Marco Taneda

**Papel da melatonina na regulação da ritmicidade circadiana de tecidos
periféricos envolvidos com o metabolismo energético: avaliação do perfil
diário da expressão dos genes relógio (*clock genes*)**

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

São Paulo
2011

Marco Taneda

**Papel da melatonina na regulação da ritmicidade circadiana de tecidos
periféricos envolvidos com o metabolismo energético: avaliação do perfil
diário da expressão dos genes relógio (*clock genes*)**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão Original

São Paulo
2011

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

Taneda, Marco.

Papel da melatonina na regulação da ritmicidade circadiana de tecidos periféricos envolvidos com o metabolismo energético: avaliação do perfil diário da expressão dos genes relógio (*clock genes*) / Marco Taneda. -- São Paulo, 2011.

Orientador: José Cipolla Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: *Clock genes* e melatonina.

Versão do título para o inglês: Role of melatonin in regulating circadian rhythms in peripheral tissues involved in energy metabolism: evaluation of the daily profile of the expression of clock genes.

Descritores: 1. Ritmos circadianos 2. Melatonina 3. Pinealectomia animal 4. Glândula pineal 5. Metabolismo energético 6. Expressão gênica I. Cipolla Neto, José II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB080/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marco Taneda.

Título da Tese: Papel da melatonina na regulação da ritmicidade circadiana de tecidos periféricos envolvidos com o metabolismo energético: avaliação do perfil diário da expressão dos genes relógio (*clock genes*).

Orientador(a): José Cipolla Neto.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.020/2008

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 79/04/CEEA, datado de 16.12.04 e por solicitação do Prof. Dr. José Cipolla Neto, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão dos alunos: **Ana Maria Souza Lopes, Rafael Peres, Marco Taneda** ao Projeto de Pesquisa "*O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: interações hormonais, ações centrais e periféricas: (papel, obesidade, diabetes e envelhecimento)*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 24 de abril de 2008.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

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 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of. Circ.CEEA.06.08
WTL/mcgn

São Paulo, 08 de setembro de 2008.

Prezado^(a) Professor^(a),

REF.: Protocolo n° 079/04.

"O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: interações hormonais, ações centrais e periféricas: (papel, obesidade, diabetes e envelhecimento)"

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, foi prorrogada por (3) três anos, a contar da data da sua aprovação pela CEEA/ICB.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEEA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da Comissão de Ética em
Experimentação Animal - ICB /USP

Ilmo^(a). Sr^(a).

Prof^(a). Dr^(a). JOSÉ CIPOLLA NETO

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Dedico

Ao Senhor meu Deus, criador dos céus e da terra;

À minha inestimável esposa, minha companheira e ajudadora

Agradecimentos

O que darei ao Senhor por tamanha misericórdia para comigo?

Graças dou ao meu grandioso Deus por tudo que me fez,
me faz e me fará...

Nele tudo se torna possível. “O Senhor é o meu Pastor,
socorro bem presente nas horas de aflição e bálsamo
consolador nas angústias; à sua sombra estarei
preservado do mal; e certamente sua bondade
e misericórdia me seguirão por todos
os dias da minha vida.”

Agradecimentos

À minha esposa pelo amor, paciência, incentivo e apoio.

Aos companheiros do laboratório Ana Lopes, Rafael Peres, Ronaldo Melo, Rodrigo Garcia, Daniela Buonfiglio, Fernanda Amaral, Rafael Prévide e Rosana Dantas pela ajuda e apoio e amizade.

À Julieta Scialfa, técnica do laboratório, pelo apoio e ajuda.

Agradeço ao Laboratório do professor Cipolla pelo auxílio e convivência.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

“Os que confiam no Senhor serão como o monte de Sião,
que não se abala, mas permanece para sempre.
Como estão os montes à roda de Jerusalém, assim o Senhor está
em volta do seu povo desde agora e para sempre.
Porque o cetro da impiedade não permanecerá sobre a sorte dos justos,
para que o justo não estenda as suas mãos à iniquidade.
Faze bem, ó Senhor, aos bons e aos que são retos de coração.
Quanto àqueles que se desviam para os seus caminhos tortuosos,
leva-los-á o Senhor com os que obram a maldade; paz haverá sobre Israel.”
(Salmos 125)

RESUMO

Taneda M. Papel da melatonina na regulação da ritmicidade circadiana de tecidos periféricos envolvidos com o metabolismo energético: avaliação do perfil diário da expressão dos genes relógio (*clock genes*). [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

O metabolismo energético é dependente, dentre outros fatores, de uma temporização circadiana entre os tecidos participantes da regulação metabólica. O processo de sincronização parece depender da expressão dos genes relógio e de mediadores como a melatonina, que associam o oscilador central e os osciladores periféricos. Investigamos o papel da melatonina na expressão dos genes relógio em tecidos periféricos, onde ratos Wistar foram divididos em dois grupos: pinealectomizados e controle. Após 45 dias os animais foram sacrificados circadianamente e seus tecidos de interesse extraídos para análise através do PCR convencional. A pinealectomia ocasionou significativa desorganização temporal na expressão de quase todos os genes relógios dos tecidos muscular e do adiposo periepididimal. O tecido hepático foi o que menos sofreu alterações pela pinealectomia. Em conclusão, esses dados mostram que a melatonina é necessária para manutenção da ritmicidade dos genes relógio no tecido muscular estriado esquelético, no tecido adiposo periepididimal e no tecido hepático.

Palavras-chave: Ritmos circadianos. Melatonina. Pinealectomia animal. Glândula pineal. Metabolismo energético. Expressão gênica.

ABSTRACT

Taneda M. Role of melatonin in regulating circadian rhythms in peripheral tissues involved in energy metabolism: evaluation of the daily profile of the expression of clock genes. [Ph. D. thesis (Human Physiology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

The energy metabolism is dependent, between other factors, of a circadian timing among the tissues participants of the metabolic regulation. The synchronization process appears to depend on the expression of clock genes and mediators such as melatonin, involving the central oscillator and peripheral oscillators. We have investigated the role of melatonin in the expression of clock genes in peripheral tissues. Rats have been divided into two groups: pinealectomized and control rats. After 45 days the animals were sacrificed and their tissues of interest have been extracted for analysis by conventional PCR. Pinealectomy caused a significant disruption in the temporal expression of almost all genes of muscle tissue and fat tissue. The liver tissue was the least affected by changes of pinealectomy. In conclusion, these data show that melatonin is necessary for maintaining the rhythmicity of clock genes in skeletal muscle, adipose tissue and liver tissue.

Keywords: Circadian rhythm. Melatonin. Animal pinealectomy. Pineal Gland. Metabolism. Gene Expression.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 A Pineal, a Melatonina e o Controle Diário do Metabolismo Energético.....	13
1.2 A Ritmicidade Diária e os <i>Clock Genes</i>.....	14
2 OBJETIVO.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Extração dos Tecidos.....	19
3.2 Extração do RNA.....	19
3.3 Transcrição Reversa e PCR.....	20
3.4 Análise Estatística.....	22
4 RESULTADOS.....	23
4.1 Tecido Muscular Estriado Esquelético (Sóleo).....	23
4.2 Tecido Hepático.....	31
4.3 Tecido Adiposo Periepididimal.....	40
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Pineal, a Melatonina e o Controle Diário do Metabolismo Energético

A glândula pineal, através da síntese e liberação de melatonina tem um papel importante na regulação circadiana de muitos processos fisiológicos (Stehle et al., 2003). A melatonina está presente em altos níveis no plasma durante a noite, sendo que durante o dia os seus níveis plasmáticos são quase nulos (Reiter, 1993). A biosíntese de melatonina ocorre através da estimulação de adrenoreceptores β_1 e α_1 , presentes nos pinealócitos, pela ação da noradrenalina liberada pelos terminais simpáticos dos neurônios pós-ganglionares cujos corpos celulares se encontram no gânglio cervical superior. A mobilização desses adrenoreceptores resulta no aumento da atividade da enzima arilalquilamina *N*-acetiltransferase (AANAT ou serotonina *n*-acetiltransferase), que, sendo a enzima passo limitante da via de síntese de melatonina, leva a um aumento da sua produção (Sugden, 1989).

A melatonina participa da regulação do metabolismo de carboidratos. Assim, a melatonina afeta a homeostase de glicose estimulando o seu transporte em células adiposas de ratos (Lima et al., 1994) e musculares esqueléticas de camundongos (Ha et al., 2006). Estudos do nosso grupo mostram que ratos pinealectomizados desenvolvem resistência insulínica (Lima et al., 1998), apresentam alterações consideráveis em parâmetros endócrinos e metabólicos do tecido adiposo (Alonso-Vale et al., 2005, 2006) e perdem, de forma considerável, a capacidade de adaptar-se metabolicamente às exigências do jejum e do exercício (Alonso-Vale et al., 2004; Borges-Silva et al., 2005 a,b). Além disso, demonstramos que, tanto centralmente quanto periféricamente, a melatonina, além de mobilizar mecanismos intracelulares que se cruzam com a sinalização da insulina e da leptina, pode, por si mesma, fosforilar o receptor de insulina em resíduos tirosil, potenciando a sua ação (Anhê et al., 2004).

