UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Aspectos Bioquímicos da
Biossíntese de Pigmentos Carotenóides
em *Gonyaulax polyedra* (Dinophyceae)**

Heloísa Candia Hollnagel

TESE DE DOUTORADO

**Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto
Co-Orientador: Prof. Dr. Paolo Di Mascio**

**São Paulo
2000**

"Aspectos Bioquímicos da Biossíntese de Pigmentos
Carotenóides em *Gonyaulax polyedra* (Dinophyceae)".

HELOÍSA CANDIA HOLLNAGEL

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau
de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Prof. Dr. PIO COLEPICCOLO NETO
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. MARIO JOSÉ POLITI
IQ - USP

Profa. Dra. MARIA TERESA MACHINI DE MIRANDA
IQ - USP

Prof. Dr. ROLF ROLAND WEBER
IO - USP

Prof. Dr. EDISON JOSÉ DE PAULA
IB - USP

SÃO PAULO
04 DE AGOSTO DE 2000.

"We see in nature not words,
but rather only the first letters of words,
and if we then wish to read, we discover
that the new so-called words
are again merely first letters of others".

GEORG CHRISTOPH LICHTENBERG

**Dedico este trabalho à Erika e ao Christian,
pois não é fácil ter uma mãe cientista.**

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química do Instituto de Química da USP pelas excelentes condições de trabalho;

Ao Prof. Pio Colepicolo Neto pela orientação, amizade e apoio em todos os momentos do meu doutorado;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro;

Ao Prof. Paolo Di Mascio pelas críticas e sugestões;

Ao Prof. Dr. David Morse, da Universidade de Montreal pela colaboração científica;

À Prof. Dra. Marie Anne Van Sluys, do Instituto de Biociências pelo DNA Total de *Arabidopsis thaliana*;

Aos amigos e colegas Alcely Strutz Barroso, Claudia Gadini Stingher, Daniela Sankiewicz, Ednailson Pereira de Carvalho, Ernani Pinto Jr., Euclides Matheucci Jr., Máisa Pereira Lima Brigagão, Marcelo Paes de Barros, Mariana Cabral de Oliveira, Oswaldo Keith Okamoto, Patricia de Fátima Lopes, Sandra Regina de Souza, Thereza Cristina Kutner, Valdemir Melechco Carvalho e Wilton José Rocha Lima pela ajuda e companheirismo decisivos para realização deste trabalho;

À Cristina Hernandez Ros, Cynthia Sayuri Bando e Viviane Ferreira Campos Bando pelos momentos inesquecíveis;

À amiga Cristina Sayuri Asano por uma década de amizade incondicional;

À Lindinalva Pereira de Carvalho, pelas horas extras;

À minha família, especialmente meus pais Ennio e Susana, pela dedicação;

Ao Mario, meu marido, por ser aquele que me completa.

ABREVIATURAS

AbPCP: anticorpo policlonal contra PCP
AbRuII: anticorpo policlonal contra RuBisCo forma II
ADP/ATP: adenosina bisfosfato/ trifosfato
bp: pares de bases
BSA: albumina sérica bovina
C: C Aten: claro constante atenuado em 30%
C: C: claro constante
C: E: claro:escuro
cab: "chlorophylla/b binding protein"
ccg: "clock-controlled genes"
CCTR: "circadian-controlled translational regulator"
cél: células
CRE; "clock responsive element"
CT: "circadian time" -tempo circadiano
CTAB: hexadecil trimetil brometo de amônio
DDT: ditiotreitol
DEPC: dietil pirocarbonato
EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA: ácido etilenoglicol bis (β - éter aminometílico) *N,N,N',N'*-tetracético
EROs: espécie reativa de oxigênio
FRQ: "frequency" - proteína ligada ao relógio biológico caracterizada em *Neurospora*
GAPDH: enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GIT: isotiocianato de guanidina
h: hora
HPLC: cromatografia líquida de alta performance
IgG: imunoglobulina G
Kb: Kilo bases
KDa: Kilo Daltons
LB: meio de cultura Luria-Broth
LBP: "luciferin binding protein"
LHC: "light-harvesting complex protein"
LRE: "light responsive element"
min: minutos
MOPS: 3-(*N*-morfolino) ácido propano-sulfônico
NR: enzima nitrato redutase
NSQ: núcleo supraquiasmático
O₂(¹Δg): oxigênio singlete
ORF: "Open Reading Frame"
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS: tampão fosfato salino
PCP: complexo peridina-clorofila *a*-proteína
PCR: "polymerase chain reaction"
PER: "period"- proteína ligada ao relógio biológico caracterizada em *Drosophila*
PIPES: piperazina- *N,N'*bis(2 etano ácido sulfônico)
PSI: fotossistema I
PSII: fotossistema II
psy: (gene/ enzima) fitoeno sintase
PVDF: difluoreto de polivinilidina
PVP: polivinil pirrolidona
RNAm: ácido ribonucleico mensageiro
Ru II: enzima ribulose- 1,5 –bifosfato carboxilase/oxigenase forma II
RuBisCo: enzima ribulose- 1,5 –bifosfato carboxilase/oxigenase
RuBP: ribulose-1,5-bifosfato
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
SOD: enzima superóxido dismutase

TBE: tampão Tris-borato-EDTA
TBS-T: tampão salino Tris –Tween
TE: tampão Tris-EDTA
TEMED: *N,N,N',N'*-tetrametil-etilenodiamina
TIM; “timeless”- proteína ligada ao relógio biológico caracterizada em *Drosophila*
Tris: tris(hidroxi metil) amino metano
TWEEN: monolaurato polioxietilenosorbitan
UV: luz ultravioleta
wc-: “white collar”- mutante incolor de *Neurospora crassa*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ritmos Biológicos	12
1.2 A Alga Marinha Unicelular <i>Gonyaulax polyedra</i>	20
1.3 Espécies Reativas de Oxigênio e os Antioxidantes	31
1.4 Biossíntese de Carotenóides	39
1.5 Influência da Luz e o Papel dos Fotorreceptores	45
1.6 Fotossíntese	46

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA TESE 51

3. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes	52
3.1 Cultivo de <i>Gonyaulax polyedra</i>	54
3.1.1 Variação Circadiana de Pigmentos, RuBisCo II e PCP	55
3.1.2 Diferentes Irradiações	56
3.1.3 Indução da Síntese de Pigmentos em Células do Escuro	58
3.1.4 Indução à formação de Cistos	59
3.2 Análise por HPLC	
3.2.1 Extração de Pigmentos Totais	59
3.2.2 Condições Cromatográficas	60
3.3 Supressão de $O_2(^1\Delta g)$ por Carotenóides de <i>G. polyedra in vitro</i>	
3.3.1 Extração de Pigmentos Carotenóides	61
3.3.2 Teste da Oxidação do Rubreno	61
3.4 Southern Blots	
3.4.1 Extração de DNA genômico	63
3.4.2 Obtenção da sonda <i>psyAra17</i>	64
3.4.3 Slot-Blots	67
3.4.4 Gel de Agarose/Transferência/ Hibridação	67
3.4.5 Análise das Sequências de Fitoeno Sintase	69
3.4.6 Síntese de “primers” degenerados-PCR	72
3.5 Northern Blots	
3.5.1 Extração de RNA total	74

3.5.2	Obtenção da sonda <i>Rull</i>	75
3.5.3	Gel de Formaldeído/ Transferência/ Hibridação	77
3.6	Western Blots	
3.6.1	Obtenção de Extrato Bruto Protéico	78
3.6.2	SDS-PAGE/ Transferência para Membrana PVDF	78
3.6.3	Utilização de Anticorpos Policlonais	79
4.	RESULTADOS	
4.1	Análises por HPLC	81
4.1.1	Variação Circadiana nas diferentes Irradiações	83
4.1.2	Indução da Síntese de Pigmentos em Células do Escuro	88
4.1.3	Quantificação dos Pigmentos em Cistos	93
4.2	Supressão de $O_2(^1\Delta g)$ por Carotenóides de <i>G. polyedra in vitro</i>	96
4.3	Slot-Blots	98
4.4	Southern Blots	100
4.5	Northern Blots	102
4.6	Western Blots	104
5.	DISCUSSÃO	
5.1	Variação Circadiana nas diferentes Irradiações	109
5.2	Indução da Síntese de Pigmentos em Células do Escuro	113
5.3	Quantificação dos Pigmentos em Cistos	116
5.4	Supressão de $O_2(^1\Delta g)$ por Carotenóides de <i>G. polyedra in vitro</i>	119
5.5	Slot-Blots, Southern Blots e PCR – Aspectos moleculares	120
5.6	Northern Blots	121
5.7	Western Blots	123
6.	CONCLUSÕES	127
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

RESUMO

O dinoflagelado unicelular marinho fotossintetizante *Gonyaulax polyedra* tem sido utilizado como modelo para o estudo de relógios biológicos. Neste organismo já foram descritos os ritmos de: migração vertical, divisão celular, atividade de superóxido dismutase e nitrato redutase, bioluminescência e capacidade fotossintética. Investigamos a variação circadiana dos pigmentos carotenóides e de RuBisCo II e PCP, as quais estão intimamente ligadas ao processo fotossintético.

