. Dados plotados como média $\pm$ EPM. Barra branca = sem estimulação noradrenérgica; Barra listrada = estimulação com Nor 1 μ M. ($n = 4$ glândulas).

Uma vez que apenas o grupo temporizado apresentou diferença estatística entre os pontos ao longo do período e que também mostrou ritmicidade circadiana pelo Cosinor, apenas para esse grupo foi possível a determinação de parâmetros rítmicos como mesor, amplitude (Tabela 15).

Tabela 15 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene *Rev-erba* sob a condição temporizado.

	Temporizado
Mesor	$14,49 \pm 1,04$
Amplitude	$5,57 \pm 1,46$

Valores de mesor e amplitude do perfil de RNAm do gene *Rev-erba*. Média $\pm$ EPM.

Os valores de mesor e amplitude vistos na Tabela 15 para a curva de *Rev-erba*, foram semelhantes àqueles vistos na Tabela 7. Da mesma forma seus valores de acrofase exibiram valores semelhantes entre si. A acrofase vista na Figura 33 ($11,53 \pm 1,00$) foi semelhante à já vista na Figura 20 ($12,00 \pm 1,04$).

4.3.1.7 *Dbp*

Na última seção, foi possível notar que para o gene *Dbp* (assim como para os outros) a temporização foi capaz de manter a ritmicidade circadiana do gene *Dbp* (Figura 18D). Após a repetição dessa condição foi possível confirmar essa resposta como visto na Figura 31A. Houve variação entre os pontos dessa curva ao longo do período, como demonstrado pela ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p < 0,001$). Além de apresentar variação ao longo do período, foi também constada a ritmicidade da curva através do método Cosinor ($p < 0,05$). Os parâmetros rítmicos (mesor, amplitude e acrofase) puderam ser obtidos a partir dessa curva e observados na Tabela 16 (mesor e amplitude) e Figura 33 (acrofase).

No grupo em que houve a adição de prazosin, o perfil de expressão de RNAm sofreu alterações (Figura 31B). Nesse caso não foi possível observar a variação entre os pontos (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p > 0,05$). É interessante notar que na fase escura do grupo temporizado pôde-se notar a ausência de qualquer aumento de expressão, aumento esse notado apenas na fase clara. Quando o prazosin foi adicionado à cultura, foi possível notar pequenos picos onde em outra condição nada havia.

Quando o bloqueador beta adrenérgico (propranolol) foi adicionado, foi possível observar uma ação mais intensa que a do prazosin, com um maior achatamento da curva. Sendo assim, não foi possível notar variação entre os pontos ao longo da curva, como observado em todos os genes até o momento para essa condição (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p > 0,05$) (Figura 31C).

Da mesma forma que o ocorrido em propranolol, pôde-se observar quando as duas drogas foram adicionadas conjuntamente à cultura temporizada. Nesse caso, não houve variação entre os pontos segundo a análise ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni ($p > 0,05$) (Figura 31D).

Figura 31 – Perfil diário de RNAm do gene *Dbp* *in vitro* temporizado e com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.

In vitro temporizado com Nor 1 μ M; (B) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin 10 μ M; (C) *In vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de propranolol 10 μ M; (D) *In Vitro* temporizado com Nor 1 μ M e adição de prazosin e propranolol, ambos com 10 μ M. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida, com $p < 0,05$ em A e B e $p > 0,05$ em C e D. Dados plotados como média $\pm$ EPM. Barra branca = sem estimulação noradrenérgica; Barra listrada = estimulação com Nor 1 μ M. (n = 4 glândulas).

Tabela 16 – Análise pelo Cosinor da curva de expressão de RNAm do gene *Dbp* sob a condição temporizado.

	Temporizado
Mesor	1,82 $\pm$ 0,15
Amplitude	0,77 $\pm$ 0,21

Valores de mesor e amplitude do perfil de RNAm do gene *Dbp*. Média $\pm$ EPM.

Uma vez que apenas o grupo temporizado apresentou diferença estatística entre os pontos ao longo do período e que também mostrou ritmicidade circadiana pelo Cosinor, apenas para esse grupo foi possível a determinação de parâmetros rítmicos como mesor, amplitude (Tabela 16) e acrofase (Figura 33).

Assim como observado nos outros genes até aqui analisados, esses parâmetros observados na Tabela 16 foram semelhantes aos observados na Tabela 8. O outro parâmetro, a acrofase também apresentou semelhanças entre a Figura 20 e a Figura 33 ($18,29 \pm 1,06$ e $17,56 \pm 1,04$, respectivamente).

4.3.1.8 *Aanat*

Na Figura 32A foi possível observar a confirmação da manutenção da ritmicidade circadiana provocada pela temporização adrenérgica da cultura. A curva apresenta variação ao longo dos pontos (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p < 0,0001$) e também apresenta ritmo (Cosinor, $p < 0,05$). Os parâmetros rítmicos determinados pelo Cosinor, podem ser observados na Tabela 17 (mesor e amplitude) e na Figura 33 (acrofase).

A adição de prazosin à cultura temporizada, fez com que o perfil de expressão de RNAm da *Aanat* se alterasse, como visto na Figura 32B. Apesar da alteração provocada, essa droga não foi capaz de abolir a variação ao longo do período, de forma que a análise ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni teve $p < 0,0001$, permitindo, portanto, a análise pelo Cosinor que foi positiva quanto à presença de ritmicidade circadiana ($p < 0,05$). Dessa forma foram determinados os parâmetros rítmicos encontrados na Tabela 17 (mesor e amplitude) e Figura 33 (acrofase).