Animais pinealectomizados apresentam uma série de alterações na regulação diária de parâmetros metabólicos. Lima et al. (1998) estudaram os efeitos da pinealectomia e demonstraram que os animais operados perdem a capacidade de responderem a uma sobrecarga de glicose de acordo com a hora do dia: imediatamente após o início do claro os animais respondiam de uma forma muito parecida ao controle; no entanto, antes do início do escuro, enquanto os animais controle secretavam muito mais insulina em resposta ao mesmo sinal

glicêmico, os pinealectomizados mantinham a mesma resposta matutina, deixando de mostrar, portanto, a adaptação circadiana ao período noturno. Esse mesmo efeito de desorganização rítmica metabólica, provocada pela pinealectomia, foi constatado quando se considera a maior ou menor capacidade de ilhotas pancreáticas, isoladas em diferentes horas do dia, de secretar insulina frente a um estímulo glicêmico (Picinato et al., 2002). Assim, animais pinealectomizados apresentam um adiantamento de fase da curva diária de secreção de insulina estimulada por glicose de quase 3 horas, fazendo com que seu pico de responsividade máxima localize-se durante o período de dia e não à noite quando seria mais adaptativo. Alonso-Vale et al. (2004) demonstraram que a pinealectomia provoca uma alteração diária nos parâmetros metabólicos dos adipócitos de forma a resultar num quadro de inadequação entre os requerimentos energéticos e a capacidade de mobilizá-los de acordo com o ciclo atividade-repouso.

Dessa forma, o conjunto de trabalhos acima mencionados mostra que a pinealectomia, entre outros efeitos, altera, de forma considerável, a organização temporal dos fenômenos metabólicos, prejudicando o ajuste dos animais às flutuações fisiológicas diárias adaptativas às exigências da relação com o meio ambiente típico do dia e da noite.

1.2 A Ritmicidade Diária e os *Clock Genes*

Já é bem aceito que os ritmos biológicos de mamíferos são comandados pelo oscilador mestre localizado nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) do hipotálamo. Os NSQ são considerados o marcapasso central que dirigem a maioria dos ritmos circadianos de parâmetros fisiológicos e comportamentais (Ralph e Hurd, 1996).

Por outro lado, recentemente, foi descoberto um grupo especializado de genes: os genes relógio (*clock genes*). O primeiro gene relógio, o *period*, foi descoberto em 1984 em *Drosophila melanogaster* e nesta espécie foi descoberto que a transcrição deste gene era induzida quando o nível das proteínas PERIOD (ou seja, proteínas que são produzidas pela transcrição e tradução do próprio gene) apresentava-se reduzido. Dez anos depois da identificação do *period*, o segundo gene descoberto foi o *timeless*, com um mecanismo proposto de autoregulação por um feedback negativo. O gene *frequency* foi descoberto em *Neurospora*. Estes achados fixaram o conceito de que a oscilação circadiana é causada pela transcrição dos genes relógio. Até aquele momento ainda não se sabia da existência dos genes relógio em mamíferos, apenas haviam sido realizados

experimentos na tentativa de provar a existência de um relógio central, localizado nos núcleos supraquiasmáticos. Em 1994, o gene *clock* foi nomeado a partir de um estudo mutagênico em camundongos usando-se N-etil-N-Nitrosourea, e criou-se um animal com um gene mutante, onde o ritmo circadiano da atividade locomotora havia sido abolido após duas semanas de alojamento em escuro constante. Estes achados sugeriram que os ritmos circadianos são determinados em nível gênico nos mamíferos. Nos anos de 1997 e 1998 vários grupos de pesquisadores isolaram genes homólogos ao gene *period* de *Drosophila* em mamíferos. O *mPer1*, *mPer2* e *mPer3*, os quais continham domínios PAS (*period*, *arnt* e *sim*), que é um domínio importante para interações proteína-proteína e localização do domínio citoplasmático que ajuda a manter proteínas no citoplasma. A clonagem simultânea do gene *clock* do relógio de ratos revelou a codificação da proteína PAS/bHLH (“*basis helix loop helix*”). Heterodímeros desta proteína ligam-se a E-box da região promotora do *mPer1*. Estes resultados sugeriram que o mecanismo de feedback negativo presente na *Drosophila* estava também presente nos mamíferos. Dado que camundongos com deficiência em ambos os genes *mPer1* e *mPer2* não expressavam ritmos circadianos, estes estudos sugeriram que ambos são genes oscilatórios indispensáveis para geração de ritmos circadianos em camundongos. Para provar definitivamente que *mPer1* e *mPer2* possuem a capacidade de gerar oscilações, foi investigada a introdução dos genes *mPer1* e *mPer2* de ratos em *Drosophila* com gene mutante arritmico *Per⁰¹* para avaliar se a introdução causaria a recuperação funcional. Em avaliação comportamental mostraram que *mPer1* e *mPer2* dirigidos pelo *timeless* (*Drosophila*), restauraram os ritmos em *Per1*, e os ritmos restaurados por *mPer2* foram mais intensos e diferiram na periodicidade daqueles restaurados por *mPer1*, mostrando-se assim que ambos atuam como componentes funcionais do relógio.

Atualmente, os *clock genes* são definidos como genes cujos produtos protéicos são necessários para a geração e regulação dos ritmos circadianos nas células individuais e por todo o organismo (Takahashi, 2004) através da geração de alças de retroalimentação entre processos de transcrição e tradução gênicas (Albrecht et al., 2001; Nonaka et al., 2001), as quais duram aproximadamente 24 h. (Lowrey e Takahashi, 2004). A expressão desses genes já foi identificada em vários tecidos periféricos, além do NSQ, e a glândula pineal (Albrecht et al., 2001; Nonaka et al., 2001).

Os *clock genes* são divididos em elementos positivos e negativos de acordo com a ação, através de alças de retroalimentação, das proteínas resultantes, no controle da sua própria

transcrição assim como de outros genes efetores (Dunlap, 1998; Dunlap et al., 1999). Assim, por exemplo, BMAL 1 e CLOCK (proteínas dos elementos positivos) se dimerizam no citoplasma e se translocam para o núcleo. Em seguida, ligam-se à região promotora (E-Box) de múltiplos genes, tais como *Per1*, *Per2*, *Per3* e *Cry1* e *Cry2*, ativando suas transcrições (Gekakis et al., 1998; Hogenesch et al., 1998). *PER* e *CRY* (proteínas dos elementos negativos) formam heterodímeros no citoplasma e então retornam para o núcleo para inibir CLOCK-BMAL1, resultando na conseqüente diminuição da transcrição dos genes *Per* e *Cry* (Shearman et al., 2000; Kohsaka e Bass, 2007). CLOCK-BMAL1 também induzem a transcrição de *Rev-erba* que, por sua vez, inibe a transcrição do *Bmal1* (Kohsaka e Bass, 2007). Contrariamente, *Per2* age como elemento positivo, promovendo a atividade de transcrição dos heterodímeros CLOCK/BMAL1 (Shearman et al., 2000). Além disso, o *dbp* (*albumin D-element binding protein*), que foi o primeiro *clock gene* localizado no fígado (Wuarin e Schibler, 1990), tem sido caracterizado como um gene com características positivas, porque é capaz de ligar-se à região promotora do gene *Per1* e assim influenciar de forma positiva a sua transcrição (Yamaguchi et al., 2000).

O estudo dos *clock genes* está se tornando particularmente importante devido ao grande número de doenças que são associadas às alterações do tempo circadiano (Ko e Takahashi, 2006).

A inativação dos genes *Bmal 1* e *Clock*, em camundongos, causa a supressão das variações diárias na glicose e triglicérides plasmáticos (Rudic et al., 2004). Da mesma forma, as alterações metabólicas típicas do diabetes experimental, induzido por estreptozotocina, provocam, em ratos, alterações da ritmicidade diária dos *clock genes* localizados no coração (Young et al., 2002).

A ausência de BMAL1 (*Bmal 1*^{-/-}) em camundongos resulta em vários fenótipos incluindo-se a perda dos ritmos circadianos, a perda do peso corporal, infertilidade, artropatia progressiva e menor expectativa de vida (Bunger et al., 2005; Ko e Takahashi, 2006), o que sugere que *Bmal1* possa ter papéis funcionais distintos dependendo do tipo de tecido em que ele é expresso (Ko e Takahashi, 2006).

Entretanto, existem controvérsias a respeito de interações entre os *clock genes* e a melatonina. Alguns estudos mostram que injeções de melatonina causam alterações no RNA mensageiro do gene *Per2* de ratos tanto na pineal quanto no NSQ (Isobe e Nishino, 2004). Por outro lado, há estudos mostrando que a pinealectomia não altera o padrão circadiano do RNA mensageiro do gene *Per2* de ratos (Oishi et al., 2000). Uma das explicações para a obtenção de

resultados conflitantes pode residir nas diferentes metodologias utilizadas pelos pesquisadores (RT-PCR e injeção de melatonina e *Northern Blot* em animais pinealectomizados).

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é investigar o papel da melatonina na organização temporal diária da expressão dos *clock genes* em vários tecidos envolvidos com a regulação do metabolismo energético.

Pretende-se, desta maneira, estudar a expressão rítmica diária dos genes relógio no tecido adiposo periepídídimo, no tecido muscular estriado esquelético e no fígado, em animais intactos e em animais pinealectomizados.

A presente proposta irá possibilitar esclarecer diversas questões sobre as interações entre os *clock genes* e a melatonina, ainda não abordados na literatura ou que dependem de maiores esclarecimentos, além de estabelecer relações entre os *clock genes* e o metabolismo, com a possibilidade de essa interação poder estar correlacionada ao desenvolvimento de patologias metabólicas, como o diabetes melito.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Ratos Wistar jovens (1 mês de idade) foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de xilazina e cloridrato de ketamina na proporção de 5: 3 ml, respectivamente, (Solução final 0,15 ml / 100 g de peso do animal, intraperitoneal) e submetidos à pinealectomia (Hoffman e Reiter, 1965) que consiste na fixação da cabeça do rato em suporte para cirurgia estereotáxica, abertura mediana do escalpo com exposição da sutura lambdóide, perfuração circular do osso, retirada do disco ósseo, extração da glândula pineal logo abaixo do seio venoso, recolocação do disco ósseo e suturação do escalpo. Esses animais foram chamados de ratos PINX enquanto que os animais os quais não foram submetidos à pinealectomia foram chamados de ratos controle (CTL). Após a cirurgia ambos os grupos foram mantidos em biotério com ciclo claro-escuro 12 h:12 h: 200 lux: 0.5 lux, com temperatura controlada (23 ± 2 °C) e comida e água *ad libitum*. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo – USP.