Experimentos de supressão de espécies reativas de oxigênio (EROs) por carotenóides foram preparados e mostraram que extratos de carotenóides de *G. polyedra* são capazes de suprimir o $O_2(^1\Delta g)$ (oxigênio singlete) *in vitro* confirmando o importante papel destes no controle das EROs nestas algas.

Os extratos metanólicos apresentaram vários pigmentos, tais como clorofila *a*, β -caroteno e peridinina em diferentes concentrações. A peridinina representa 80 % do total de carotenóides enquanto que o β -caroteno somente 4%. As análises dos cromatogramas de HPLC mostraram que a razão peridinina/clorofila *a* não varia ao longo de 24 h porém, por outro lado, o β -caroteno apresenta uma variação significativa na sua quantidade, com níveis duas vezes maiores no meio do dia em comparação com os níveis no meio da noite. Esta variação é conservada mesmo quando as células são mantidas em condições de luz constante.

A curva de dose-resposta para a síntese de β -caroteno induzida pela luz mostra uma resposta linear com 45 minutos de exposição à luz branca. A indução é máxima quando utilizamos as células do meio período da noite (CT 18) que após esta exposição apresentam níveis de β -caroteno semelhantes as células do meio do dia. Esta alteração de fase no CT 18 sugere que este pigmento pode ser um dos compostos-captadores de luz envolvidos no mecanismo de ajuste de fase por luz em *G. polyedra*.

Culturas de *G. polyedra* do meio da noite foram expostas à diferentes irradiações (azul, vermelha e verde) e os seus pigmentos extraídos e

analisados. Em outra série de experimentos, as células foram mantidas durante o período de claro (12: 12 h) sob diferentes irradiações (vermelha, verde e azul) por 36 horas e os seus pigmentos analisados. Os resultados sugerem que a síntese foto-induzida e a oscilação circadiana do β -caroteno estão ligadas a um fotorreceptor de luz azul/ verde. Nas condições utilizadas não foram observadas variações significativas no conteúdo protéico da RuBisCo II e da PCP ao longo do dia. As análises de RNA total da RuBisCo II mostram que não há variação nos seus níveis quando as células são coletadas no meio do dia e no meio da noite.

Quando expostas a condições adversas, *G. polyedra* apresenta a capacidade de encistar. Embora se conheça bem este mecanismo de defesa, existem poucas informações sobre o estado fisiológico destas células. Células encistadas induzidas por dias curtos apresentam uma alteração na composição de pigmentos com diminuição nas quantidades de β -caroteno e de clorofila *a* e aumento da quantidade de peridinina, indicando um rearranjo do aparato fotossintético nesta situação, com a peridinina desempenhando um papel mais estrutural. Em consequência, embora o conteúdo protéico de RuBisCo permaneça inalterado, os níveis protéicos de PCP se encontram diminuídos nas células encistadas.

SUMMARY

Gonyaulax polyedra, a marine dinoflagellate which has been used as a model to study the biological clock, displays numerous circadian processes, such as bioluminescence, cell aggregation, cell division, superoxide dismutase and nitrate reductase activities and photosynthesis. In this alga, the photosynthesis is maximal in the middle of the day and minimal in the middle of the night. We investigated the pigments content and the amounts of two proteins related to the photosynthesis: ribulose- 1,5- bisphosphate carboxylase/ oxygenase form II (RuBisCo II) and peridinin: chlorophyll a: protein (PCP) in a 24 h cycle.

Using the thermal decomposition of 1,4-dimethylnaphtalene endoperoxide, it was shown that the carotenoids could act as effective quenchers of singlet oxygen in *G. polyedra*.

G. polyedra pigments were extracted every three hours over 24 hours. The amounts of peridinin and chlorophyll a remain constant over the day while the levels of β -carotene oscillate, being two times higher at the day than at the night phase. This variation persists when the cells were kept under constant dim light.

The dose-response curve for light-induced β -carotene synthesis showed a linear response up to 45 minutes of light exposure, after which night-phase cells contained the same levels of β -carotene as day-phase cells. Cells exposed to light pulses at different times displays the highest β -carotene induction in the middle of the night. This may suggest that β -carotene may be one of the light-harvesting compounds involved in the light induced phase-shift in *G. polyedra*.

To identify which was the photoreceptor involved in β -carotene synthesis, cell of the middle of the night-phase (CT 18) were exposed for 45 minutes to different irradiations (red, blue and green) and their pigments extracted and analysed. Also, cells were grown under red, blue and green light during the light phase (12 h light: 12 h dark) for 36 hours and their pigments

analysed. The results suggested that the circadian oscillation and the photo-induced response synthesis of β -carotene, are related to a blue light receptor.

The amounts of RuBisCo II and PCP do not change over the circadian cycle when the cultures were grown under constant dim light. The levels of these proteins also remain constant when cells were kept under either white light or different light qualities (red, blue and green) in light: dark (12: 12 h) regime.

The *G. polyedra* RuBisCo form II transcripts levels are the same in middle-day and middle-night cells, suggesting a post-translational control for this enzyme in this organism.

Adverse environmental conditions elicit the encystment of *G. polyedra*. Our results showed an alteration in pigment composition of cysts. An increase in peridinin levels and a decrease in β -carotene and chlorophyll *a* content were observed. Although RuBisCo form II protein levels remained constant, there was a reduction in the amounts of PCP in cysts. This suggests an important role in thylakoids structure stabilizer for free peridinin.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ritmos Biológicos

Os ritmos biológicos podem ser definidos como oscilações expressas por organismos vivos com frequências definidas. Estes ritmos podem estar relacionados às variações geofísicas, pois, as divisões de tempo astronômicas tais como dia, fases da lua ou ano podem ser consideradas, ecologicamente, compartimentos temporais. A mudança dia-noite é o sinal mais importante para o sistema circadiano (*circa*, próximo – *dies*, dia) nos organismos. Embora os ritmos circadianos (~ 24 h) sejam os mais estudados devido a facilidade de seu monitoramento, existem ritmos maiores e menores que 24 h já descritos como podemos visualizar na tabela 1.

Além dos ritmos biológicos sofrerem a influência dos fenômenos astrofísicos, eles também podem ser definidos como endógenos. Ou seja, um organismo pode ter um ritmo biológico, cuja regulação depende exclusivamente de suas necessidades fisiológicas. Nesse sentido, o ritmo biológico endógeno é característico em um determinado organismo e seus mecanismos de expressão podem ser estudados independentemente. Segundo Kippert (1985) o ritmo circadiano de vários ciclos endógenos evoluiu concomitantemente com ciclos de claro-escuro. Portanto, a capacidade de um organismo preparar-se para este evento (antecipar) constitui uma vantagem adaptativa na evolução dos organismos procariotos e eucariotos. A maneira mais simples de se obter tal resultado, seria o desenvolvimento de um mecanismo capaz de detectar diretamente a presença ou ausência de luz, através de fotorreceptores. No entanto, os organismos desenvolveram um sofisticado relógio biológico para controlar esta regulação temporal endógena.

Tab. 1: Exemplos de ritmos e ciclos com períodos mais curtos (ultra) iguais (circa) e mais longos (infra) que 24 horas (extraído e modificado de Hastings *et al.*, 1991).