Após o tratamento com propranolol na cultura temporizada, o perfil diário de expressão da *Aanat* mudou completamente, perdendo toda e qualquer variação entre os pontos ao longo do período (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p > 0,05$) (Figura 32C).

E assim como o ocorrido em outros genes, a combinação das duas drogas na cultura temporizada gerou um perfil muito semelhante ao do grupo tratado apenas com propranolol, a não variação entre os pontos ao longo do período reaparece nesse grupo (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p > 0,05$) (Figura 32D).

Uma diferença visível entre esses dois últimos perfis foi a redução dos valores de expressão no grupo com as drogas combinadas, quando comparado com o grupo com adição apenas de propranolol. Além disso, também se faz importante ressaltar a diferença de escalas entre o grupo tratado com prazosin e o tratado com propranolol (ou inclusive com as drogas combinadas). O propranolol além de alterar a aparência do perfil de expressão (com a abolição de qualquer variação entre os pontos), foi também capaz de reduzir drasticamente os níveis de expressão da *Aanat*.

Uma vez que não houve variação entre os pontos após a análise da ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, as curvas não foram submetidas à análise pelo Cosinor.

Figura 32 – Perfil diário de RNAm do gene *Aanat* *in vitro* temporizado e com a adição de bloqueadores noradrenérgicos.

(A) *In vitro* temporizado com Nor 1 μM; (B) *In vitro* temporizado com Nor 1 μM e adição de prazosin 10 μM; (C) *In vitro* temporizado com Nor 1 μM e adição de propranolol 10 μM; (D) *In Vitro* temporizado com Nor 1 μM e adição de prazosin e propranolol, ambos com 10 μM. Expressões normalizadas pela média dos genes constitutivos *Rpl37a* e *B-actina*, apresentadas como número de transcrito. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni seguida por pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ em A e B e $p > 0,05$ em C e D. Dados plotados como média±EPM. Barra branca = sem estimulação noradrenérgica; Barra listrada = estimulação com Nor 1 μM. (n = 4 glândulas).

A tabela com o mesor e a amplitudes das curvas que puderam ser avaliadas pelo Cosinor encontra-se abaixo:

Tabela 17 – Análise pelo Cosinor das curvas de expressão de RNAm do gene *Aanat* sob as condições temporizado e temporizado com adição de Prazosin.

	Temporizado	Prazosin
Mesor	85,59 ± 13,31	37,78 ± 8,76*
Amplitude	115,27 ± 18,82	55,08 ± 12,38*

Valores comparados entre si através do Teste-T bicaudal não pareado. * $p < 0,05$, Prazosin vs Temporizado. Média ± EPM.

De acordo com a Tabela 17, pôde-se notar que o tratamento com prazosin não apenas altera a aparência do perfil de expressão, mas altera significativamente os parâmetros mesor e amplitude da curva, reduzindo-os (Teste-T bicaudal não pareado, $p < 0,05$).

Com relação à acrofase não houve diferença significativa (ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni, $p > 0,05$) entre os dois grupos (Figura 33).

Figura 33 – Mapa das fases observadas nos grupos: temporizado e temporizado com bloqueadores noradrenérgicos.

As acrofases foram aqui plotadas no chamado mapa de fases para efeito de comparação entre os grupos *in vitro* temporizado e *in vitro* temporizado com prazosin. Em *Cry2*, *Dbp*, *Per1*, *Per2* e *Rev-erba* não são aqui representados para o grupo Prazosin uma vez que nesses genes não foi encontrada ritmicidade circadiana pelo Cosinor. Apenas os genes *Cry1* exibiu diferença estatística após o Teste T bicaudal não pareado, * $p < 0,05$ Prazosin vs Temporizado. Os outros genes apresentaram $p > 0,05$. Média±EPM.

4.3.2 Atividade enzimática da AANAT

A fim de se verificar a validade do protocolo e a do funcionamento dos bloqueadores noradrenérgicos, analisou-se a atividade da AANAT.

Assim como visto anteriormente, o grupo temporizado apresentou uma clara variação circadiana (ANOVA de uma via não pareada com $p < 0,0001$) (Figura 34), com um perfil semelhante ao já visto na Figura 21.

A partir do momento em que se passou a tratar as glândulas em cultura com prazosin 30 min antes da adição de noradrenalina de forma temporizada, foi possível verificar a redução da atividade enzimática da AANAT, mas não a perda da sua variação (ANOVA de uma via, $p < 0,0001$). Outro detalhe interessante a ser notado, foi o pico de atividade desse

grupo no ponto apresentar um perfil diferente do grupo temporizado, sendo concentrado no ponto 12 h (Figura 34).

A redução vista no grupo com adição de prazosin foi muito mais acentuada após a adição de propranolol à cultura temporizada, no qual é possível notar a redução significativa da amplitude quando comparado com o grupo prazosin. Interessante notar também, que apesar dessa redução acentuada não foi possível notar a perda da variação circadiana desse grupo (ANOVA de uma via não pareada, $p = 0,03$) (Figura 34).

Figura 34 – Atividade enzimática *in vitro* da AANAT, mediante a adição de bloqueadores noradrenérgicos na cultura temporizada.