3.1 Extração dos Tecidos

Quarenta e cinco dias após os tratamentos, os grupos de animais CTL e PINX foram decapitados a cada 3 horas (ZT0, ZT3, ZT6, ZT9, ZT12, ZT15, ZT18, ZT21 - ZT= “zeitgeber time”; ZT=12 transição para o escuro e ZT=0, transição para o claro). Coletou-se amostras de tecido de interesse que foram rapidamente congeladas em 1 ml de TRIzol™ (Life Technologies, Eggenstein, Germany) e estocadas a -80 °C para a posterior extração do RNA. Os tecidos de interesse foram: tecido adiposo periepididimal, tecido muscular estriado esquelético e fígado, provenientes tanto de animais intactos quanto de animais pinealectomizados.

3.2 Extração do RNA

As amostras de tecidos foram homogeneizadas usando-se Polytron (Kinematica, EUA) até a completa solubilização. Adicionou-se 200 µl de clorofórmio em cada amostra sendo que, em seguida, foram agitadas de 2 em 2 minutos até completar 10 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C, formando-se, assim, três fases: 1) a superior é

aquosa, incolor, que contém o RNA; 2) a intermediária que é esbranquiçada e contém o DNA e; 3) a inferior, orgânica, que contém o clorofórmio. A primeira fase, que contém o RNA total, foi transferida para um outro tubo e adicionado 0,5 ml de álcool isopropanol, que precipita o RNA total. As amostras foram agitadas periodicamente até completar 15 minutos, e posteriormente centrifugadas a 12000 rpm por 25 minutos a 4 °C formando-se um *pellet*. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1 ml de etanol a 75% gelado e, então, centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Descartou-se novamente o sobrenadante e o *pellet* foi secado à temperatura ambiente e, em seguida, diluído em água DEPC e estocado a -80 °C.

O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Após quantificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,2%, para análise da integridade do RNA.

3.3 Transcrição Reversa e PCR

O procedimento de transcrição reversa utilizou SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) que consiste na síntese do cDNA a partir de 5 µg de RNA total. Para cada reação utilizou-se: 1 µl de dNTPs (0,5 mM cada), 1 µl de Random Primer, 5 µg de RNA total e água estéril para completar um volume final de 12 µl, que foi incubado por 5' a 70° e em seguida por 20' a 25°. No período de incubação a 25° foi adicionado 8 µl de Mix da enzima que foi composto por: 4 µl de tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), 2 µl de DTT, 1 µl da enzima transcriptase reversa e 1 µl de água estéril. A reação, portanto, ficou com volume final de 20 µl e foi incubada por 75' a 42° seguida de aquecimento à 70 °C por 15 min para desnaturação da enzima.

Para realizar a reação de PCR, adicionou-se os seguintes reagentes: primer, amostra, *GoTaq Reaction Buffer*, magnésio, dNTP, *GoTaq DNA Polymerase* (5 µg/µl) e água estéril. Cada amostra foi incubada passando-se por cinco etapas: 1) 95 °C por 2 minutos; 2) 95 °C por 30 segundos; 3) 30 segundos na temperatura que depende de cada primer; 4) 72 °C por 30 segundos; 5) retorna para a segunda etapa completando-se, assim, um ciclo. O número de ciclos depende de uma curva de saturação feita previamente para cada gene e tecido. Os genes que foram analisados são todos os *clock genes* (*Cry1*, *Cry2*, *Per1*, *Per2*, *Clock* e *Bmal1*) nos tecidos já acima mencionados.

Após o término do PCR, o produto foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. O gel foi analisado através do programa Scion Image v Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation, Maryland, USA) e os dados colocados no programa Prism, v.5.0 (GraphPad, EUA) para a realização das análises estatísticas.

Para a escolha do gene constitutivo ideal a ser utilizado em cada tecido, analisamos as variações ao longo do dia e entre os grupos de cada gene constitutivo para cada tecido. Sendo que o gene constitutivo ideal escolhido foi aquele que apresentou a menor variação.

Os primers utilizados, suas respectivas temperaturas de anelamento e o tamanho dos seus produtos amplificados são:

- RPL37a: 5'-CAAGAAGGTCGGGATCGTCG-3' (sense) e 5'-ACCAGGCAAGTCTCAGGAGGTG-3' (antisense), 57°C, 280bp.
- *cry 1*: 5'- AAC GGA GGG CTC ATG GGC TAT G- 3' (sense) e 5'-TGC TCT GTC GCT GGA CTT TGG G- 3' (antisense), 58,4°C, 336 bp.
- *cry 2*: 5'- GGC TTC CCT TGG ATT GAC GC- 3' (sense) e 5'-TTT CAG TTT GGG CAG GTA TCG C- 3' (antisense), 60,2°C, 306bp.
- *per 1*: 5'- ACC CAA GGA CCG AGA CCA TCA C- 3' (sense) e 5'- CCA GTT TCG ACA GTC TGT GGC- 3' (antisense), 58,4°C, 461bp.
- *per 2*: 5'-CTA CCC GTT TCC ACC AGC AAC C- 3' (sense) e 5'-GCA TGT TGG AGG TGC CTT TGG- 3' (antisense), 61,2°C, 385bp.
- *clock*: 5'-TCC CGA TTC CAT CCA GTA TGC C- 3' (sense) e 5'-CTG TGC CTG CTG CTG TTG GTG- 3' (antisense), 54,1°C, 221 bp.
- *bmal1*: 5'-TGC CGA GGA AAT CAT GGG AAT C- 3' (sense) e 5'-CGC ATC TGC TTC CAA GAG GCT C- 3' (antisense), 58,4°C; 232bp.

Os números de acesso à base de dados do GenBank são: RPL37a (X14069), *Cry1* (NM_198750), *Cry2* (NM_133405), *Per1* (AB092976), *Per2* (AB016532), *Clock* (NM_021856) e *Bmal1* (AB019258).

3.4 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste “two-way analysis of variance” (two-way ANOVA) e pelo teste “one-way analysis of variance” (one-way ANOVA). No caso da análise bifatorial (two-way ANOVA) o teste de segunda ordem comparando os valores da expressão gênica nos diversos ZTs entre os dois grupos (controle x pinealectomizado) foi feito usando-se como teste de segunda ordem o teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Quando a ANOVA de uma via (one-way ANOVA) apresentou um resultado significativo para os ZTs as séries temporais foram submetidas à análise ritmométrica usando-se o procedimento do ajuste co-senoidal do Cosinor para o período de 24 horas. A ferramenta do Cosinor fornece três parâmetros da curva ajustada: amplitude (medida da magnitude de oscilação da expressão gênica), acrofase (momento diário em que ocorre o valor máximo da variável estudada) e mesor (nível médio de oscilação da variável estudada).

Estes três parâmetros foram comparados por teste t entre os grupos experimentais (controle x pinealectomizado), evidenciando diferença nas características rítmicas das expressões gênicas desses grupos.

Para todos os testes realizados o nível de significância prefixado foi de 95% ($p < 0,05$). Os testes foram realizados mediante o programa Prism, v.5.0 (GraphPad, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Tecido Muscular Estriado Esquelético (Sóleo)

Para a escolha do melhor gene constitutivo a ser utilizado nesse tecido, analisaram-se as variações de cada gene candidato ao longo do tempo e também as variações deste entre os grupos estudados. Dado que o gene *Gapdh* foi o qual apresentou menos variações, este foi o escolhido como constitutivo ideal a ser utilizado nesse tecido.

Os resultados do tecido muscular estriado esquelético possuem $n=4$ para cada ponto ao longo do tempo e por tratamento.

A ANOVA de duas vias não demonstrou nenhuma diferença entre os grupos controle e pinealectomizado para o gene *Bmal1* (figura 1), enquanto que a análise de uma via mostrou que ambos os grupos possuem variação ao longo das 24 horas (CTL, $p=0,0002$; PINX, $p=0,0155$). Os dados, então, foram submetidos à análise do ajuste co-senoidal do Cosinor a fim de determinar se a variação, mostrada pela ANOVA de uma via, é rítmica ou não. Desta forma verificamos que a variação de ambos os grupos são rítmicas (CTL, $p=0,001$; PINX, $p=0,000$) (figura 2), sendo possível de se determinar o mesor, acrofase e amplitude de cada uma das curvas rítmicas e compará-las entre os diferentes grupos onde, nesta análise feita através do teste t de *Student*, notamos que não houve diferenças nessas características rítmicas entre o grupo controle e o pinealectomizado (tabela 1). Portanto, o gene *Bmal1* apresenta ritmicidade que não é alterada pela pinealectomia.

Para o gene *Clock*, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças pontuais entre os grupos controle e pinealectomizado nos ZTs 3 e 6 (figura 3) enquanto que a ANOVA de uma via foi significativa somente para o grupo controle (CTL, $p=0,0032$; PINX, $p=0,9369$) indicando que há variação ao longo das 24 horas somente neste grupo. Os dados desse grupo foram submetidos à análise do Cosinor para verificar se essa variação é rítmica ou não, neste caso, esse grupo possui ritmicidade ($p=0,042$) (figura 4). Portanto, o gene *Clock* possui ritmicidade que é abolida pelo procedimento da pinealectomia.

No caso do gene *Cry1*, não houve diferenças entre os grupos pela ANOVA de duas vias (figura 5). Esses grupos possuem variação ao longo das 24 horas (CTL, $p=0,0003$; PINX, $p=0,0024$), são rítmicos (CTL, $p=0,038$; PINX, $p=0,021$) (figura 6) e são diferentes entre si no

que se refere ao mesor ($p=0,0061$) (tabela 1). Portanto, esse gene possui ritmicidade e a pinealectomia diminui a expressão média desse gene.