Ultradianos	
Batimentos flagelares de espermatozóides	0,01 segundos
Ondas cerebrais	0,1 segundos
Batimentos cardíacos	1 segundo
Respiração humana	5 segundos
Batimento de asas de <i>Drosophila</i> (corte nupcial)	1 minuto
Ciclos celulares	20 minutos-horas
Marés	12,6 horas
Circadianos	
Bioluminescência em <i>Gonyaulax</i>	22,5 horas
Migração vertical <i>Gonyaulax</i>	24 horas
Síntese RNA m gene <i>frq</i> em <i>Neurospora</i>	22 horas
Corticosterona na corrente sanguínea	24 horas
Temperatura corpórea	24 horas
Movimento das folhas de <i>Phaseolus</i> (feijão)	23,5 horas
Abertura de flores de <i>Kalanchoe</i>	22,8 horas
Infradianos	
Ciclos estrais em ratas	4-5 dias
Semi-lunar	14,8 dias
Ciclos menstruais em primatas	28 dias
Lunar	29,5 dias
Encistamento em dinoflagelados	365 dias

O valor adaptativo dos relógios biológicos no tempo, relacionados com as variações geofísicas, é tão importante que estes são considerados essenciais para a sobrevivência e evolução das espécies, uma vez que o ajuste da organização temporal interna com a ritmicidade ambiental proporciona economia energética aos seres vivos. Estes ritmos são expressos em situações variadas, como a época de migração de pássaros, peixes e mamíferos (baleias); a floração de plantas; a divisão celular; a excreção renal de vários componentes; a susceptibilidade à infecção por microorganismos, entre outros (Johnson & Hastings, 1986).

Têm sido demonstrado que alguns procariontes e todos os organismos eucariotos, incluindo os humanos, possuem um relógio biológico interno cuja função fundamental é controlar o período do dia no qual os diferentes processos acontecem (Wever, 1979; Johnson & Hastings, 1986), sendo capaz de ser influenciado e sincronizado por fatores ambientais. Além dos ciclos de claro: escuro, o relógio biológico sofre influência de variações na temperatura, capaz de compensar este efeito alterando ligeiramente a frequência dos marcapassos circadianos (Johnson & Hastings, 1986). O estudo dos relógios biológicos, em especial o circadiano, iniciou-se como uma mera curiosidade biológica, derivando para uma área com enormes implicações para a medicina clínica. Várias terapias farmacológicas com drogas e radiação, bem como cirurgias invasivas, têm demonstrado influências marcantes da variação do dia (Moore-Ede *et al.*, 1982; Moore-Ede, 1983).

A autonomia do relógio biológico pode ser constatada quando organismos são mantidos em condições de "livre curso" (por exemplo, luz constante). Nestes casos os organismos apesar de não sofrerem quaisquer influências dos ciclos geofísicos, continuam exibindo ciclos regulares de suas atividades fisiológicas por longos períodos de tempo (Sulzman *et al.*, 1982 e 1984; Morse *et al.*, 1990).

Uma das características mais surpreendentes do relógio biológico está relacionada ao fenômeno denominado "phase-shift" (troca de fase), o qual consiste na habilidade de um organismo de acertar o seu relógio interno em relação ao tempo por influência de pulsos de luz ou drogas (Broda *et al.*,

1989). Acredita-se que a troca de fase parece estar envolvida no mecanismo central de temporização, portanto estudos moleculares dos fatores que causam alteração de fase representam uma abordagem importante para o entendimento do marcapasso (temporizador) do organismo.

No ambiente natural, os ritmos diários são condicionados a períodos de 24 h por uma repetitiva alternância de claro e escuro. As diferentes intensidades de luz alimentam um oscilador endógeno circadiano, o qual diretamente sincroniza temporalmente vários processos bioquímicos e fisiológicos. Tal condicionamento temporal ocorre quando a luz, de alguma maneira, troca a fase do oscilador, causando então uma troca de fase do ritmo. A intensidade e direção da troca dependem exclusivamente da fase na qual a luz é aplicada. Preparando-se gráficos da intensidade da troca contra a fase na qual pulsos de luz são incididos, geralmente durante o período de escuro, produz-se a chamada curva de resposta de fase. Os organismos, em geral, têm a capacidade de alterar suas fases. Isto é devido a pulsos de luz serem aplicados em determinados momentos, nos quais os fotorreceptores celulares estejam preparados para captar os fótons de luz e transduzir o sinal ao oscilador.

Em muitos organismos estudados, um simples e pequeno pulso de luz no início do período de escuro, acarreta em um atraso de fase em relação ao ciclo normal; já um pulso de luz a partir do meio da noite resulta em um adiantamento de fase. Este atraso de fase no início da noite seria explicado como uma preparação do organismo para um período de escuro, já o adiantamento seria a preparação do organismo para um período diurno (Hastings, 1991).

A luz pode sincronizar ou induzir um ritmo. Segundo Schmidt (1987), pulsos de luz em determinados períodos do dia podem de alguma maneira sincronizar ou modificar algumas atividades fisiológicas. A sincronização de um ritmo é verificada pelo reajuste de fase, e, na maioria dos casos, a luz azul e a luz vermelha desempenham um papel importante. Não está claro até este momento, se a atuação da luz ocorre diretamente sobre o relógio biológico ou se através de fotorreceptores que traduzem a mensagem temporal para o relógio.

Nos mamíferos, o núcleo supraquiasmático (NSQ) foi descrito como responsável pelo controle de vários processos metabólicos como o controle de temperatura, o ciclo de sono vigília, a função renal, a divisão celular e a liberação de hormônios entre outros (Golombeck *et al.*, 1997). A quantidade dos hormônios cortisol, prolactina, corticosterona, do crescimento, prostaglandina, testosterona e melatonina na corrente sanguínea variam ao longo de 24 h.

A síntese de melatonina (principal hormônio temporal) à partir do triptofano ocorre, principalmente, na glândula pineal. Esta se inicia com a captação do triptofano pelos pinealócitos convertendo-o em 5-hidroxitriptofano (5-HT) e serotonina. A conversão de 5-HT em melatonina envolve a atividade de duas enzimas: serotonina *n*-acetil transferase (NAT), considerada a etapa limitante da biossíntese de melatonina, e a hidroxindol-O-metil transferase (HIOMT). Golombeck *et al.* (1997) demonstraram uma resposta bioquímica imediata da atividade destas enzimas à luz ambiental, com maior atividade na fase de escuro. No dinoflagelado marinho *G. polyedra*, a melatonina é produzida em concentrações algumas vezes maiores que na glândula pineal, exibindo um ritmo de expressão cujo máximo é pronunciadamente noturno (Hardeland *et al.*, 1995). Segundo Binkley (1993) a melatonina tem um papel determinante como sinalizador químico “do escuro” nos organismos, sendo uma fonte importante de informação em ciclos circadianos e anuais.

O relógio biológico está associado com várias desordens temporais, chamadas genericamente de cronopatologias. As depressões devido às prolongadas estações do ano com baixa luminosidade nos países nórdicos, têm sido tratadas pela exposição dos pacientes à luz branca intensa (acima de 2500 lux) em diferentes períodos do dia (Lewy *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 1997). Outro exemplo de cronopatologia é o “jet lag”, experimentado por pessoas que realizam vôos transmeridianos. Estas pessoas apresentam desorganização temporal interna e dificuldade de adaptação que podem afetar o humor, o sono e os sistemas digestivo e cardiovascular. Analogamente, existem estudos com trabalhadores noturnos de fábricas e hospitais demonstrando variabilidade na produtividade, maior incidência de erros, respostas mais lentas e quando a desorganização temporal é cronicamente

mantida, pode acarretar em uma menor expectativa de vida para estes indivíduos (Moreno *et al.*, 1997).

Contudo, a natureza química do relógio circadiano, mais especificamente a identidade e a organização dos componentes moleculares envolvidos na geração e o acerto dos processos rítmicos diários, permanecem como um dos aspectos desconhecidos dentro da biologia (Johnson & Hastings, 1986; Hastings & Schweiger, 1976; Roennenberg & Morse, 1994).

A literatura têm mostrado que o relógio biológico é capaz de regular a expressão de proteínas nos níveis de (i) transcrição, (ii) processamento de RNAm, (iii) tradução e (iv) pós-tradução ou endereçamento de proteínas, como mostra a figura 1 (extraída de Marques *et al.*, 1997).

Fig. 1. A regulação do relógio biológico pode ser associada à diferentes níveis de controle (Extraído de Marques *et al.*, 1997).

Dentre os mecanismos chamados não-transcricionais, existe uma variedade de opções de controle. Em alguns casos, a modulação da estabilidade do transcrito, os eventos de modificações cíclicas (como fosforilações reguladas pelo ciclo celular) e a expressão rítmica de proteases controlariam a quantidade de determinadas proteínas durante o ciclo circadiano (Sassone-Corsi, 1994). Segundo Hastings (1983), o controle no nível de tradução também pode estar relacionado à biossíntese de fatores de tradução.