Os valores foram expressos como pmols/glândula/h, plotado como média $\pm$ EPM. ANOVA de uma via seguida por pós-teste Bonferroni com pós-teste Bonferroni, com $p < 0,0001$ para o temporizado, $p < 0,001$ para o grupo com adição de prazosin e $p = 0,03$ para o grupo com adição de propranolol. ANOVA de duas vias com pós-teste Bonferroni com $p < 0,001$ para interação tratamento x horas após Nor, $p < 0,0001$ para o fator tratamento e $p < 0,0001$ para o fator tempo, * $p < 0,01$ para o ponto 6 h do grupo propranolol vs temporizado. *** $p < 0,0001$ para o ponto 9 h do grupo prazosin vs temporizado, e para os pontos 9 e 12 h do grupo propranolol. $N = 3$ glândulas por ponto de coleta para cada grupo. Barra listrada = presença de tratamento. Barra branca = ausência de Nor.

5 DISCUSSÃO

A proposta do presente estudo foi investigar a manutenção *in vivo* e *in vitro* da expressão dos genes relógio, realizando-se cultura de glândula pineal sob os protocolos de estimulação aguda e temporizada, além de avaliar qual via adrenérgica estava mobilizada nessa manutenção. Sendo assim, com esse trabalho verificou-se que a glândula pineal *in vivo* apresenta padrão rítmico de expressão de todos os genes relógio analisados (*Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba*), além do gene controlado pelo relógio *Dbp* e do gene *Aanat*. Ao serem submetidas à cultura sob os grupos controle e agudo, viu-se que a expressão gênica vista no grupo *in vivo* foi perdida em todos os genes relacionados ao relógio, excetuando-se o gene *Aanat* que apresentou ritmicidade no grupo agudo. Também pode-se verificar que o protocolo de temporização das culturas pela noradrenalina foi capaz de manter a expressão rítmica de todos os genes analisados. Além disso, foi possível verificar que os receptores noradrenérgicos têm um papel importante na regulação dessa manutenção do relógio na glândula pineal. Essa regulação parece ser realizada majoritariamente pelo receptor β adrenérgico, cujo efeito foi potencializado pela ativação do receptor α_1 , que estaria realizando o ajuste fino dessa manutenção.

A expressão rítmica dos genes do relógio observada nos resultados *in vivo* corrobora com os dados da literatura, os quais mostram que há o padrão rítmico de expressão nos genes relógio como: *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* e *Rev-erba* ^(23, 62-65, 73, 74), na glândula pineal. Além de apresentar ritmicidade circadiana é importante ressaltar que os ritmos de *Per1* e *Per2* apresentaram maiores valores durante a noite, o de *Bmal1* apresentou maiores valores durante o fim da noite e início da manhã e, diferentemente desses, o *Rev-erba* apresentou maiores valores durante o dia (expressão oposta ao do gene *Bmal1*), corroborando assim com a literatura ⁽⁶⁷⁾. Dessa forma foi possível demonstrar através da expressão gênica avaliada pela metodologia de PCR em tempo real, a presença da maquinaria do relógio clássica e funcional na glândula pineal de ratos.

Quando as glândulas foram submetidas à cultura, o grupo controle não mostrou variação circadiana em nenhum dos genes analisados. Recentemente, foi demonstrado que a glândula pineal extraída de rato e mantida em cultura por 48h apresentou um ritmo definido de expressão dos genes *Bmal1*, *Per2* e *Rev-erba*, mas não de *Per1* e *Aanat*, e que o ritmo desses se atenuavam em 24 h. No atual trabalho, foi mostrado que em período de 72 h de cultura (24 h a mais que o experimento supracitado) nenhuma oscilação foi observada,

corroborando com a atenuação da expressão gênica observada após as primeiras 24h de cultura descrita por Wongchitrat e colegas (2011)⁽⁶⁷⁾. Considerando que a glândula pineal de mamíferos não é uma estrutura oscilatória autônoma e, portanto, dependente de inervação simpática ^(64, 69) a perda de todas as ritmicidades já era esperada para esses resultados. Essa expressão rítmica em uma cultura sem estímulos mostrado por Wongchitrat contraria o visto no presente trabalho. Uma possível explicação para a diferença observada entre os dois trabalhos seria a de metodologias diferenciadas. Um ponto a ressaltar é que no artigo de Wongchitrat (2011) o sacrifício dos animais foi realizado às 9:00, um horário que sabidamente não condiz com a presença de noradrenalina na glândula pineal. Porém, no momento da extração da glândula há o rompimento das terminações simpáticas que inervam a glândula, gerando assim uma despolarização desses terminais culminando na liberação de noradrenalina em um momento que não é comum para a fisiologia da glândula. Essa presença de noradrenalina em um período inadequado, somado ao fato de que pelo horário do sacrifício a glândula estava recebendo noradrenalina há não muito tempo, podem ter levado à diferença de resultados. No presente estudo os animais são sacrificados na transição da fase clara para a fase escura exatamente pela da liberação aguda de noradrenalina que ocorre na glândula devido ao rompimento das terminações simpáticas. Sendo o sacrifício realizado nessa transição, a noradrenalina liberada pela lesão coincide com o ritmo natural de estímulo pela noradrenalina na glândula pineal.