O gene *Cry2* (figura 7) possui diferença entre os grupos no ZT3 e variação ao longo das 24 horas somente no grupo controle (CTL, $p=0,0025$; PINX, $p=0,0932$). Essa variação, ao ser analisada pelo Cosinor, não demonstrou ser rítmica ($p=0,210$). Portanto, o gene *Cry2* possui variação ao longo das 24 horas que é abolida pela pinealectomia.

O gene *Per1* possui diferença entre os grupos controle e pinealectomizado no ZT9 (figura 8) e variação ao longo das 24 horas somente no grupo PINX (CTL, $p=0,2953$; PINX, $p=0,0003$). Esta variação, por sua vez, apresentou ser uma ritmicidade ultradiana de 6 horas ($p=0,031$) (figura 9). Desta forma, a pinealectomia originou uma ritmicidade de 6 horas para o gene *Per1*.

Para o gene *Per2* verificamos que houve diferença estatística entre os grupos no ZT21 (figura 10) e variação ao longo das 24 horas em ambos os grupos (CTL, $p=0,0007$; PINX, $p=0,0044$). Essa variação é rítmica para ambos os grupos (CTL, $p=0,009$; PINX, $p=0,000$) (figura 11) e com diferença entre eles no que se refere a acrofase ($p=0,0019$) (tabela 1). Sendo assim, o gene *Per2* possui ritmicidade circadiana e a pinealectomia ocasiona um adiantamento de fase de aproximadamente 3 horas no tecido muscular esquelético.

Em resumo, podemos afirmar que, no tecido muscular estriado esquelético, os genes *Bmal1*, *Clock*, *Per2* e *Cry1* possuem ritmicidade de 24 h enquanto que os genes *Per1* e *Cry2* não possuem ritmicidade de 24 h. A pinealectomia afeta quase todos os genes com exceção do *Bmal1* que permanece inalterado. Dentre as alterações, a pinealectomia ocasiona variações pontuais nos ZTs 3 e 6 e abolição da ritmicidade do gene *Clock*; variação pontual no ZT9 e geração de ritmo ultradiano de 6h para o gene *Per1*; variação pontual no ZT21 e avanço de fase de aproximadamente 3h no gene *Per2*; uma menor expressão média no gene *Cry1*; e variação pontual no ZT3 e abolição da variação temporal de 24 h do gene *Cry2*.

Figura 1: Expressão diária do gene *Bmal1* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido muscular estriado esquelético (sóleo). n= 4. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0.

Figura 2: Cosinor da expressão do gene *Bmal1* dos grupos controle e pinealectomizado do sóleo. As linhas horizontais representam o mesor, as verticais com seta representam a acrofase e o tamanho das setas verticais, a amplitude. Para a diferença entre os grupos: mesor ($p=0,0945$); amplitude ($p=0,2934$); e acrofase ($p=0,3415$).

Figura 3: Expressão diária do gene *Clock* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido muscular estriado esquelético (sóleo). n= 4. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0. * $p < 0,05$.

Figura 4: Cosinor da expressão do gene *Clock* do grupo controle do sóleo. A linha horizontal representa o mesor, a vertical com seta representa a acrofase e o tamanho da seta vertical, a amplitude.

Figura 5: Expressão diária do gene *Cry1* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido muscular estriado esquelético (sóleo). $n = 4$. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0.

Figura 6: Cosinor da expressão do gene *Cry1* dos grupos controle e pinealectomizado do sóleo. As linhas horizontais representam o mesor, as verticais com seta representam a acrofase e o tamanho das setas verticais, a amplitude. Para a diferença entre os grupos: mesor ($p=0,0061$; ** $p<0,01$); amplitude ($p=0,2705$); e acrofase ($p=0,4449$).

Figura 7: Expressão diária do gene *Cry2* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido muscular estriado esquelético (sóleo). n= 4. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0. * $p < 0,05$.

Figura 8: Expressão diária do gene *Per1* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido muscular estriado esquelético (sóleo). n= 4. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0. ** $p < 0,01$.

Figura 9: Cosinor da expressão do gene *Per1* do grupo pinealectomizado do sóleo.

Figura 10: Expressão diária do gene *Per2* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido muscular estriado esquelético (sóleo). n= 4. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0.
*** $p < 0,001$.

Figura 11: Cosinor da expressão do gene *Per2* dos grupos controle e pinealectomizado do sóleo. As linhas horizontais representam o mesor, as verticais com seta representam a acrofase e o tamanho das setas verticais, a amplitude. Para a diferença entre os grupos: mesor ($p=0,0685$); amplitude ($p=0,4330$); e acrofase ($p=0,0019$; ** $p<0,01$).

Tabela 1 - Sumário dos valores do Cosinor e erro padrão do tecido sóleo para o período de 24 horas.

Gene	Controle			Pinealectomizado		
	Acrofase	Mesor	Amplitude	Acrofase	Mesor	Amplitude
<i>Bmal1</i>	23,4±0,6	0,58±0,05	0,43±0,06	23,7±0,4	0,5±0,03	0,39±0,04
<i>Clock</i>	2,5±1,2	1,10±0,06	0,28±0,08	-	-	-
<i>Per 1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Per 2</i>	15,8±0,8	0,66±0,04	0,24±0,05	12,6**±0,5	0,73±0,02	0,23±0,03
<i>Cry 1</i>	20,7±1,1	0,93±0,03	0,14±0,04	20,5±0,9	0,81**±0,03	0,18±0,05
<i>Cry 2</i>	-	-	-	-	-	-

Os genes que não obtiveram significância estatística na análise de variância unifatorial não foram analisados pelo Cosinor. ** $p<0,01$ vs. respectivo controle. (A análise ritmométrica para a expressão do gene *Per1* nos animais PINX apresentou um ritmo de 6 h com significância de $p=0,031$).

4.2 Tecido Hepático

Durante a escolha do melhor gene constitutivo a ser utilizado nesse tecido, constatamos que o gene *Rpl37a* foi o que menos apresentou variações ao longo do tempo e entre os grupos estudados, portanto, este foi o escolhido como gene constitutivo.

Os resultados do tecido hepático possuem n=6 para cada ponto ao longo do tempo e por tratamento.

A ANOVA de duas vias não demonstrou nenhuma diferença entre os grupos controle e pinealectomizado para o gene *Bmal1* (figura 12), enquanto que a análise de uma via mostrou que ambos os grupos possuem variação ao longo das 24 horas (CTL, $p < 0,0001$; PINX, $p < 0,0001$). Os dados, então, foram submetidos à análise do ajuste co-senoidal do Cosinor a fim de determinar se a variação, mostrada pela ANOVA de uma via, é rítmica ou não. Desta forma verificamos que a variação de ambos os grupos são rítmicas (CTL, $p = 0,000$; PINX, $p = 0,000$) (figura 13), sendo possível de se determinar o mesor, acrofase e amplitude de cada uma das curvas rítmicas e compará-las entre os diferentes grupos onde, nesta análise feita através do teste t de *Student*, notamos que não houve diferenças nessas características rítmicas entre o grupo controle e o pinealectomizado (tabela 2). Portanto, o gene *Bmal1* apresenta ritmicidade que não é alterada pela pinealectomia.

Para o gene *Clock*, a ANOVA de duas vias mostrou diferença pontual entre os grupos controle e pinealectomizado no ZT0 (figura 14) enquanto que a ANOVA de uma via foi significativa para ambos os grupos (CTL, $p < 0,0001$; PINX, $p = 0,0006$) indicando que há variação ao longo das 24 horas em ambos. Os dados foram submetidos à análise do Cosinor para verificar se a variação é rítmica ou não, neste caso, somente o grupo pinealectomizado possui ritmicidade (CTL, $p = 0,718$; PINX, $p = 0,041$) (figura 15). Portanto, a pinealectomia origina ritmicidade no gene *Clock*.

No caso do gene *Cry1*, não houve diferenças entre os grupos pela ANOVA de duas vias (figura 16). Esses grupos possuem variação ao longo das 24 horas (CTL, $p < 0,0001$; PINX, $p < 0,0001$), são rítmicos (CTL, $p = 0,003$; PINX, $p = 0,042$) (figura 17) e não são diferentes entre si no que se refere às características rítmicas (tabela 2). Portanto, esse gene possui ritmicidade a qual não é afetada pela pinealectomia.

O gene *Cry2* (figura 18) não possui diferença entre os grupos controle e pinealectomizado. Esses grupos, por sua vez, possuem variação ao longo das 24 horas (CTL, $p < 0,0001$; PINX, $p = 0,0075$). Essas variações, ao serem analisadas pelo Cosinor, demonstraram serem rítmicas (CTL, $p = 0,000$; PINX, $p = 0,011$) (figura 19), porém, sem diferenças entre si no que se refere ao mesor, amplitude e acrofase (tabela 2). Portanto, o gene *Cry2* possui ritmicidade que não é alterada pela pinealectomia.

O gene *Per1* possui diferença entre os grupos controle e pinealectomizado nos ZT0, 6 e 9 (figura 20) e variação ao longo das 24 horas somente no grupo controle (CTL, $p < 0,0001$; PINX, $p = 0,8110$). Esta variação, por sua vez, apresentou ser rítmica ($p = 0,038$) (figura 21). Desta forma, o gene *Per1* possui ritmicidade que é abolida pela pinealectomia.