As investigações envolvendo os componentes centrais do relógio biológico estão mais avançadas em espécies nas quais foram identificados mutantes de período como *Neurospora crassa* e *Drosophila melanogaster*. Estudos sobre os mecanismos do relógio biológico nestes organismos (*N. crassa* e *D. melanogaster*) demonstraram que o mecanismo central de oscilação envolve um controle de retro-alimentação negativa onde a transcrição é inibida como resultado do acúmulo da proteína correspondente (Dunlap, 1996).

Na mosca de fruta *D. melanogaster* foram descobertos dois *loci* necessários para a produção de ritmos circadianos: *per* ("period") e *tim* ("timeless"). Mutações em qualquer um destes *locus* podem eliminar a ritmicidade ou alterar o período do ritmo (Price *et al.*, 1995). Konopka & Benzer (1971) identificaram três mutantes de ritmo de eclosão nesta espécie: o mutante arrítmico *per⁰*; o mutante de período longo *per^L* (28 h) e o mutante de período curto *per^S* (19 horas). Os mutantes *tim* não apresentam ritmicidade circadiana na transcrição de *per*, nem o transporte de *per* para o núcleo (Price *et al.*, 1995). Foi verificado por estes autores que as proteínas PER e TIM interagem fisicamente, e esta associação é necessária para que ocorra o controle da fosforilação e o transporte de PER para o núcleo. A localização de PER no núcleo, por sua vez irá resultar na supressão da transcrição de *per* e *tim* (Price *et al.*, 1995).

No fungo *N. crassa* observa-se uma alteração da periodicidade dos padrões de maturação sexual dos conídios, expressando ritmos circadianos de crescimento. Dos seis *loci* gênicos envolvidos no controle temporal, o mais

estudado é o gene *frequency* (*frq*) localizado no cromossomo VII (Crosthwaite *et al.*, 1995). Os genes ligados ao relógio biológico *wc-2* (“white-collar”-mutante incolor) e *frq* em *Neurospora* satisfazem os critérios básicos propostos para componentes do oscilador circadiano (Dunlap *et al.*, 199; Crosthwaite *et al.*, 1997). Além da sua própria transcrição, a proteína FRQ de *N. crassa*, ativa a transcrição de outros genes (*ccg1*, *ccg2* e *cab*- “clock controlled genes”).

Em *Arabidopsis thaliana* foi verificado que existe um elemento responsivo ao relógio (CRE) que se liga ao promotor da enzima ribulose-1,5-bifosfatase carboxilase oxigenase ativase, regulando a sua transcrição circadianamente (Liu *et al.*, 1996). Nesta mesma planta (Millar *et al.*, 1995 e 1997), e em *Chlamydomonas reinhardtii* (Jacobshagen *et al.*, 1996) foi demonstrado que a transcrição do gene *cab* está sob o controle do relógio biológico. É interessante ressaltar que o relógio biológico pode manter o ciclo circadiano, mesmo em organismos onde a divisão celular ocorre em um tempo menor que 24 horas. Kondo *et al.* (1997) verificaram a transcrição circadiana de vários genes em *Synechococcus* sp, apesar destas células se dividirem à cada 10 horas.

É claro que quanto maior a complexidade de um organismo, maior a dificuldade de estudar os componentes celulares responsáveis pelo acerto do relógio biológico. Portanto, organismos eucariotos unicelulares tais como amebas, *Acetabularia*, *Chlorella* e outras microalgas são excelentes modelos de estudo.

1.2 A alga marinha unicelular *Gonyaulax polyedra*

G. polyedra (recentemente este dinoflagelado foi classificado como *Lingulodinium polyedra* -Vernet *et al.*, 1996) é uma alga unicelular marinha fotossintética, que juntamente com outros organismos é responsável pelo fenômeno de “maré vermelha” nos oceanos. *G. polyedra* é um dinoflagelado holófito, medindo aproximadamente 40 µm de diâmetro.

Os dinoflagelados possuem muitas características distintas quando comparados a outros organismos eucariotos. Spector (1984) observou que ao

fotografar secções celulares destas células em microscópio eletrônico, o DNA nuclear estava arranjado em um grande número de cromossomos permanentemente condensados. Estes aspectos morfológicos do núcleo são semelhantes aos nucleóides bacterianos. Além desta semelhança, existe também a ausência de histonas nos dinoflagelados, e, portanto, o seu DNA não pode ser arranjado em nucleossomos. Entretanto, foram detectadas proteínas básicas não-histônicas em quantidades semelhantes às encontradas em bactérias. Uma outra característica morfológica não-usual em dinoflagelados é a grande quantidade de DNA. Em *G. polyedra*, por exemplo, Holm-Hansen (1969) encontrou aproximadamente 200 pg de DNA por núcleo, praticamente 60 vezes mais do que é encontrado em um núcleo de célula haplóide humana (3,2 pg).

Os cloroplastos de dinoflagelados diferem de outros plastídeos por possuírem três membranas. Recentemente, Zhang *et al.* (1999a) mostraram que apesar da origem comum a outros plastídeos, estes adotaram uma arquitetura genômica ímpar, na qual cada gene possui o seu próprio mini-círculo, isto é, os cloroplastos de dinoflagelados contêm um grupo pequeno de moléculas semelhantes à plasmídeos, cada um carregando um gene que codifica para uma proteína ou um RNAr. Estes autores descobriram que todos os mini-círculos em uma dada espécie de dinoflagelados possuem uma região repetitiva que mantém a identidade entre estes círculos. Zhang *et al.* (1999a) sugerem que esta região contenha a origem de replicação e auxilie na segregação destes círculos durante a divisão do cloroplasto.

Outras características ultraestruturais típicas de *G. polyedra* são: o núcleo em forma de “C” contendo os cromossomos condensados; a presença de tricocistos (agregados protéicos); corpos multivesiculares; “scintillons” (organelas que emitem luz); grande parte da célula ocupada por cloroplastos, e uma teca elaborada. Os cloroplastos possuem uma forma reticular e ainda não se sabe se são constituídos por várias organelas que se comunicam ou por um único cloroplasto com várias ramificações (Behrmann & Hardeland, 1995). Dois tipos de cloroplastos ou regiões de cloroplastos com características surpreendentemente particulares são encontradas nas células mastigotas. Na periferia destas células, são encontrados cloroplastos mais

compactos, contendo lamelas com dois ou três tilacóides e pouca distância interlamelar. A medida que avançamos para o interior da células, os plastídeos apresentam menos lamelas e predominantemente dois tilacóides (Schmitter, 1971). Os cloroplastos de células mastigotas exibem ritmicidade circadiana com respeito a sua topologia e distribuição intracelular (Rensing *et al.*, 1980). Durante o período de luz, os cloroplastos da periferia apresentam-se compactados, enquanto os da região central estão expandidos. Esta estrutura expandida desaparece durante o período noturno, e na metade da noite somente cloroplastos do tipo compacto são observados. Grânulos de amido estão presentes durante o dia e nas primeiras horas do período escuro. Estes grânulos não estão ligados à membrana e não foi encontrada nenhuma associação com os cloroplastos ou outras organelas (Schmitter, 1971). Behrmann & Hardeland (1995) descreveram recentemente as mudanças ultraestruturais que ocorrem em formas císticas de *G. polyedra*. Os cistos deste dinoflagelado apresentam cloroplastos compactados, perda de parte dos “scintillons”, presença de grânulos de amido e vacúolos lipídicos e redução no número de tricocistos.