Nos últimos anos, o efeito da Nor sobre o relógio circadiano da glândula pineal tem estado sob investigação e tem apresentado diferentes funções de acordo com a espécie. Isso pode ser observado, por exemplo, com relação à glândula de hamster e rato, na qual as expressões rítmicas de *Bmal1*, *Rev-erba*, *Per2*, *Per3* e *Cry2* não são afetadas pela noradrenalina, diferentemente do que acontece com os genes *Cry1* e *Per1* ^(23, 64). No presente estudo, o grupo estimulado agudamente com noradrenalina não revelou qualquer variação rítmica na expressão dos genes relógio durante o período analisado. Essa diferença entre os dados pode se dever ao fato de que em ambos os trabalhos supracitados os experimentos foram realizados *in vivo*. Na condição *in vivo* há a influência de muitos fatores, diferentemente da condição *in vitro* que é uma condição cujo controle das variáveis é mais acurado, sendo assim, possivelmente não é apenas a noradrenalina a responsável pelas variações observadas *in vivo*.

Muito se fala sobre a expressão de *Per1* mediada e dirigida pela noradrenalina. Embora a Nor pareça ser importante para a expressão de *Per1*⁽⁶⁷⁾ para Wongchitrat e colaboradores (2011), no presente trabalho após 48h de cultura, seguida por 12h de

estimulação noradrenérgica, nenhum efeito na expressão de *Per1* foi observado. No trabalho de Wongchitrat e colaboradores (2011), o estímulo noradrenérgico foi testado através da utilização de agonistas de receptores α e β adrenérgico, fenilefrina e isoproterenol respectivamente. O único gene a responder a esse estímulo foi o *Per1*, o que o levou a concluir que apenas esse responde ao estímulo noradrenérgico de forma aguda. O dado apresentado no presente trabalho não corrobora com essa informação, afinal nenhum dos genes responderam ao estímulo noradrenérgico agudo e todos responderam ao temporizado. Isso se deve, provavelmente, à diferença entre os desenhos experimentais. No trabalho citado, os autores lidaram com uma cultura com terminais noradrenérgicos ainda presentes e em degeneração, com liberação de neurotransmissores de forma descontrolada e indiscriminada, nada se assemelhando a situações fisiológicas, e do estímulo aos receptores noradrenérgicos serem realizados em períodos diferentes na cultura. Nessa situação fica difícil se analisar os efeitos de qualquer tratamento aplicado às glândulas, justificando então as diferenças entre o visto no grupo agudo deste trabalho e no de Wongchitrat (2011). Além disso, deve ser levado em consideração que utilizamos como agente estimulador a noradrenalina que ativa tanto receptores α quanto β , diferentemente do que foi feito no trabalho de Wongchitrat (2011), justificando mais uma vez as diferenças existentes entre o grupo agudo do presente trabalho e os resultados desse autor.

De acordo com os dados apresentados aqui, de fato a noradrenalina é fundamental para a expressão dos genes. A temporização foi capaz de aumentar a sensibilidade dos mecanismos de regulação desses genes, realizando a manutenção do ritmo e consequentemente, refletindo na melhora da homeostase glandular demonstrada no aumento da síntese de melatonina. Ou seja, a noradrenalina é importante na regulação dos genes relógio, porém sua simples presença não parece ser suficiente para a recuperação dos ritmos de expressão dos genes.

Outro trabalho também de 2011, realizado por Sugimoto e colaboradores, aborda a questão da expressão do gene *Per1*. Nesse trabalho, foi realizada cultura primária de astrócitos medulares de ratos, uma estrutura biológica diferente da utilizada no presente trabalho, porém os resultados observados corroboram entre si. Após estimular os astrócitos com noradrenalina 1 μ M, viu-se que a expressão gênica de *Per1* aumentava na primeira hora de estímulo, reduzindo a valores basais em até 3 horas. Considerando que no protocolo aqui apresentado, as coletas são feitas a cada 3 horas, esse aumento pode ter sido abafado pelo tempo de coleta. Além disso, deve-se levar em conta que o estímulo adrenérgico foi realizado apenas 48 h após a glândula ser posta em cultura.

Nesse mesmo trabalho de Sugimoto⁽⁶⁶⁾, foi estabelecido que essa influência noradrenérgica se dava via receptores β_2 , e potencialização dos efeitos por α_1 , o que também corrobora com o presente trabalho uma vez que ao se adicionar prazosin (inibidor específico de receptor α_1) à cultura viu-se reduções parciais nas amplitudes de expressão dos genes, e quando foi adicionado propranolol (inibidor inespecífico de receptor β) houve perda de amplitude mais acentuada, quase total. Ressaltando a participação desses receptores, e do papel de regulação fina pelo receptor α_1 . Esse mesmo raciocínio pode ser levado para os resultados observados em todos os genes, não apenas para *Per1*.

No trabalho de Garcia et al. (2008)⁽³¹⁾ quando comparada com uma cultura aguda, a temporização foi capaz de aumentar a atividade da TPH e da AANAT, sem afetar suas expressões gênicas, refletindo em um aumento da síntese de melatonina^(31, 32). No presente estudo, a temporização com Nor promoveu uma surpreendente modulação na expressão circadiana da pineal. A temporização com Nor foi capaz de induzir e reestabelecer um padrão rítmico em todos os genes do relógio e do gene controlado pelo relógio *Dbp*, além de promover um aumento da atividade da AANAT e da síntese de melatonina.