Para o gene *Per2* verificamos que não há diferença estatística entre os grupos controle e pinealectomizado. Esses grupos possuem variação ao longo das 24 h (CTL, $p < 0,0001$; PINX, $p < 0,0001$) (figura 22), são rítmicos (CTL, $p = 0,006$; PINX, $p = 0,030$) (figura 23), porém, sem diferenças entre si no que se refere às características rítmicas (tabela 2). Sendo assim, o gene *Per2* possui ritmicidade circadiana que não é alterada pela pinealectomia.

Em resumo, podemos afirmar que, no tecido hepático, os genes *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1* e *Cry2* possuem ritmicidade de 24 h enquanto que o gene *Clock* não possui ritmicidade de 24h. A pinealectomia não alterou a ritmicidade dos genes *Bmal1*, *Per2*, *Cry1* e *Cry2*. No gene *Clock*, a pinealectomia ocasionou variação pontual no ZT0 e geração de ritmicidade, enquanto que no gene *Per1* houve variações pontuais nos ZTs 0, 6, e 9 e abolição da ritmicidade.

Figura 12: Expressão diária do gene *Bmal1* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido hepático. n= 6. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0.

Figura 13: Cosinor da expressão do gene *Bmal1* dos grupos controle e pinealectomizado do tecido hepático. As linhas horizontais representam o mesor, as verticais com seta representam a acrofase e o tamanho das setas verticais, a amplitude. Para a diferença entre os grupos: mesor ($p=0,1238$); amplitude ($p=0,2448$); e acrofase ($p=0,4389$).

Figura 14: Expressão diária do gene *Clock* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido hepático. n= 6. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0. ** p<0,01.

Figura 15: Cosinor da expressão do gene *Clock* do grupo pinealectomizado do tecido hepático. A linha horizontal representa o mesor, a vertical com seta representa a acrofase e o tamanho da seta vertical, a amplitude.

Figura 16: Expressão diária do gene *Cry1* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido hepático. n= 6. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0.

Figura 17: Cosinor da expressão do gene *Cry1* dos grupos controle e pinealectomizado do tecido hepático. As linhas horizontais representam o mesor, as verticais com seta representam a acrofase e o tamanho das setas verticais, a amplitude. Para a diferença entre os grupos: mesor ($p=0,4220$); amplitude ($p=0,2490$); e acrofase ($p=0,1575$).

Figura 18: Expressão diária do gene *Cry2* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido hepático. n= 6. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0.

Figura 19: Cosinor da expressão do gene *Cry2* dos grupos controle e pinealectomizado do tecido hepático. As linhas horizontais representam o mesor, as verticais com seta representam a acrofase e o tamanho das setas verticais, a amplitude. Para a diferença entre os grupos: mesor ($p=0,0882$); amplitude ($p=0,0578$); e acrofase ($p=0,4562$).

Figura 20: Expressão diária do gene *Per1* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido hepático. n= 6. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0. * p<0,05; *** p<0,001.

Figura 21: Cosinor da expressão do gene *Per1* do grupo controle do tecido hepático. A linha horizontal representa o mesor, a vertical com seta representa a acrofase e o tamanho da seta vertical, a amplitude.

Figura 22: Expressão diária do gene *Per2* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido hepático. n= 6. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0.

Figura 23: Cosinor da expressão do gene *Per2* dos grupos controle e pinealectomizado do tecido hepático. As linhas horizontais representam o mesor, as verticais com seta representam a acrofase e o tamanho das setas verticais, a amplitude. Para a diferença entre os grupos: mesor ($p=0,3472$); amplitude ($p=0,3530$); e acrofase ($p=0,3438$).

Tabela 2 - Sumário dos valores do Cosinor e erro padrão do tecido hepático para o período de 24 horas.

Gene	Controle			Pinealectomizado		
	Acrofase	Mesor	Amplitude	Acrofase	Mesor	Amplitude
<i>Bmal1</i>	23,1±0,4	0,47±0,03	0,53±0,05	23,0±0,5	0,41±0,04	0,48±0,05
<i>Clock</i>	-	-	-	21,1±1,1	0,96±0,02	0,11±0,03
<i>Per 1</i>	18,1±1,0	0,65±0,02	0,09±0,03	-	-	-
<i>Per 2</i>	15,9±0,7	0,73±0,03	0,24±0,05	16,4±1,0	0,71±0,04	0,21±0,06
<i>Cry 1</i>	18,1±0,6	0,83±0,03	0,24±0,04	19,4±1,1	0,84±0,04	0,19±0,06
<i>Cry 2</i>	14,9±0,4	0,51±0,02	0,21±0,02	15,0±0,8	0,55±0,02	0,15±0,03

Os genes que não obtiveram significância estatística na análise de variância unifatorial não foram analisados pelo Cosinor.

4.3 Tecido Adiposo Periepididimal

No tecido adiposo periepididimal o gene constitutivo escolhido foi o *Rpl37a*, pois este foi o gene com menos variações ao longo do tempo e entre os grupos estudados.

Os resultados desse tecido possuem n=6 para cada ponto ao longo do tempo e por tratamento.

A ANOVA de duas vias não demonstrou nenhuma diferença entre os grupos controle e pinealectomizado para o gene *Bmal1* (figura 24), enquanto que a análise de uma via mostrou que ambos os grupos possuem variação ao longo das 24 horas (CTL, $p<0,0001$; PINX, $p<0,0001$). Os dados, então, foram submetidos à análise do ajuste co-senoidal do Cosinor a fim de determinar se a variação, mostrada pela ANOVA de uma via, é rítmica ou não. Desta forma verificamos que a variação de ambos os grupos são rítmicas (CTL, $p=0,001$; PINX, $p=0,001$) (figura 25), sendo possível de se determinar o mesor, acrofase e amplitude de cada uma das curvas rítmicas e compará-las entre os diferentes grupos onde, nesta análise feita através do teste t de *Student*, notamos que não houve diferenças nessas características rítmicas entre o grupo controle e o pinealectomizado (tabela 3). Portanto, o gene *Bmal1* apresenta ritmicidade que não é alterada pela pinealectomia.

Para o gene *Clock*, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças pontuais entre os grupos controle e pinealectomizado nos ZTs 18 e 21 (figura 26) enquanto que a ANOVA de uma via foi significativa somente no grupo controle (CTL, $p=0,0002$; PINX, $p=0,6830$) indicando que há variação ao longo das 24 horas somente neste grupo. Os dados foram submetidos à análise do Cosinor para verificar se a variação é rítmica ou não, neste caso, o grupo controle possui ritmicidade ($p=0,001$) (figura 27). Portanto, o gene *Clock* possui ritmicidade que é abolida pela pinealectomia.

No caso do gene *Cry1*, houve diferença entre os grupos no ZT18, e ambos os grupos possuem variação ao longo das 24 horas (CTL, $p<0,0001$; PINX, $p<0,0001$) (figura 28), são rítmicos (CTL, $p=0,000$; PINX, $p=0,001$) (figura 29) e são diferentes entre si no que se refere ao mesor ($p=0,0380$) e a amplitude ($p=0,0018$) (tabela 3). Portanto, o gene *Cry1* possui ritmicidade e a pinealectomia aumenta a expressão média e a capacidade de oscilação desse gene.

O gene *Cry2* (figura 30) possuiu diferença entre os grupos controle e pinealectomizado nos ZTs 9, 12 e 21. Esses grupos possuíram variação ao longo das 24 horas (CTL, $p=0,0003$;

PINX, $p < 0,0001$). Essas variações, ao serem analisadas pelo Cosinor, demonstraram serem rítmicas (CTL, $p = 0,004$; PINX, $p = 0,001$) (figura 31) e diferentes entre si no que se refere a amplitude ($p = 0,0481$) e a acrofase ($p < 0,0001$) (tabela 3). Portanto, o gene *Cry2* possui ritmicidade e a pinealectomia aumenta a capacidade de oscilação desse gene e ocasiona um atraso de fase de 11,8 horas na expressão deste.

O gene *Per1* possuiu diferença entre os grupos controle e pinealectomizado no ZT15, (figura 32) e variação ao longo das 24 horas somente no grupo controle (CTL, $p = 0,0001$; PINX, $p = 0,9221$). Esta variação, por sua vez, apresentou ser rítmica ultradiana de 6 horas ($p = 0,000$) (figura 33). Desta forma, o gene *Per1* possui ritmicidade ultradiana que é abolida pela pinealectomia.

Para o gene *Per2* verificamos que houve diferença estatística entre os grupos controle e pinealectomizado no ZT9. Esses grupos possuem variação ao longo das 24h (CTL, $p = 0,0094$; PINX, $p = 0,0001$) (figura 34), são rítmicos (CTL, $p = 0,004$; PINX, $p = 0,003$) (figura 35) e com diferenças entre si no que se refere ao mesor ($p < 0,0001$) e acrofase ($p < 0,0001$) (tabela 3). Sendo assim, o gene *Per2* possui ritmicidade circadiana e a pinealectomia ocasiona uma maior expressão média e um adiantamento de fase de 5 horas desse gene.

Em resumo, podemos afirmar que, no tecido adiposo periepididimal, os genes *Bmal1*, *Clock*, *Per2*, *Cry1* e *Cry2* possuem ritmicidade de 24 h enquanto que o gene *Per1* possui ritmicidade ultradiana de 6h. A pinealectomia ocasionou variação pontual no ZT18, uma maior expressão média e uma maior capacidade de oscilação do gene *Cry1*; variações pontuais nos ZTs 18 e 21 e abolição da ritmicidade do gene *Clock*; variação pontual no ZT15 e abolição da ritmicidade ultradiana de 6 h do gene *Per1*; variações pontuais nos ZTs 9, 12 e 21, uma maior capacidade de oscilação e um atraso de fase de 11,8 horas na expressão do gene *Cry2*; variação pontual no ZT9, uma maior expressão média e um adiantamento de fase de 5 horas do gene *Per2*. O único gene que não foi alterado pela pinealectomia foi o *Bmal1*.