Fritz *et al.* (1989), empregando microscopia eletrônica, descreveram com detalhes o ciclo de vida de *Gonyaulax tamarensis* (figura 2). Estes autores concluíram que apesar da maior parte da reprodução em dinoflagelados ocorrer através da divisão mitótica de células vegetativas, a reprodução sexual que ocorre eventualmente é de extrema importância. Além dos benefícios conhecidos da recombinação gênica, ela propicia a formação de cistos, os quais podem auxiliar na dispersão da espécie, iniciar a floração em casos favoráveis e garantir a sobrevivência em situações desfavoráveis. A reprodução sexual no gênero *Gonyaulax* envolve a formação de gametas móveis, os quais fundem-se para formar um zigoto móvel (planozigoto). O planozigoto (presumivelmente diplóide) nada durante alguns dias até perder a sua mobilidade e transformar-se em um cisto de paredes espessas, o hipnozigoto. Esta transição ocorre quando o planozigoto perde seus flagelos e deposita-se no fundo da coluna d’água (Von Stosch, 1973). Como no caso de outros dinoflagelados onde a formação do hipnozigoto foi observada, este estágio constitui a fase de dormência no ciclo de vida. Sob condições normais

de cultivo, o período de encistamento pode variar de 12 horas até meses, dependendo da espécie. Em *G. tamarensis*, com o excistamento (“desencistamento”) surge uma célula, provavelmente ainda diplóide, denominada planomeiocito. Esta célula (plameiocito) divide-se relativamente rápido e dentro de 24 horas após o excistamento, a primeira divisão produz duas células. Ao final de mais um dia, quatro células estão presentes, semelhantes à célula vegetativa em tamanho e forma (Anderson *et al.*, 1984).

Fig. 2. Ciclo de vida do gênero *Gonyaulax*. Da célula vegetativa central (forma mastigota) podem ser visualizados três ciclos possíveis. Ciclo A: divisão mitótica; ciclo B: formação de cistos temporários; ciclo C: reprodução sexual com a formação de gametas móveis, sua fusão e a produção de um zigoto com quatro flagelos, e, em sequência a formação de um zigoto imóvel (cisto) e o excistamento, regenerando um zigoto móvel. Divisões deste zigoto, produzem células vegetativas (Extraído de Fritz *et al.*, 1989).

Como abordado anteriormente, o processo de encistamento (temporário ou não) em dinoflagelados representa uma condição adaptativa para escapar de condições adversas. Em *G. polyedra*, este pode ser desencadeado por vários sinais, tais como: dias-curtos (Balzer & Hardeland, 1991; 1992), baixas temperaturas (Hardeland, 1994); estresse mecânico ou químico (Wolf *et al.*, 1994; Okamoto *et al.*, 1998). Quando as células mastigotas (vegetativas) são colocadas em regime de dias curtos (10 h de claro: 14 h de escuro) e à temperatura de 15 °C, observa-se após 4 dias encistamento de 100% das células. Apesar do modo como as células são induzidas ao encistamento, existem etapas essenciais. Estas são: retração do protoplasto, perda do flagelo, ruptura e liberação da teca, e, formação de uma parede celular característica de cistos. Estas características morfológicas podem ser observadas “*in vivo*” sob microscópio ótico (Fig. 3). O encistamento de *G. polyedra* pode ocorrer inclusive durante a divisão celular, indicando a importância e a dominância deste processo morfogênico (Behrmann & Hardeland, 1995). Segundo estes autores o encistamento é acompanhado de uma reorganização de organelas e estruturas celulares.

Gonyaulax polyedra

A

B

Fig. 3 Morfologia das células mastigotas (A) e encistadas (B) de *G. polyedra*. As células foram fotografadas sob microscópio de Epifluorescência (Diaphot-tmd, Nikon). Aumento de 40 X.

Os cistos induzidos por dias curtos e temperatura de 15 °C apresentam principalmente cloroplastos do tipo compacto. As lamelas consistem de dois ou três tilacóides. Plastídeos expandidos ocorrem somente ocasionalmente e não se expandem para o interior da célula. Como resultado, os plastídeos ocupam somente uma pequena área da célula. A estrutura dos cloroplastos de cistos induzidos por dias curtos assemelha-se a de células mastigotas do período do escuro. Além disso as células encistadas apresentam uma maior quantidade de grânulos de amido e vacúolos lipídicos, o que também é típico para células mastigotas durante a maior parte do período escuro (Schmitter, 1971; Rensing *et al.*, 1980). A presença de produtos de estocagem em células encistadas permite que estas sobrevivam às condições adversas.

Hardeland & Rodriguez (1995) verificaram que na forma cística de *G. polyedra* a quantidade de melatonina é aumentada. Estes autores sugerem que a melatonina desempenhe um papel muito importante como supressora de espécies reativas de oxigênio neste organismo.

Como dito anteriormente, o dinoflagelado *G. polyedra* é frequentemente utilizado como modelo de investigação de ritmos biológicos. Este organismo apresenta muitos ritmos circadianos já descritos. Entre estes podemos citar: a divisão celular (Sweeney e Hastings, 1958; Chisholm, 1981), a migração vertical na coluna d'água e o padrão de agregação (Roenneberg *et al.*, 1989), a bioluminescência (Hastings & Dunlap, 1986), a capacidade fotossintética (Prézelin *et al.*, 1977; Hastings *et al.*, 1961) a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (Colepicolo *et al.*, 1992; Asano *et al.*, 1995) e da nitrato redutase (Ramalho *et al.*, 1995) entre outros (figura 4).

Fig. 4. Expressão das atividades circadianas em *G. polyedra*.

O processo de divisão celular em *G. polyedra* é rítmico (Sweeney e Hastings, 1958) e o trabalho de Chisholm (1981) mostrou que este processo está restrito a 5 h durante a transição entre claro-escuro e que o intervalo das divisões está próximo de 24 h. Além destes, o dinoflagelado *G. polyedra* exibe uma migração vertical, na qual as células estão na superfície das águas durante o dia, migrando para o fundo à noite, e um padrão de agregação diurnos capazes de persistir por várias semanas mesmo em livre curso (Roenneberg *et al.*, 1989).

A bioluminescência neste dinoflagelado ocorre de dois modos ("flash" e "glow") e ambos exibindo ritmicidade diária (Hastings & Dunlap, 1986). Estes autores observaram a emissão de luz que se segue após estimulação mecânica- "flash"- é máxima na metade da noite e mínima durante o dia. O outro tipo de emissão denominado "glow", consiste de uma emissão espontânea que ocorre no final do período de escuro. Os componentes da reação de bioluminescência estão localizados em organelas denominadas "scintillons". Estas organelas exibem ritmicidade circadiana nos processos de síntese, compactação e degradação (Johnson *et al.*, 1985).

Morse *et al.* (1989) demonstraram que a capacidade para emitir bioluminescência de *G. polyedra* estava relacionada com a presença de componentes bioquímicos envolvidos nesta reação: a enzima luciferase, seu substrato a luciferina e uma proteína que se complexa à luciferina e a mantém no estado reduzido, denominada LBP ("luciferin binding protein"). Esta reação ocorre a partir da ação da enzima luciferase sobre o seu substrato, a luciferina. Contudo, a ligação de uma outra proteína à luciferina (LBP) determina se esta enzima terá ou não acesso ao substrato. Milos *et al.* (1990) demonstraram que, embora a expressão de LBP seja rítmica, os níveis de RNAm que a codificam permanecem constantes no período de 24 h, sugerindo que o controle não seja transcricional. Recentemente Mittag (1996) demonstrou que a regulação da expressão da LBP ocorre na tradução. Estes resultados mostraram uma proteína repressora, controlada pelo relógio biológico que se liga à região 3' do RNAm da LBP, impedindo a sua tradução. A atividade de ligação desta proteína também apresenta variação circadiana.

Em *G. polyedra* a capacidade fotossintética varia ao longo do dia, sendo máxima no meio da fase de claro e mínima no meio da fase escura (Prézelin *et al.*, 1977; Hastings *et al.*, 1961). Este ritmo persiste mesmo em condições de livre curso (sob luz atenuada) (Prézelin & Ley, 1980). A capacidade fotossintética de *G. polyedra* está sob controle do oscilador circadiano, cujo período e fase podem ser alterados por inibidores de fotossíntese (Roennenberg & Morse, 1993). O fluxo de elétrons através dos dois fotossistemas em *G. polyedra* é rítmico (Samuelsson, 1984 em Loneran, 1984). Isto indica que a coordenação dos dois fotossistemas e a cadeia de transporte de elétrons interconectada envolvida no fluxo não-cíclico de elétrons, é controlada em parte pelo relógio biológico (Loneran, 1984). Segundo Samuelsson (1984), a atividade do PSI não é rítmica, mas a atividade do PSII oscila e parece ser a responsável pelo ritmo fotossintético observado em *G. polyedra*.

Em *G. polyedra* foram descritas duas enzimas cuja atividade máxima ocorre durante o dia, próxima do máximo de atividade fotossintética: a enzima superóxido dismutase (SOD) (Colepicolo *et al.*, 1992; Asano *et al.*, 1996), e, a nitrato redutase (Ramalho *et al.*, 1995). Estes dados sugerem uma interação dos mecanismos metabólicos com a maior atividade celular diurna e, portanto, à temporização pelo relógio biológico.