A análise *in vitro* da expressão da *Aanat* apresentou uma ativação dependente de Nor, como já era esperado, uma vez que o gene *Aanat* apresenta sítio CRE, logo após o aumento do AMPc provocado pelo estímulo adrenérgico, provavelmente houve aumento de PKA que por sua vez fosforilou CREB. E então, o pCREB se ligou ao sítio CRE aumentando a expressão da *Aanat*^(44, 45), nos grupos nos quais haviam noradrenalina adicionada à cultura. Essa resposta nos permite validar o protocolo de estimulação das culturas. Não houve diferença entre o grupo que sofreu a temporização e o grupo agudo, ambos mantiveram sua variação circadiana. Esse resultado corrobora com a literatura, no qual foi demonstrado que a temporização da cultura de glândula pineal aumenta a atividade da AANAT e a síntese de melatonina sem afetar a expressão desse gene⁽³¹⁾ quando comparado com um grupo agudo. Essa influência da noradrenalina sobre a expressão gênica da *Aanat* foi confirmada após a adição de bloqueadores noradrenérgicos à cultura temporizada. Ao se adicionar prazosin na cultura, houve uma redução da amplitude de expressão da *Aanat*, e a total perda de variação após a adição de propranolol e das drogas combinadas. Isso era esperado, uma vez que como visto na literatura, os receptores α_1 potencializam os efeitos gerados pelo receptor β ⁽³⁴⁾.

O aumento da atividade visto em ambos os grupos já era esperado, afinal o estímulo noradrenérgico promove o aumento do AMPc e do Ca^{2+} intracelular, levando à ativação da PKC^(36, 37). A PKC fosforila o resíduo Thr29 da AANAT, ativando-a e também promove a formação do complexo AANAT/14-3-3, mantendo a enzima estável⁽⁵³⁾. A queda abrupta

observada nos gráficos de atividade entre os pontos 12 e 15 horas após a Nor, pode ser explicada pelo aumento da proteólise proteossomal e também, entre outros mecanismos, pelo aumento de fosfodiesterases como a PDE4B2⁽⁵²⁾. Além desses mecanismos, a própria troca de meio realizada no ponto 12 h após Nor, poderia também estar promovendo essa queda abrupta.

Além disso de todas essas questões, a temporização promoveu a sensibilização das glândulas, disparando um avanço da síntese de melatonina. Essa sensibilização poderia ser evocada por diversos mecanismos. Portanto, para melhor compreensão desses possíveis mecanismos, se fez necessário o experimento com os bloqueadores noradrenérgicos.

De acordo com os dados observados aqui, a principal via de regulação é a disparada pela estimulação do receptor β adrenérgico, com a potencialização da via disparada pelo receptor α adrenérgico. Essa observação foi possível uma vez que em todos os genes analisados a eliminação das variações existentes no perfil diário da expressão gênica foi provocada pelo propranolol, um bloqueador de receptores β . Esse dado corrobora com estudos realizados observando a atividade enzimática da Aanat e a síntese de melatonina, que comprovam que a principal via de estimulação noradrenérgica na glândula pineal se dá via receptor β_1 adrenérgico, e que a ativação do receptor α_1 agiria como uma potencialização dos efeitos gerados pelo receptor β adrenérgico^(34, 37, 68). Além de corroborar com os resultados vistos por Sugimoto et al. (2011)⁽⁶⁶⁾ mencionados anteriormente.

Quando adicionado à cultura o prazosin foi capaz de gerar diferentes padrões de resposta, dependendo do gene analisado. Para o caso do *Bmal1* a droga foi capaz de alterar completamente o perfil de expressão gênica, sem portanto, abolir o ritmo quando avaliado pelo ajuste de uma curva cosseno. E essa característica pôde ser vista ainda nos genes *Aanat* e *Cry1*. Porém, com relação aos outros genes a droga foi capaz de abolir o ritmo. Essa diferença provavelmente se dá por alguma variação na cascata de sinalização do receptor α_1 adrenérgico, como será mencionado adiante.

Outro ponto interessante pode ser notado após o perfil diário do gene *Dbp*. Enquanto estava sob a condição temporizada, durante a fase escura não se notou aumento da expressão gênica. Aumento que ocorreu após o início da fase clara, momento esse em que não houve o estímulo noradrenérgico. Curiosamente, após a adição de prazosin (que como se sabe inibe a menor parte da estimulação adrenérgica) à cultura temporizada, houve pequenos picos aumentados. Dessa forma, imagina-se que para a expressão do gene *Dbp*, a noradrenalina temporizada se faz necessária, uma vez que a sua presença inibe a expressão gênica do *Dbp*.

enquanto que a sua ausência promove o contrário, como visto no grupo temporizado, e nos picos de “escape” vistos no grupo de cultura temporizada incubada com prazosin.

Mais uma ação interessante desse bloqueador α adrenérgico é que foi capaz de promover no perfil de RNAm do gene *Cry1* um adiantamento de fase de 3 horas.

Como proposto por Sugimoto e colaboradores (2011)⁽⁶⁶⁾ o receptor α_1 uma vez ativado recrutaria as proteínas ERK e JNK. A JNK fosforilaria a c-Jun. ERK e c-Jun atuaria de forma ainda desconhecida promovendo o aumento da expressão gênica de *Per1*, um efeito esse parcial potencializando os efeitos promovidos por β_2 . Essa via pode estar também presente na sinalização dos outros genes relógio, e as diferentes respostas observadas entre os genes, poderia ser explicada através da forma com que a c-Jun atuaria sobre a expressão gênica.