Figura 24: Expressão diária do gene *Bmal1* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido adiposo periepididimal. $n = 6$. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0.

Figura 25: Cosinor da expressão do gene *Bmal1* dos grupos controle e pinealectomizado do tecido adiposo periepididimal. As linhas horizontais representam o mesor, as verticais com seta representam a acrofase e o tamanho das setas verticais, a amplitude. Para a diferença entre os grupos: mesor ($p=0,2177$); amplitude ($p=0,0895$); e acrofase ($p=0,1799$).

Figura 26: Expressão diária do gene *Clock* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido adiposo periepididimal. $n = 6$. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 27: Cosinor da expressão do gene *Clock* do grupo controle do tecido adiposo periepididimal. A linha horizontal representa o mesor, a vertical com seta representa a acrofase e o tamanho da seta vertical, a amplitude.

Figura 28: Expressão diária do gene *Cry1* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido adiposo periepídídimal. $n = 6$. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0. *** $p < 0,001$.

Figura 29: Cosinor da expressão do gene *Cry1* dos grupos controle e pinealectomizado do tecido adiposo periepídídimal. As linhas horizontais representam o mesor, as verticais com seta representam a acrofase e o tamanho das setas verticais, a amplitude. Para a diferença entre os grupos: mesor ($p = 0,0380$; * $p < 0,05$); amplitude ($p = 0,0018$; ** $p < 0,01$); e acrofase ($p = 0,0711$).

Figura 30: Expressão diária do gene *Cry2* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido adiposo periepididimal. $n=6$. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0. *** $p<0,001$.

Figura 31: Cosinor da expressão do gene *Cry2* dos grupos controle e pinealectomizado do tecido adiposo periepididimal. As linhas horizontais representam o mesor, as verticais com seta representam a acrofase e o tamanho das setas verticais, a amplitude. Para a diferença entre os grupos: mesor ($p=0,0882$); amplitude ($p=0,0481$; * $p<0,01$); e acrofase ($p<0,0001$; *** $p<0,001$).

Figura 32: Expressão diária do gene *Per1* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido adiposo periepididimal. n= 6. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0. * p<0,05.

Figura 33: Cosinor da expressão do gene *Per1* do grupo controle do tecido adiposo periepididimal.

Figura 34: Expressão diária do gene *Per2* dos grupos controle e pinealectomizado no tecido adiposo periepididimal. $n=6$. O ponto do ZT 24 é uma repetição do valor medido no ZT 0. *** $p<0,001$.

Figura 35: Cosinor da expressão do gene *Per2* dos grupos controle e pinealectomizado do tecido adiposo periepididimal. As linhas horizontais representam o mesor, as verticais com seta representam a acrofase e o tamanho das setas verticais, a amplitude. Para a diferença entre os grupos: mesor ($p<0,0001$; *** $p<0,001$); amplitude ($p=0,2448$); e acrofase ($p<0,0001$; *** $p<0,001$).

Tabela 3 - Sumário dos valores do Cosinor e erro padrão do tecido adiposo para o período de 24 horas.

Gene	Controle			Pinealectomizado		
	Acrofase	Mesor	Amplitude	Acrofase	Mesor	Amplitude
<i>Bmal1</i>	23,1±0,6	0,63±0,03	0,27±0,04	23,9±0,6	0,59±0,04	0,36±0,05
<i>Clock</i>	21,0±0,5	1,0±0,01	0,09±0,01	-	-	-
<i>Per 1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Per 2</i>	16,9±0,6	0,76±0,01	0,13±0,02	11,9***±0,7	0,94***±0,01	0,11±0,02
<i>Cry 1</i>	20,2±0,3	0,85±0,01	0,16±0,01	19,3±0,5	0,91*±0,03	0,30**±0,04
<i>Cry 2</i>	21,5±0,7	0,93±0,02	0,13±0,02	9,3***±0,5	0,97±0,02	0,18*±0,02

Os genes que não obtiveram significância estatística na análise de variância unifatorial não foram analisados pelo Cosinor. * $p < 0,05$ vs. respectivo controle. ** $p < 0,01$ vs. respectivo controle. *** $p < 0,001$ vs. respectivo controle. (A análise ritmométrica para a expressão do gene *Per1* nos animais CTL apresentou um ritmo de 6h com significância de $p=0,000$).

5 DISCUSSÃO

A análise dos dados do tecido muscular estriado esquelético sóleo nos mostra que o gene *Bmal1* possui variação ao longo das 24 horas, esta variação é rítmica e circadiana e não é perdida nem alterada pela pinealectomia. Entretanto, analisando-se o gene *Clock* verificamos que, apesar deste também possuir variação rítmica e circadiana, a pinealectomia aboli tanto a ritmicidade quanto a variação deste. Os genes *Cry1* e *Per2*, nesse tecido muscular, também possuem variação que é rítmica e circadiana, porém, a pinealectomia causa uma menor expressão média nas 24 horas para o gene *Cry1* e um deslocamento de fase de aproximadamente 3 horas no *Per2*. A pinealectomia também elimina a variação do gene *Cry2* e origina uma variação ultradiana de 6 horas no gene *Per1* nesse tecido. Por outro lado, no tecido hepático, podemos reparar que os genes *Cry1*, *Bmal1*, *Cry2* e *Per2* possuem variações rítmicas circadianas que não são alteradas perante o procedimento de pinealectomia, enquanto que no gene *Clock*, esse procedimento cirúrgico resulta no aparecimento de uma variação circadiana. O gene *Per1*, nesse tecido hepático, possui variação circadiana que desaparece no animal pinealectomizado. Ao analisar o tecido adiposo periepídidimo, verificamos que o gene *Bmal1* possui variação rítmica e circadiana tanto no animal intacto quanto no pinealectomizado, sem alterações entre eles, diferentemente do que se pode observar no gene *Cry1* que obteve uma maior expressão média nas 24 horas e uma maior amplitude no animal operado. A pinealectomia aboli tanto a ritmicidade circadiana do gene *Clock* quanto a ritmicidade ultradiana de 6 horas do *Per1*. Os genes *Cry2* e *Per2* possuem variação rítmica circadiana, porém, a retirada da glândula pineal promove uma maior amplitude e um atraso de fase de aproximadamente 12 horas no gene *Cry2*, enquanto que no gene *Per2* há uma maior expressão média nas 24 horas e um adiantamento de fase de 5 horas.

Como podemos verificar no resumo acima, é notável a regularidade da expressão diária do gene *Bmal1* em todos os tecidos estudados, seja de animais controles, seja de animais pinealectomizados. Em todos, o referido gene apresenta o mesmo perfil com valores baixos no fim do dia, transição para a noite e valores mais altos no fim da noite, transição para o dia. Ressalte-se que esse padrão não se altera de tecido para tecido e não sofre qualquer consequência da retirada da melatonina circulante. Esse dado aponta para o fato de esse gene, nos tecidos periféricos, estar sob um tipo de controle do oscilador mestre do núcleo supraquiasmático, mais rígido, independente da melatonina, como vimos, e dos glicocorticóides adrenais (Balsalobre et al.,

2000; Amir et al., 2010). Esse controle poderia se dar através de inervação autonômica e/ou somática ou por via humoral, dependente de mediadores químicos outros. O esclarecimento desse tipo de controle deve ser motivo de estudos adicionais.

Dessa forma, apesar de estudos com animais transgênicos demonstrarem a grande importância do gene *Bmall* na regulação do metabolismo energético (Ramsey et al., 2007; Rudic et al., 2004; Green et al., 2008; Shimba et al., 2005; Johnston et al., 2009), podemos sugerir que a melatonina circulante não controla a ritmicidade desse gene nos tecidos metabolicamente importantes e, deste modo, sua alteração não contribuiria para a síndrome metabólica do animal pinealectomizado.

A retirada da melatonina circulante, consequência da pinealectomia, provoca uma forte desorganização temporal da expressão diária dos genes relógio da musculatura estriada esquelética, causando desde perda de qualquer variação significativa nas 24 h (*Clock* e *Cry2*), perda de ritmo de 24 h (*Clock*), deslocamento de fase (*Per2*) e até o aparecimento de ritmicidade ultradiana (*Per1*).

Essa desorganização temporal do tecido muscular, em parte, explica a inadequação metabólica da musculatura estriada esquelética observada nos animais pinealectomizados quando submetidos ao treinamento físico (Borges-Silva et al., 2005a, 2005b, 2007) ou em animais diabéticos (que apresentam uma redução de 50% da produção de melatonina) submetidos ao treinamento (Melo et al., 2010; Mendes et al., 2010).

Além disso, essa modificação funcional do metabolismo muscular, resultante da ausência da melatonina, contribui de forma importante para o quadro de resistência insulínica observada no animal pinealectomizado (Lima et al., 1998; Zanquetta et al., 2003), uma vez que a musculatura esquelética é responsável por 75% do consumo de glicose estimulado por insulina (Koistein et al., 2002; Almon et al., 2008).

Diferentemente do observado para a musculatura estriada esquelética, no fígado, a retirada da melatonina provoca, quase que exclusivamente, o desaparecimento da ritmicidade diária na expressão do gene *Per1*.

Neste caso, deve-se lembrar que o fígado recebe e metaboliza tanto a melatonina proveniente da glândula pineal quanto aquela proveniente do trato gastrointestinal (Konturek et al., 2007). Sendo assim, apesar de o fígado do animal pinealectomizado ainda receber a melatonina produzida pelo trato gastrointestinal via sistema porta, não deixando, portanto, este

tecido totalmente desprovido deste hormônio, essa melatonina não tem as mesmas características temporizadoras da melatonina pineal. Como se sabe, a melatonina pineal é produzida exclusivamente à noite, diariamente, impondo aos tecidos um padrão circadiano de regulação e temporização; enquanto que a de origem gastrointestinal tem a sua produção dependente das condições alimentares, variáveis, portanto, com a disponibilidade e a qualidade dos alimentos ingeridos. Assim, dadas as condições particulares do tecido hepático, ganha importância a perda do ritmo diário do gene *Per1*, cuja ritmicidade, portanto, parece depender da flutuação diária da melatonina circulante, proveniente da pineal.