As enzimas SOD catalizam a conversão de superóxido ($O_2^{\cdot -}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (McCord & Fridovich, 1968) e estão agrupadas em classes de acordo com os metais presentes no sítio ativo. Asano *et al.* (1995) mostraram que existem três isoformas da enzima SOD em *G. polyedra* (MnSOD, FeSOD e CuZnSOD), e que os níveis protéicos das isoformas MnSOD e FeSOD e a atividade específica total variam circadianamente com período de aproximadamente 22 h. Estes autores observaram que a acrofase de atividade de SOD coincide com a acrofase da capacidade fotossintética (meio do dia), corroborando a hipótese da função de fotoproteção exercida pela FeSOD (presente nos cloroplastos) nos tilacóides, durante os horários de maior produção de O_2 .

A assimilação de nitrato constitui o principal meio de obtenção de nitrogênio para a biossíntese de constituintes celulares em algas. Este nitrato

presente no ecossistema marinho deve ser reduzido primeiramente a nitrito e então à amônia ou a amina para ser utilizado pelas células. A enzima que catalisa a passagem de nitrato à nitrito é a nitrato redutase (NR), considerada a etapa limitante do processo de assimilação de nitrogênio. Em *G. polyedra*, Ramalho *et al.* (1995) verificaram que a atividade da NR exibe um padrão circadiano endógeno, com atividade quatro vezes maior durante o dia.

Roenenberg & Morse (1993) sugeriram que exista pelo menos dois osciladores independentes em *G. polyedra*, um controlando o ritmo da bioluminescência e outro o ritmo de agregação das células. Posteriormente, Morse *et al.* (1996) demonstraram que a síntese protéica em *G. polyedra* pode ser iniciada em três horários distintos. Embora publicações recentes defendam a existência de mais de um relógio biológico em uma única célula, a comunidade científica ainda discute a validade desta hipótese, bem como a função de cada relógio.

1.3 Espécies Reativas de Oxigênio e os Antioxidantes

Embora o oxigênio molecular seja essencial para a sobrevivência dos organismos aeróbicos através da fosforilação oxidativa, na qual o oxigênio é reduzido a água por quatro elétrons, os sub-produtos formados decorrentes do metabolismo aeróbico são tóxicos. Tais espécies semi-reduzidas são chamadas genericamente de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Sies, 1986; Cadenas, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1991). Estas espécies semi-reduzidas e altamente reativas compreendem entre outros o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), oxigênio singlete [$O_2(^1\Delta g)$] e radicais alcóxila ($HRO^{\bullet}$) e peróxila ($HROO^{\bullet}$).

Sabe-se que o oxigênio molecular possui dois elétrons não pareados em orbitais degenerados π^* anti ligante, estando portanto, no estado tripleto. O “spin” destes elétrons possui o mesmo valor quântico de momento magnético. Isto faz com que para ocupar o espaço vacante de seu orbital, o oxigênio molecular somente reaja com moléculas possuidoras de “spins” paralelos.

Como a grande maioria das moléculas possui elétrons de “spins” invertidos (não-paralelos), isto explicaria a baixa reatividade do oxigênio molecular quando em solução. Esta restrição de “spin” torna, portanto, difícil a reação entre o oxigênio molecular e outras moléculas. Vários autores têm proposto uma redução parcial do oxigênio para explicar a sua reatividade e geração de outros derivados. Nishinaga (1977) propôs que a excitação eletrônica do oxigênio molecular, com a inversão do “spin” geraria $O_2(^1\Delta g)$. As reações de transferência de apenas um elétron por vez pode originar as espécies $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $OH^\bullet$, como mostrado abaixo:

Redução do oxigênio molecular através da adição de um elétron.

Allen *et al.* (1972), propõem a formação de $O_2(^1\Delta g)$ pela redução de H_2O_2 por superóxido. O oxigênio singlete, uma vez gerado, pode produzir o seu estado triplete, por desativação, como observa-se a seguir:

Geração de oxigênio singlete a partir da dismutação espontânea do ânion superóxido (Allen *et al.*, 1972)

Kellog & Fridovich (1975), baseados na reação de Harber-Weiss, cogitam a hipótese de formação do $O_2(^1\Delta g)$, na presença de Fe^{2+} , como exemplificado abaixo:

Reação de Harber-Weiss com produção de oxigênio singlete e radical hidroxil (Kellog & Fridovich, 1975).

Krinsky (1984) discute amplamente a geração biológica e fotobiológica de $\text{O}_2(^1\Delta\text{g})$, reportando outras fontes, tais como: a formação de oxigênio singlete a partir de radicais peroxil e reação do hipoclorito com peróxido de hidrogênio em neutrófilos. O íon hipoclorito (OCl^-) é gerado por enzimas como as mieloperoxidases (proteínas mais abundantes em neutrófilos) a partir de Cl^- e H_2O_2 . O OCl^- é um oxidante muito potente que pode causar lesões nas células e que, reagindo com H_2O_2 pode produzir o $\text{O}_2(^1\Delta\text{g})$, que participa do seu sistema bactericida. Mesmo uma simples acidificação do OCl^- pode gerar oxigênio singlete (Khan *et al.*, 1992). Em alguns casos, portanto, a geração de EROs em um organismo pode ser benéfica. Os macrófagos e neutrófilos, sob determinados estímulos, são capazes de liberar grandes quantidades de EROs nos focos inflamatórios para combater os microorganismos invasores. Esta produção em larga escala é resultante da ativação de uma enzima de membrana, a NAD(P)H-oxidase, que é estimulada por: fagocitose, interações celulares mediadas por anticorpos, ácidos graxos insaturados, ésteres de forbol e retinóides (Brigagão & Colepicolo, 1996; Rabadji *et al.*, 1996).

Devido a sua alta reatividade, as EROs são conhecidas pelos seus efeitos deletérios sobre os tecidos celulares pela sua capacidade de reagir e oxidar biomoléculas fundamentais como os lipídeos de membrana, proteínas, clorofila (organismos fotossintéticos) e DNA, provocando a perda de suas funções biológicas (Halliwell & Gutteridge, 1999). Para contornar este problema, os seres vivos desenvolveram mecanismos de proteção contra as EROs, que podem ser *via* reações enzimáticas ou por compostos de baixo peso molecular. As enzimas responsáveis pelo controle das EROs nas células estão descritas nas seguintes reações:

Proteção enzimática contra as EROs.

A enzima superóxido dismutase (SOD) é específica para a remoção catalítica do radical superóxido, como mostra a reação (A) acima. A isoforma mais abundante desta enzima é a que contém os metais cobre e zinco (CuZnSOD) e está presente em todas as células eucariontes e, inclusive, em algumas bactérias (Halliwell & Gutteridge, 1999). As formas mais comuns de SOD encontradas em bactérias são a MnSOD e a FeSOD. A MnSOD também está presente nas mitocôndrias de células eucariontes e a outra isoforma que contém Fe também foi encontrada em algas e plantas superiores, e está localizada nos cloroplastos (Halliwell & Gutteridge, 1999).

As catalases e as peroxidases são enzimas envolvidas na remoção do H_2O_2 das células (reações B, C e D). A enzima glutational peroxidase tem como substrato a glutational, composto tiólico de baixo peso molecular, encontrado na maioria dos organismos em altas concentrações (10^{-3} moles por litro). Esta enzima está presente em animais, algas e fungos, mas é geralmente ausente em bactérias e plantas superiores. Em animais a catalase encontra-se amplamente distribuída em todos os tecidos e órgãos, mas sua localização intracelular limita-se aos peroxissomos. Em plantas, além dos peroxissomos, a catalase está localizada nos glioxissomos e nas mitocôndrias. Uma enzima importante encontrada nos cloroplastos de plantas é a enzima ascorbato peroxidase, cujo papel principal parece ser a remoção do H_2O_2 formado durante a reação de Mehler (Willekens *et al.*, 1997).

Devido ao grande número de EROs produzidas fotoquimicamente, existem vários sistemas de desativação das mesmas, presentes no cloroplasto.

Estes sistemas anti-oxidantes incluem além dos sistemas enzimáticos, compostos como ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E, ácido úrico, melatonina e carotenóides (Asada & Takahashi, 1987; Hardeland & Rodriguez, 1995; Krinsky, 1989).