A variedade nos dados pode nos levar a acreditar que por mais que o receptor α adrenérgico haja como um potencializador da via disparada pelo receptor β adrenérgico, seria a cascata derivada pelo α adrenérgico o responsável pela regulação fina da ritmicidade dos genes observados sob a condição temporizada. Algum ou alguns elementos da cascata parecem estar envolvidos no que diz respeito à expressão dos genes analisados submetidos à estimulação noradrenérgica temporizada. As influências noradrenergicas que agem sobre a expressão gênica do *Per1*, via receptor β_2 parecem ser promovidas pelo aumento do AMPc, conseqüente ativação de PKA e fosforilação de CREB. O pCREB se liga ao sítio CRE levando a promoção da transcrição gênica de *Per1*⁽⁶⁶⁾. Esse mecanismo provavelmente está presente em todos os genes que possuam sítio CRE em sua estrutura.

O protocolo de tratamento com bloqueadores noradrenérgicos foi validado, como demonstrado na figura de atividade enzimática da AANAT mediante a adição de bloqueadores noradrenérgicos na cultura temporizada (Figura 33). Como visto, de fato o prazosin reduz parcialmente a atividade da AANAT, enquanto que o propranolol praticamente abole esse parâmetro, como já visto em Klein et al., (1983)⁽³⁴⁾.

Apesar da temporização noradrenérgica ser de fundamental importância para a manutenção da expressão rítmica e melhora na síntese de melatonina, como visto até aqui, a diferença observada nas acrofases, nos leva a crer que a noradrenalina de forma sincronizada é fundamental para que o relógio continue funcionando com expressão rítmica dos genes, mas provavelmente deve existir algum outro elemento responsável por sincronizá-los.

Existem dados na literatura que correlacionam o rompimento do relógio circadiano com alterações metabólicas em diferentes tecidos periféricos⁽⁷⁵⁾. A glândula pineal é um órgão que mostra todas as suas funções variando circadianamente. Se essa variação for

rompida (como foi no grupo agudo) a maquinaria circadiana também sofre alteração, de forma que o modelo padrão de estudo *in vitro* não seja tão adequado para pesquisas científicas. Porém, o presente trabalho mostra que a temporização das glândulas *in vitro* poderia ser uma alternativa mais apropriada para um modelo de estudo da glândula pineal *in vitro*. Assim, a temporização da cultura de glândula poderia ser um importante passo na realização de cultura de glândulas pineais, sendo capaz de manter, por exemplo, a homeostase metabólica da glândula e assegurando sua correta sinalização através da manutenção da ritmicidade dos genes relógio ⁽⁶²⁾.

6 CONCLUSÃO

Baseando-se no visto neste trabalho, é possível dizer que a expressão dos genes relógios, um assunto controverso atualmente, não possui uma oscilação autônoma sendo dependente de estimulação noradrenérgica. Porém, não apenas a presença da noradrenalina seria suficiente para a regulação da maioria dos genes, se faz necessária a sua presença de forma temporizada. Isso explicaria muitos trabalhos que afirmam que a expressão de alguns dos genes relógio não são dirigidos pela noradrenalina: falta a temporização. Os dados vistos aqui, a estimulação aguda pela noradrenalina não foi capaz de manter o ritmo desses genes na glândula pineal, reafirmando a importância dessa temporização para o estudo de glândula pineal *in vitro*. Ou seja, a presença da noradrenalina é fundamental, mas o elemento temporização é imprescindível para uma melhor condição da glândula.

Além disso, essa temporização da estimulação noradrenérgica se dá via receptores α_1 e β , sendo que a cascata de sinalização mediada pelo receptor α_1 parece ser a responsável pela regulação fina da expressão gênica, e responsável pelas variações vistas entre os grupos agudo e temporizado.

REFERÊNCIAS*

1. Kappers JA. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1960;52:163-215.
2. Arendt J. Melatonin and the Mammalian Pineal Gland. London: Chapman & Hall; 1995.
3. Vollrath L. The Pineal Organ. Heidelberg: Springer-Verlag; 1981.
4. Moller M. Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech.* 1992 May 1;21(3):188-204.
5. Swanson LW. Brain Maps: structure of the brain. 2ª ed. Amsterdã: Elsevier Science B. V.; 1998.
6. Baltatu O, Afeche SC, Jose dos Santos SH, Campos LA, Barbosa R, Michelini LC, et al. Locally synthesized angiotensin modulates pineal melatonin generation. *J Neurochem.* 2002 Jan;80(2):328-34.
7. Dardente H, Cermakian N. Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol Int.* 2007;24(2):195-213.
8. Skene DJ, Arendt J. Human circadian rhythms: physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Ann Clin Biochem.* 2006 Sep;43(Pt 5):344-53.
9. Duguay D, Cermakian N. The crosstalk between physiology and circadian clock proteins. *Chronobiol Int.* 2009 Dec;26(8):1479-513.
10. Reiter RJ. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol.* 1995 Oct;16(4):383-415.
11. Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, et al. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* 1993 Jun 15;70(1-2):65-71.
12. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem.* 2002 Feb;2(2):181-97.
13. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006 Mar;38(3):313-6.
14. Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci.* 2003 Sep 1;8:d1093-108.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

15. Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 2003 Apr 4;72(20):2183-98.
16. Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 1997 Jul 15;159(2):574-81.
17. Kim KH, Woo HY, Lim SW. Association Study of a Serotonin Receptor 2A Gene - 1438A/G Polymorphism and Anxiety-Related Traits. *Psychiatry Investig.* 2008 Dec;5(4):244-6.
18. Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, et al. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem.* 1995 Mar 31;270(13):7037-40.
19. Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M, Carlberg C. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* 1995 Feb 11;23(3):327-33.
20. Moore RY. Neural control of pineal function in mammals and birds. *J Neural Transm Suppl.* 1978(13):47-58.
21. Cipolla Neto J, Afeche SC. Glândula Pineal: fisiologia celular e função. Wajchenberg BL, editor. São Paulo: Roca; 1992.
22. Moore RY, Speh JC, Card JP. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol.* 1995 Feb 13;352(3):351-66.
23. Simonneaux V, Poirel VJ, Garidou ML, Nguyen D, Diaz-Rodriguez E, Pevet P. Daily rhythm and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004 Jan 5;120(2):164-72.
24. Masson-Pevet M. [Melatonin in the circadian system]. *J Soc Biol.* 2007;201(1):77-83.
25. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia.* 1989 Oct 15;45(10):922-32.
26. Klein DC. The mammalian melatonin rhythm-generating system. Wetterberg L, editor. Oxford: Pergamon Press; 1993.
27. Cipolla-Neto J, Bartol I, Seraphim PM, Afeche SC, Scialfa JH, Peracoli AM. The effects of lesions of the thalamic intergeniculate leaflet on the pineal metabolism. *Brain Res.* 1995 Sep 11;691(1-2):133-41.
28. Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev.* 2003 Jun;55(2):325-95.

29. Cipolla-Neto J, Skorupa AL, Ribeiro-Barbosa ER, Bartol I, Mota SR, Afeche SC, et al. The role of the retrochiasmatic area in the control of pineal metabolism. *Neuroendocrinology*. 1999 Feb;69(2):97-104.
30. Yamada H, Ogura A, Koizumi S, Yamaguchi A, Moriyama Y. Acetylcholine triggers L-glutamate exocytosis via nicotinic receptors and inhibits melatonin synthesis in rat pinealocytes. *J Neurosci*. 1998 Jul 1;18(13):4946-52.
31. Garcia RA, Afeche SC, Scialfa JH, do Amaral FG, dos Santos SH, Lima FB, et al. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *Life Sci*. 2008 Jan 2;82(1-2):108-14.
32. Peliciari-Garcia RA, Marcal AC, Silva JA, Carmo-Buonfiglio D, Amaral FG, Afeche SC, et al. Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland. *Life Sci*. 2010 Jul 31;87(5-6):169-74.
33. Borjigin J, Wang MM, Snyder SH. Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature*. 1995 Dec 21-28;378(6559):783-5.
34. Klein DC, Sugden D, Weller JL. Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jan;80(2):599-603.
35. Chik CL, Ho AK, Klein DC. Alpha 1-adrenergic potentiation of vasoactive intestinal peptide stimulation of rat pinealocyte adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate: evidence for a role of calcium and protein kinase-C. *Endocrinology*. 1988 Feb;122(2):702-8.
36. Sugden D, Klein DC. Activators of protein kinase C act at a postreceptor site to amplify cyclic AMP production in rat pinealocytes. *J Neurochem*. 1988 Jan;50(1):149-55.
37. Vanecek J, Sugden D, Weller J, Klein DC. Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology*. 1985 Jun;116(6):2167-73.
38. Klein DC. The pineal gene expression party: who's the surprise guest? *Endocrinology*. 2007 Apr;148(4):1463-4.
39. Klein DC, Ganguly S, Coon S, Weller JL, Obsil T, Hickman A, et al. 14-3-3 Proteins and photoneuroendocrine transduction: role in controlling the daily rhythm in melatonin. *Biochem Soc Trans*. 2002 Aug;30(4):365-73.
40. Chik CL, Arnason TG, Dukewich WG, Price DM, Ranger A, Ho AK. Histone H3 phosphorylation in the rat pineal gland: adrenergic regulation and diurnal variation. *Endocrinology*. 2007 Apr;148(4):1465-72.
41. Sugden D, Vanecek J, Klein DC, Thomas TP, Anderson WB. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. *Nature*. 1985 Mar 28-Apr 3;314(6009):359-61.

42. Roseboom PH, Klein DC. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol.* 1995 Mar;47(3):439-49.
43. Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri MA, Koonin EV, et al. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science.* 1995 Dec 8;270(5242):1681-3.
44. Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology.* 1996 Jul;137(7):3033-45.
45. Klein DC, Roseboom PH, Coon SL. New light is shining on the melatonin rhythm enzyme: the first postcloning view. *Trends Endocrinol Metab.* 1996 Apr;7(3):106-12.
46. Maronde E, Pfeffer M, Olcese J, Molina CA, Schlotter F, Dehghani F, et al. Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J Neurosci.* 1999 May 1;19(9):3326-36.
47. Ho AK, Price DM, Terriff D, Chik CL. Timing of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the rat pineal gland. *Mol Cell Endocrinol.* 2006 Jun 27;252(1-2):34-9.
48. Koch M, Mauhin V, Stehle JH, Schomerus C, Korf HW. Dephosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatases is involved in inactivation of Aanat gene transcription in rat pineal gland. *J Neurochem.* 2003 Apr;85(1):170-9.
49. Klein DC, Weller JL. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science.* 1970 Sep 11;169(3950):1093-5.
50. 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 Jan 20;199(4326):309-11.
51. Klein DC, Weller JL. Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science.* 1972 Aug 11;177(4048):532-3.
52. Kim JS, Bailey MJ, Ho AK, Moller M, Gaildrat P, Klein DC. Daily rhythm in pineal phosphodiesterase (PDE) activity reflects adrenergic/3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate induction of the PDE4B2 variant. *Endocrinology.* 2007 Apr;148(4):1475-85.
53. Choi BH, Chae HD, Park TJ, Oh J, Lim J, Kang SS, et al. Protein kinase C regulates the activity and stability of serotonin N-acetyltransferase. *J Neurochem.* 2004 Jul;90(2):442-54.
54. Huang Z, Liu T, Borjigin J. N-terminal residues regulate proteasomal degradation of AANAT. *J Pineal Res.* 2010 Apr;48(3):290-6.
55. 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 Apr;14(2):105-15.