Esse fato, ou seja, a perda do ritmo de um dos genes relógios pertencentes à alça inibidora do ciclo diário de transcrição e tradução gênicas, tem uma importância muito grande para o metabolismo hepático e para a regulação do metabolismo energético como demonstrado por Nogueira et al. (2011). Nesse trabalho, os autores demonstraram, para ratos, que a pinealectomia leva a um aumento da resistência insulínica hepática noturna, levando a uma gliconeogênese acentuada, circadianamente deslocada uma vez que no período do dia de maior disponibilidade de alimento.

No tecido adiposo visceral observou-se que a retirada da melatonina circulante provoca a perda da ritmicidade de 24 h do gene *Clock* e da ritmicidade ultradiana de 6 h do gene *Per1*, o que pode ter provocado as conhecidas alterações metabólicas induzidas no tecido adiposo pela pinealectomia (Alonso-Vale et al., 2004, 2005, 2006).

É interessante notar que a retirada da melatonina provoca uma perda da ritmicidade de 24 h do gene *Clock* tanto no tecido muscular quanto no tecido adiposo, ambos fundamentais para a regulação do metabolismo energético. Sabe-se que, de fato, o gene *Clock* é importante na manutenção da homeostase metabólica, como demonstrado para camundongos transgênicos que apresentam modificações no gene *Clock*. Esses camundongos apresentam uma menor tolerância a glicose e resistência insulínica. Além disso, os machos jovens são hipoglicêmicos e as fêmeas idosas desenvolvem hiperglicemia. Os camundongos mutantes mostram, ainda, um aumento da sensibilidade insulínica, maior concentração sanguínea de triglicérides e uma reduzida gluconeogênese. Apesar dos camundongos *tipo selvagem* apresentarem uma variação diária da homeostase de glucose, esse controle é perdido no camundongo mutante *Clock* (Rudic et al., 2004; Turek et al., 2005; Wijnen e Young, 2006).

É interessante notar que, na musculatura esquelética desses animais, a expressão de mRNA do gene do GLUT4 é reduzida e isto pode limitar a resposta insulínica da glicose pelo músculo esquelético e pode contribuir para uma reduzida tolerância a glicose (Kennaway et al., 2007). Deve-se ressaltar que um dos fatores determinantes da resistência insulínica do animal diabético é a redução da quantidade de GLUT4 nos tecidos musculares estriados e no tecido adiposo que desaparece com a terapêutica de reposição com melatonina (Lima et al., 1998; Zanquetta et al., 2003). Dessa forma, grande parte da síndrome diabetogênica encontrada nos animais pinealectomizados poderia, em parte, ser atribuída à desorganização temporal dos tecidos musculares e adiposo visceral, em parte determinada pela abolição da ritmicidade de 24 h do gene *Clock*.

Em relação ao gene *Per1*, notamos que a pinealectomia também aboli a ritmicidade deste no tecido hepático e no tecido adiposo periepididimal e, ainda, origina uma ritmicidade ultradiana desse gene no músculo esquelético. Em ambos os casos, abolição da ritmicidade e aparecimento de ritmo ultradiano, há a alteração da oscilação fisiológica do gene, pois onde deveria haver um ritmo circadiano, com a pinealectomia passa-se a não ter nem sequer oscilação diária, e onde deveria, fisiologicamente, não ter ritmo e nem oscilação, passa-se a ter um ritmo ultradiano. Todas estas grandes modificações causadas pela ausência da melatonina, por conseguinte, altera a função ao que cada gene está atribuído. Cermakian et al. (2001) analisaram camundongos nocaute para *mPer1* e constataram que, apesar destes animais serem rítmicos, eles apresentam defeitos na atividade rítmica, tais como um menor período, e apresentam, também, defeitos na expressão dos clock genes nos tecidos periféricos, tais como o atraso no declínio de suas expressões durante a noite. Por outro lado, estudos com camundongos nocaute para *mPer2* demonstram que esses animais possuem uma performance locomotora alterada sem alteração da contratilidade muscular e possuem, também, maiores níveis de enzimas glicolíticas do que os animais controle (*wild type*) ou animais nocaute para *mPer1* (Bae et al., 2006), sugerindo que os genes *Per* possuem funções distintas na fisiologia do tecido periférico em mamíferos. Além disso, estudos têm mostrado que, apesar dos camundongos adultos jovens mutantes para os genes *Per* possuírem o mesmo peso corpóreo que o das fêmeas controle, as de meia-idade e mutantes para *Per1* são mais leves do que o grupo controle, enquanto que as mutantes para *Per2* são mais pesadas, indicando-se que os genes *Per1* e *Per2* regulam a taxa metabólica de forma diferente um do outro nas fêmeas idosas (Pilorz e Steinlechner, 2008). No presente caso, como discutido

acima, a abolição da ritmicidade diária do gene *Per1* hepático pode ter sido responsável por este tecido perder a capacidade de regular a glicemia e, conseqüentemente, o metabolismo energético, comutando, diariamente, a via neoglicogênica no período do dia associado ao repouso e consumo das energias acumuladas durante o período de atividade e ingestão energética acentuada.

Observamos também que no tecido muscular estriado esquelético e no tecido adiposo periepídidimo, o gene *Per2* possui variação rítmica tanto no animal controle quanto no pinealectomizado, porém com o diferencial de que no animal operado há um avanço de fase de aproximadamente três horas no tecido muscular e um adiantamento de fase de 5 horas no tecido adiposo ambos em relação à acrofase do controle. Isto indica que a melatonina é sincronizadora desse gene em ambos os tecidos e que, na sua ausência, este gene oscila com um adiantamento de fase de três horas no tecido muscular e de 5 horas no tecido adiposo, o que, certamente, altera a sua sincronização com os outros genes relógio podendo alterar temporalmente a função destes órgãos. Além disso, pesquisas com camundongos nocaute para *Per2* mostram que esses animais possuem ausência do ritmo de alimentação diurna e, apesar da resposta da corticosterona à hipoglicemia estar inalterada, há perda do ritmo de glucocorticóide e desenvolvimento significativo de obesidade (Yang et al., 2009; Froy, 2010).

No tecido muscular estriado esquelético, verificamos que a pinealectomia afeta a expressão dos genes *Crys*, causando uma menor expressão média nas 24 horas no gene *Cry1* e eliminando a variação do gene *Cry2*, enquanto que no tecido adiposo periepídidimo o gene *Cry1* obteve uma maior expressão média nas 24 horas e uma maior amplitude no animal operado, com o gene *Cry2* tendo uma maior amplitude e um atraso de fase de aproximadamente 12 horas ambos no animal pinealectomizado. Torna-se evidente que a eliminação da variação do gene *Cry2* no tecido muscular modifica a função deste gene, pois onde deveria haver uma variação diária, com a ausência da melatonina o gene passa a ter uma expressão praticamente linear ao longo do dia, sem variação. No caso do gene *Cry1*, uma menor expressão média ao longo das 24 horas também pode prejudicar a função deste, pois o ponto de menor expressão pode ser extremamente baixo para que este gene possa exercer a sua função, o mesmo raciocínio torna-se válido para o caso de maior expressão média, onde o ponto de maior expressão pode ser muito alto. A maior amplitude observada no gene *Cry1* no tecido adiposo significa que a diferença entre o ponto de maior e o de menor expressão é maior no animal pinealectomizado.

Estudos envolvendo camundongos com defeitos na proteína *Cry1* ou *Cry2* apresentam, respectivamente, um adiantamento e um atraso na periodicidade de livre-curso da atividade locomotora, e a ausência de ambas as proteínas ocasiona uma série de efeitos, dentre eles está a total perda dessa ritmicidade de livre-curso (Van der Horst et al., 1999), o crescimento corpóreo prejudicado, mudanças nos padrões do hormônio circulante do crescimento, e modificação das expressões das vias lipogênicas e esteroidogênicas (Bur et al., 2009). Por outro lado, camundongos mutados com superexpressão de CRY1 possuem polidipsia, poliúria, hiperglicemia, e taxas elevadas de triglicérides, todos estes são sintomas característicos do diabetes mérito (Okano et al., 2009; Marcheva et al., 2009).

6 CONCLUSÃO

Portanto, os resultados do presente estudo, juntamente com o conjunto de trabalhos acima mencionado, ilustram que a melatonina é importante na ritmicidade dos genes relógio nos tecidos relevantes para o metabolismo energético, e sua ausência ocasiona a desorganização desse sistema rítmico, podendo resultar em alterações das funções metabólicas mais diversas.