Segundo Halliwell & Gutteridge (1999) um dos compostos mais importantes na manutenção dos níveis intracelulares de EROs é o ácido ascórbico. Esta molécula reage com o HO• resultando em radical ascorbil (vit C•) e íon hidróxido (OH⁻).

Existem experimentos comprovando a redução dos níveis de O₂(¹Δg) e HO• pela vitamina E, evitando assim a lipoperoxidação de membranas biológicas e danos ao DNA, e que ácido úrico é um potente supressor de radicais peroxila (RO₂•), O₂(¹Δg) e HO• (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A melatonina é produzida pela glândula pineal e vários órgãos extrapineais em vertebrados, mas também é encontrada em invertebrados, angiospermas e organismos unicelulares. Em mamíferos, a melatonina é responsável por várias respostas humorais, mas também é um poderoso supressor de EROs. Foi demonstrado recentemente que a melatonina tem a capacidade de terminar reações de EROs iniciadas por fotooxidantes, RO₂•, ou HO• (revisão em Hardeland & Rodriguez, 1995).

Os carotenóides reagem com O₂(¹Δg) e/ou impedem a sua formação por reagirem com o estado triplete da clorofila (Krinsky, 1979; Krinsky, 1989). Os carotenóides são moléculas essencialmente hidrofóbicas encontradas normalmente associadas às membranas. Dentro da categoria dos carotenóides, encontram-se os carotenos, constituídos por cadeias longas de carbono e hidrogênio (com ligações duplas conjugadas) e as xantofilas, que são cadeias longas de hidrocarbono com a presença de oxigênio (figura. 5)

Fig. 5. Carotenóides presentes na alga marinha *G. polyedra*, segundo Liaaen-Jensen (1978). β -caroteno (caroteno), diatoxantina, diadinoxantina, dinoxantina e peridinina (xantofilas).

A descoberta por Foote *et al.* (1970) de que os carotenóides poderiam captar o $O_2(^1\Delta g)$ foi um importante avanço no entendimento da eficiência dos carotenóides em evitar o dano fotooxidativo em sistemas biológicos (Krinsky, 1989). Quando a luz atinge um sistema biológico que contém um sensibilizador apropriado (S), como no caso a clorofila, este sensibilizador é excitado ao seu primeiro estado de excitação singlete (1S) o qual pode sofrer uma transformação para o estado triplete excitado meta-estável (3S), como na reação abaixo (1):

Os sensibilizadores no estado triplete podem iniciar reações fotossensíveis do Tipo I e do Tipo II. Na reação do Tipo I, o sensibilizador excitado no estado triplete inicia reações de radicais pela abstração de elétrons ou hidrogênio das moléculas vizinhas, criando, portanto EROs. No Tipo II, o sensibilizador excitado no estado triplete reage com oxigênio no estado fundamental, formando o $O_2(^1\Delta g)$, que é altamente reativo, como mostra a reação (2):

O mecanismo através do qual os pigmentos carotenóides protegem os sistemas biológicos contra os danos devido ao $O_2(^1\Delta g)$ consiste na supressão física da energia proveniente da molécula de oxigênio excitada. A reação de supressão física envolve a transferência da energia de excitação do $O_2(^1\Delta g)$ ao carotenóide, resultando na formação do carotenóide triplete, como mostra a reação (3). Então, em uma reação subsequente (4) a energia de excitação é dissipada sem causar danos através de interações vibracionais e rotacionais

entre o carotenóide triplete e o solvente, regenerando a molécula de carotenóide original.

Deste modo, os pigmentos carotenóides atuam de maneira catalítica na neutralização do potencial oxidativo da molécula de $\text{O}_2(^1\Delta\text{g})$ (Foote *et al.*, 1970; Krinsky, 1989) e assim, funcionando diretamente como anti-oxidante prevenindo de forma eficaz as reações oxidativas, que eventualmente possam ocorrer nos cloroplastos.

As xantofilas, carotenóides com oxigênio, possuem um papel muito importante no controle das EROs através de um mecanismo conhecido como "ciclo das xantofilas". Este "ciclo das xantofilas" envolve reações dirigidas pela luz, a qual transforma xantofilas contendo um grupo epoxi em outras sem o grupo epoxi. Em plantas superiores e algas verdes, os pigmentos envolvidos neste ciclo são violaxantina, anteraxantina e zeaxantina (Buch, 1995). Em dinoflagelados como *G. polyedra*, o carotenóide correspondente na formação do complexo carotenóide:clorofila:proteína é a peridinina (Knoetzel & Rensing, 1990a), que é a correspondente nesta alga à violaxantina de plantas superiores. A formação da zeaxantina ajudaria no processo de fotoproteção da clorofila e aparato fotossintético. No fitoplâncton ocorre uma reação equivalente de epoxidação/ de-epoxidação com os pigmentos diadinoxantina e diatoxantina, que estão presentes em dinoflagelados (Liaaen-Jensen, 1978).

1.4 Biossíntese de Carotenóides

Em 1831, Wackenroder propôs o termo caroteno ao descrever o pigmento que ele havia isolado e cristalizado à partir de cenouras. Berzelius (1837) denominou xantofila, o pigmento amarelo isolado de folhas senescentes. Tswett, reconhecendo a natureza química semelhante dos compostos chamados de carotenos e xantofilas, criou a designação “carotenóides” em 1911, englobando as duas classes de pigmentos (Armstrong & Hearst, 1996).

Os pigmentos carotenóides ocorrem amplamente distribuídos na natureza, são encontrados em bactérias fotossintéticas e não fotossintéticas, algas, fungos, leveduras, pássaros, insetos, crustáceos e peixes. A maior parte dos carotenóides é composto de um esqueleto linear de hidrocarbonetos (C_{40}) contendo uma série de ligações duplas conjugadas (entre 3 e 15). O esqueleto é construído à partir de oito unidades isoprenóides C_5 . Os carotenóides contendo unicamente carbono e hidrogênio são chamados carotenos. Os carotenos podem ser lineares, como por exemplo o licopeno, ou com compostos aromáticos, como o β -caroteno. Os carotenóides que além de carbono e hidrogênio contém também grupos funcionais com oxigênio, tais como os grupos hidroxil, metoxil, oxo ou epoxil; aldeídos ou ácidos carboxílicos, são chamados de xantofilas. Os carotenóides também existem na forma de ésteres ou glicosídeos.

O número de duplas ligações conjugadas nos polienos é responsável pela cor característica e espectro de absorção dos carotenóides. Todos estes absorvem fortemente a luz visível, e em alguns casos, próximo a região ultravioleta do espectro. O espectro de absorção também é influenciado pela ciclização. Apesar de ter o mesmo número de duplas ligações conjugadas, licopeno e β -caroteno têm diferentes máximos de absorção. O $\lambda_{\max}$ à 446, 472 e 505 nm do licopeno é alterado para os valores mais baixos de $\lambda_{\max}$ à 425, 451 e 483 característicos do β -caroteno devido à presença dos anéis neste composto.

É sabido que os carotenóides são essenciais para a sobrevivência dos organismos fotossintéticos. Os carotenóides agem como agentes protetores da destruição irreversível do aparato fotossintético por um mecanismo de proteção contra o dano foto-oxidativo já abordado anteriormente (ítem 1.3).

Os carotenóides de plantas, algas, fungos e da maior parte das bactérias carotenogênicas são sintetizados pela rota dos isoprenóides. A maioria dos animais não realizam a síntese *de novo* dos carotenóides, mas conseguem converter biossinteticamente os carotenóides ingeridos em outros tipos de carotenóides (Armstrong & Hearst, 1996).

As reações iniciais da biossíntese de carotenóides são mediadas por um precursor do isopreno C_5 , o isopentenil pirofosfato (IPP). O ácido mevalônico é convertido em IPP, o qual sob isomerização resulta na formação do dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Uma molécula de IPP é condensada com uma molécula de DMAPP pela enzima preniltransferase para formar geranyl pirofosfato (GPP, C_{10}). Adições subseqüentes de moléculas de IPP conduzem à formação de farnesil pirofosfato (FPP, C_{15}), e então, geranylgeranyl pirofosfato (GGPP, C_{20}). Todos os pirofosfatos intermediários até GGPP (incluído) também são utilizados em outras ramificações da rota de biossíntese de outros isoprenóides. FPP é um precursor dos esqualenos e esteróides, enquanto que GGPP é utilizado na síntese de fitohormônios tais como giberilinas, e nas cadeias laterais de fitil das quinonas, tais como ubiquinona e plastoquinona. A biossíntese de clorofila e bacterioclorofila está ligada à biossíntese de carotenóides porque o GGPP também é utilizado na síntese das cadeias laterais de fitil ou geranylgeranyl esterificadas da clorofila/bacterioclorofila (Armstrong & Hearst, 1996).