56. Ribelayga C, Pevet P, Simonneaux V. Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. *Brain Res.* 1997 Nov 28;777(1-2):247-50.
57. Engel L, Lorenzkowski V, Langer C, Rohleder N, Spessert R. The photoperiod entrains the molecular clock of the rat pineal. *Eur J Neurosci.* 2005 Apr;21(8):2297-304.
58. Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res.* 2002 Jul;309(1):47-56.
59. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron.* 2004 Aug 19;43(4):527-37.
60. Hinoi E, Ueshima T, Hojo H, Iemata M, Takarada T, Yoneda Y. Up-regulation of per mRNA expression by parathyroid hormone through a protein kinase A-CREB-dependent mechanism in chondrocytes. *J Biol Chem.* 2006 Aug 18;281(33):23632-42.
61. Viyoch J, Matsunaga N, Yoshida M, To H, Higuchi S, Ohdo S. Effect of haloperidol on mPer1 gene expression in mouse suprachiasmatic nuclei. *J Biol Chem.* 2005 Feb 25;280(8):6309-15.
62. Fukuhara C, Yamazaki S, Liang J. Pineal circadian clocks gate arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression in the mouse pineal gland. *J Neurochem.* 2005 Apr;93(1):156-62.
63. Namihira M, Honma S, Abe H, Tanahashi Y, Ikeda M, Honma K. Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. *Neurosci Lett.* 1999 May 21;267(1):69-72.
64. Wongchitrat P, Felder-Schmittbuhl MP, Phansuwan-Pujito P, Pevet P, Simonneaux V. Endogenous rhythmicity of Bmal1 and Rev-erb alpha in the hamster pineal gland is not driven by norepinephrine. *Eur J Neurosci.* 2009 May;29(10):2009-16.
65. Wu T, Dong Y, Yang Z, Kato H, Ni Y, Fu Z. Differential resetting process of circadian gene expression in rat pineal glands after the reversal of the light/dark cycle via a 24 h light or dark period transition. *Chronobiol Int.* 2009 Jul;26(5):793-807.
66. Sugimoto T, Morioka N, Sato K, Hisaoka K, Nakata Y. Noradrenergic regulation of period1 expression in spinal astrocytes is involved in protein kinase A, c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase activation mediated by alpha1- and beta2-adrenoceptors. *Neuroscience.* 2011 Jun 30;185:1-13.
67. Wongchitrat P, Felder-Schmittbuhl MP, Govitrapong P, Phansuwan-Pujito P, Simonneaux V. A noradrenergic sensitive endogenous clock is present in the rat pineal gland. *Neuroendocrinology.* 2011;94(1):75-83.
68. 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 May;11(3):241-55.

69. Yoshikawa T, Yamazaki S, Menaker M. Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *J Biol Rhythms*. 2005 Dec;20(6):500-12.
70. Afeche SC, Barbosa R, Scialfa JH, Terra IM, Cassola AC, Cipolla-Neto J. Effects of the blockade of high voltage-activated calcium channels on in vitro pineal melatonin synthesis. *Cell Biochem Funct*. 2006 Nov-Dec;24(6):499-505.
71. 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 Sep;69(9):2547-50.
72. Cornelissen G, Halberg F, Stebbings J, Halberg E, Carandente F, Hsi B. Chronobiometry with pocket calculators and computer systems. *Ric Clin Lab*. 1980 Apr-Jun;10(2):333-85.
73. Bai L, Zimmer S, Rickes O, Rohleder N, Holthues H, Engel L, et al. Daily oscillation of gene expression in the retina is phase-advanced with respect to the pineal gland. *Brain Res*. 2008 Apr 8;1203:89-96.
74. Wang GQ, Du YZ, Tong J. Daily oscillation and photoresponses of clock gene, Clock, and clock-associated gene, arylalkylamine N-acetyltransferase gene transcriptions in the rat pineal gland. *Chronobiol Int*. 2007;24(1):9-20.
75. Kennaway DJ, Owens JA, Voultsios A, Boden MJ, Varcoe TJ. Metabolic homeostasis in mice with disrupted Clock gene expression in peripheral tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Oct;293(4):R1528-37.

APÊNDICE – Artigo submetido sob revisão

O artigo que se segue foi submetido à revista científica *Brain Research*, analisado pelos revisores e reenviado para os autores para que os ajustes e complementações adequadas fossem realizados. As complementações estão sendo feitas atualmente. A versão que se segue é a primeira versão enviada, ainda sem as alterações sugeridas pelos revisores.

Importante ressaltar que os autores JAS e RAP contribuíram de forma igual para o manuscrito, dividindo portanto a autoria do artigo, e que na nova versão ainda a ser re-submetida JAS é o primeiro autor.