REFERÊNCIAS¹

- Albrecht U, Zheng BH, Larkin D, Sun ZS, Lee CC. mPer1 and mPer2 are essential for normal resetting of the circadian *clock*. *J Biol Rhythms*. 2001;16:100-4.
- Almon RR, Yang E, Lai W, Androulakis IP, Ghimbovski S, Hoffman EP, Jusko WP, Dubois DC. Relationships between circadian rhythms and modulation of gene expression by glucocorticoids in skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R1031-R1047.
- Alonso-Vale MI, Borges-Silva CN, Anhe GF, Andreotti S, Machado MA, Cipolla-Neto J, Lima FB. Light/dark cycle-dependent metabolic changes in adipose tissue of pinealectomized rats. *Horm Metab Res*. 2004;36:474-9.
- Alonso-Vale MI, Andreotti S, Peres SB, Anhe GF, Borges-Silva CN, Cipolla-Neto J, Lima FB. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(4):E-805-12.
- Alonso-Vale MI, Andreotti S, Borges-Silva CN, Mukay PY, Cipolla-Neto J, Lima FB. Intermittent and rhythmic exposure to melatonin in primary cultured adipocytes enhances the insulin and dexamethasone effects on leptin expression. *J Pineal Res*. 2006;41(1):28-34.
- Anhê GF, Caperuto LC, Pereira da Silva M, Souza LC, Hirata AE, Velloso AL, Cipolla-Neto J, Carvalho CR. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. *J Neurochem*. 2004;90(3):559-66.
- Bae K, Lee K, Seo Y, Lee H, Kim D, Choi I. Differential effects of two period genes on the physiology and proteomic profiles of mouse anterior tibialis muscles. *Mol Cells*. 2006;22(3):275-84.
- Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*. 2000;289(5488):2344-7.
- Borges-Silva CN, Fonseca-Alaniz MH, Alonso-Vale MI, Takada J, Andreotti S, Peres SB, Cipolla-Neto JC, Pithon-Curi TC, Lima FB. Reduced lipolysis and increased lipogenesis in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. *J Pineal Res*. 2005a;39(2):178-84.

¹ De acordo com:

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

Borges-Silva CN, Alonso-Vale MI, Franzoi-de-Moraes SM, Takada J, Peres SB, Andreotti S, Skorupa AL, Cipolla-Neto J, Pithon-Curi TC, Lima FB. Pinealectomy impairs adipose tissue adaptability to exercise in rats. *J Pineal Res.* 2005b;38(4):278-83.

Borges-Silva CN, Takada J, Alonso-Vale MI, Peres SB, Fonseca-Alaniz MH, Andreotti S, Cipolla-Neto J, Pithon-Curi TC, Lima FB. Pinealectomy reduces hepatic and muscular glycogen content and attenuates aerobic power adaptability in trained rats. *J Pineal Res.* 2007;43(1):96-103.

Bunger MK, Walisser JA, Sullivan R, Manley PA, Moran SM, Kalscheur VL, Colman RJ, Bradfield CA. Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the *Mop3/Bmal 11* locus. *Genesis.* 2005;41:122-32.

Bur IM, Cohen-Solal AM, Carmignac D, Abecassis PY, Chauvet N, Martin AO, Van der Horst GT, Robinson IC, Maurel P, Mollard P, Bonnefont X. The circadian clock components *cry1* and *cry2* are necessary to sustain sex dimorphism in mouse liver metabolism. *J Biol Chem.* 2009;284(14):9066-73.

Cermakian N, Monaco L, Pando MP, Dierich A, Sassone-Corsi P. Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the period 1 gene. *Embo J.* 2001;20(15):3967-74.

Dunlap JC. Common threads in eukaryotic circadian systems. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8:400-6.

Dunlap JC, Loros JJ, Liu Y, Crosthwaite SK. Eukaryotic circadian systems: cycles in common. *Genes Cells.* 1999;4:1-10.

Froy O. Metabolism and circadian rhythms - implications for obesity. *Endocr Rev.* 2010;31:1-24.

Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the *CLOCK* protein in the mammalian circadian mechanism. *Science.* 1998;280:1564-9.

Green CB, Takahashi JS, Bass J. The meter of metabolism. *Cell.* 2008;143(5):728-42.

Ha E, Yim SV, Chung JH, Yoon KS, Kang I, Cho YH, Baik HH. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. *J Pineal Res.* 2006;41:67-72.

Hoffman RA, Reiter RJ. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. *Anat Rec.* 1965;153:19-21.

Hogenesch JB, Gu YZ, Jain SJ, Bradfield CA. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:5474-9.

Isobe Y, Nishino H. Signal transmission from the suprachiasmatic nucleus to the pineal gland via the paraventricular nucleus: analysed from arg-vasopressin peptide, rPer2 mRNA and AVP mRNA changes and pineal AA-NAT mRNA after the melatonin injection during light and dark periods. *Brain Res*. 2004;1013:204-11.

Johnston JD, Frost G, Otway DT. Adipose tissue, adipocytes and the circadian timing system. *Obes Rev*. 2009;10:52-60.

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;293:r1528-r37.

Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian *clock*. *Human Molecular Genetics*. 2006;15(2):R271-R7.

Kohsaka A, Bass J. A sense of time: how molecular *clocks* organize metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2007;18(1):4-11.

Koistein HA, Zierath JR. Regulation of glucose transport in human skeletal muscle. *Ann Med*. 2002;34:410-8.

Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Pawlik M, Sliwowski Z, Czesnikiewicz M, Kwiecien S, Brzozowski T, Bubenik GA, Pawlik WW. Localization and biological activities of melatonin in intact and diseased gastrointestinal tract (GIT). *J Physiol Pharmacol*. 2007;58(3):381-405.

Lima FB, Matsushita DH, Hell NS, Dolnikoff MS, Okamoto MM, Cipolla-Neto J. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food intake, time of the day and melatonin. *Brazilian J Med Biol Res*. 1994;27(4):995-1000.

Lima FB, Machado UF, Bartol I, Seraphim PM, Sumida DH, Moraes SM, Hell NS, Okamoto MM, Saad MJ, Carvalho CR, Cipolla-Neto J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol*. 1998;275:E934-E41.

Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:407-41.

Marcheva B, Ramsey KM, Affinati A, Bass J. Clock genes and metabolic disease. *J Appl Physiol*. 2009;107(5):1638-46.

Melo RM, Hirabara SM, Lopes AMS, Buonfiglio DC, Amaral FG, Cipolla-Neto J. Efeitos da suplementação com melatonina e do treinamento físico aeróbio sobre o quadro clínico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. *Brazilian Archives of Endocrinology and Metabolism*. 2010(Suppl 2):S142.

Mendes C, Melo RM, Peres R, Taneda M, Ferreira RFD, Cipolla-Neto J. Efeitos da suplementação com melatonina e do treinamento físico aeróbio sobre a produção de melatonina em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. *Brazilian Archives of Endocrinology and Metabolism*. 2010(Suppl 2):S142-3.

Nogueira TCA, Lellis-Santos C, Jesus DS, Taneda M, Rodrigues SC, Amaral FG, Lopes AMS, Cipolla-Neto J, Bordin S, Anê GF. Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response. *Endocrinology*. 2011;152(4):1253-63.

Nonaka H, Emoto N, Ikeda K, Fukuya H, Rohman MS, Raharjo SB, Yagita K, Okamura H, Yokoyama M. Angiotensin II induces circadian gene expression of *clock* genes in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2001;104:1746-8.

Oishi K, Murai I, Sakamoto K, Otsuka H, Miyake Y, Nagase T, Ishida N. The pineal gland is not essential for circadian expression of rat period homologue (*rper2*) mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Brain Res*. 2000;885:298-302.

Okano S, Akashi M, Hayasaka K, Nakajima O. Unusual circadian locomotor activity and pathophysiology in mutant *cry1* transgenic mice. *Neurosci Lett*. 2009;451(3):246-51.

Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, Cipolla-Neto J. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. *J Pineal Res*. 2002;33:172-7.

Pilorz V, Steinlechner S. Low reproductive success in *per1* and *per2* mutant mouse females due to accelerated ageing. *Reproduction*. 2008;135:559-68.

Ralph MR, Hurd MW. Pacemaker interactions in the mammalian circadian system. *Braz J Med Biol Res*. 1996;29:77-85.

Ramsey KM, Marcheva B, Kohsaka A, Bass J. The clockwork of metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:219-40.

Reiter RJ. The Melatonin Rhythm - Both A *Clock* and A Calendar. *Experientia*. 1993;49:654-64.

Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, Fitzgerald GA. *BMAL1* and *CLOCK*, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *Plos Biol*. 2004;2(11):1893-9.

Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng BH, Kume K, Lee CC, Van der Horst GTJ, Hastings MH, Reppert SM. Interacting molecular loops in the mammalian circadian *clock*. *Science*. 2000;288:1013-9.

Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M, Wada T, Aoyagi T, Tezuka M. Brain and muscle arnt-like protein-1 (*bmal1*), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:12071-6.

Stehle JH, Gall CV, Korf HW. Melatonin: A *Clock*-Output, A *Clock*-Input. *J Neuroendocrinol*. 2003;15:383-9.

Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia*. 1989;45:922-32.

Takahashi JS. Finding new *clock* components: past and future. *J Biol Rhythms*. 2004;19:339-47.

Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian *clock* mutant mice. *Science*. 2005;308:1043-5.

Van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, De Wit J, Verkerk A, Eker AP, Van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. Mammalian *cry1* and *cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*. 1999;398(6728):627-30.

Wijnen H, Young MW. Interplay of circadian *clocks* and metabolic rhythms. *Annu Rev Genet*. 2006;40:409-48.

Wuarin J, Schibler U. Expression of the Liver-Enriched Transcriptional Activator Protein Dbp Follows A Stringent Circadian-Rhythm. *Cell*. 1990;63:1257-66.

Yamaguchi S, Mitsui S, Yan LL, Yagita K, Miyake S, Okamura H. Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol*. 2000;20:4773-81.

Yang S, Liu A, Weidenhammer A, Cooksey RC, McClain D, Kim MK, Aguilera G, Abel ED, Chung JH. The role of *mper2* clock gene in glucocorticoid and feeding rhythms. *Endocrinology*. 2009;150(5):2153-60.

Young ME, Wilson CR, Razeghi P, Guthrie PH, Taegtmeier H. Alterations of the circadian *clock* in the heart by streptozotocin-induced diabetes. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:223-31.

Zanquetta MM, Seraphim PM, Sumida DH, Cipolla-Neto J, Machado UF. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving *glut4* gene expression and its translocation to the plasma membrane. *J Pineal Res*. 2003;35(3):141-8.