A condensação de duas moléculas do intermediário C_{20} GGPP, produz o prefitoeno pirofosfato (PPPP). Esta é a primeira reação na rota biossintética dos isoprenóides considerada exclusiva na produção de carotenos (Britton, 1983; Goodwin, 1976; Goodwin, 1980; Goodwin, 1988). O PPPP sofre uma conversão estereo-específica à *cis*- ou *trans*-fitoeno, sendo que o primeiro C_{40} carotenóide, 15-*cis*-fitoeno predomina em plantas superiores, algas e fungos (Goodwin, 1988). As reações nas quais o PPPP e o fitoeno são formados são catalisadas pela primeira enzima específica para a biossíntese dos

carotenóides: a fitoeno sintase (Dogbo *et al.*, 1988). O fitoeno é oxidado à neurosporeno em três etapas sucessivas de dehidrogenação via fitoflueno e ζ -caroteno. A cada etapa de dehidrogenação, dois átomos de hidrogênio são removidos pela trans-eliminação à partir das posições adjacentes e a dupla ligação é adicionada.

O neurosporeno é um intermediário comum à maioria dos organismos carotenogênicos. Nos organismos contendo carotenóides cíclicos, tais como plantas superiores, a próxima etapa é a dessaturação do neurosporeno à licopeno seguido da ciclização do licopeno à β -caroteno. A hidroxilação do β -caroteno resulta na formação da zeaxantina. As várias posições das duplas ligações insaturadas nos anéis resultam em uma variedade de xantofilas. Resumindo, a biossíntese dos pigmentos carotenóides pode ser comparada à uma árvore invertida, com o tronco representando as reações iniciais, comuns à todos os organismos, e os galhos representando a enorme quantidade de xantofilas que surgem à partir da introdução espécie-específica de funções de oxigênio em carotenos cíclicos e acíclicos (Armstrong & Hearst, 1996). A figura 5A mostra a *via* biossintética dos carotenóides proposta por Armstrong & Hearst (1996) em diferentes organismos.

Fig. 5A. Via biossintética dos pigmentos carotenóides em cianobactérias e plantas (extraída de Armstrong & Hearst, 1996 e modificada). IPP, isopentenil pirofosfato; GPP, geranil pirofosfato; FPP, farnesil pirofosfato; GGPP, geranilgeranil pirofosfato; PPPP, pré-fitoeno pirofosfato.

As enzimas envolvidas na biossíntese dos carotenóides têm sido de difícil purificação e caracterização. O isolamento das frações enzimáticas, as quais são capazes de converter MVA, IPP e GGPP à fitoeno, é menos complexo. Entretanto, as etapas subsequentes são difíceis de atingir, pois a maior parte destas enzimas estão ligadas à membrana do cloroplasto. Acredita-se que as enzimas relacionadas as vias biossintéticas dos carotenóides formam um complexo multienzimático para se tornarem funcionais (Giulliano *et al.*, 1993).

Nos últimos anos muitas destas etapas enzimáticas foram estabelecidas geneticamente (Armstrong *et al.*, 1993; Hoshino *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1993; Tabata *et al.*, 1994) e as seqüências de genes de muitos organismos já estão disponíveis. Todos os genes da biossíntese de carotenóides em *Rhodobacter capsulatus* estão agrupados em um plasmídeo de 46kb (Marrs, 1981). Os genes da via biossintética de carotenóides das bactérias não-fotossintetizantes *Erwinia herbicola* e *Erwinia uredevora* já foram sequenciados (Hundle *et al.*, 1993; Misawa *et al.*, 1990; Shivanand *et al.*, 1992). Existem seis genes envolvidos na biossíntese destas enzimas em *E. herbicola* e *E. uredevora*, e a seqüência de aminoácidos deduzida destas proteínas nas duas bactérias é 50 a 60% idêntica. Além disso, a seqüência de aminoácidos deduzida para os genes envolvidos nas etapas GGPP→PPPP→fitoeno→neurosporeno nestas bactérias também são semelhantes à seqüência dos genes de *R. capsulatus* (Armstrong *et al.*, 1993).

Os genes codificadores da via biossintética dos carotenóides designados e sequenciados de *Rhodobacter capsulatus* e *Erwinia* conduziram à identificação de genes correspondentes de muitos outros organismos. Por exemplo, o gene *crtB* (que codifica a enzima fitoeno sintase) de *R. capsulatus* e *E. herbicola* assemelha-se ao produto protéico do gene cDNA de tomate (*pTOM5*), que é diferencialmente expresso durante a maturação da fruta (Giulliano *et al.*, 1993). O produto gênico codificado PDS em *Synechococcus* PCC7942, assemelha-se ao do gene *crtE* (fitoeno desaturase) de *R. capsulatus* (Armstrong *et al.*, 1993). Em *Neurospora crassa*, um outro homólogo de um gene de *R. capsulatus* (*crtI*), o *al-1*, foi identificado, que codifica a enzima geranilgeranil difosfato sintase (Baima *et al.*, 1992).

Em dinoflagelados, Johansen *et al.* (1974) identificaram o β -caroteno como o único carotenóide presente, e várias xantofilas: dinoxantina, piroxantina, diatoxantina, astaxantina, diadinoxantina, peridinina, peridinol, e piroxantanol. Em todos os gêneros, em que estava presente, a peridinina era o carotenóide dominante (63-85% do total de carotenóides). Os dinoflagelados que não apresentaram peridinina possuíam a fucoxantina como seu carotenóide dominante. Em *G. polyedra*, o trabalho pioneiro de Liaaen-Jensen (1978) descreveu a ocorrência dos carotenóides β -caroteno (o único caroteno presente), diatoxantina, diadinoxantina, dinoxantina e peridinina (xantofilas) como já foi mostrado anteriormente (figura 5).

Vários autores (Frosch & Mohr, 1980; Corona *et al.*, 1996; Bonk *et al.*, 1997) sugerem que exista uma biogênese coordenada entre os pigmentos carotenóides (principalmente o β -caroteno) e as clorofilas. A biossíntese de carotenóides não é uma rota independente, tendo numerosas ramificações com atividade de formação de prenil-lipídios competindo por seus intermediários, como já foi abordado anteriormente. No estágio do GGPP, monoterpenos são formados e ao longo da via biossintética, reações de formação de clorofilas, tocoferóis, quinonas, giberelinas, entre outros, competem pelo substrato GGPP. Muitos destes produtos são vitais, portanto, seu fluxo metabólico deve ser estrategicamente regulado. Por exemplo, os carotenos e as clorofilas devem ser sintetizados quantitativa e qualitativamente de maneira coordenada para garantir a manutenção do funcionamento do aparelho fotossintético (Bonk *et al.*, 1997). As clorofilas são os tetrapirróis mais importantes e mais abundantes nos organismos fotossintéticos (Reinbothe & Reinbothe, 1996). Estão envolvidos na captação de luz e na transdução de energia durante a fotossíntese.

Os carotenóides e as clorofilas são ligados não-covalentemente à proteínas intrínsecas das membranas dos tilacóides (Thornber, 1975). Cada complexo carotenóide-clorofila-proteína tem sua composição de pigmentos específica (Braumann *et al.*, 1982).

Oelmüller & Mohr (1985) descreveram que a síntese de carotenos em milho (*Sorghum vulgare*) poderia ser regulada em três níveis diferentes: um

controle mais amplo através de um fotorreceptor (no caso sugeriram o fitocromo); uma regulação mais “fina” em conexão com o acúmulo de clorofila e, por último, a estabilização do holocomplexo contra a fotodecomposição.

1.5 Influência da Luz e o Papel dos Fotorreceptores

Os fotorreceptores são a primeira via de captação de luz e identificação do ciclo ambiental e, dependendo do organismo, os próprios pigmentos fotossensíveis constituem-se em receptores. Estudos com herbicidas que bloqueiam a biossíntese de carotenóides em plântulas de milho indicam a participação de carotenóides na fotorrecepção primária (Vierstra & Poff, 1981).

Em *Euglena gracilis*, protoclorofilídios e um ou mais fotorreceptores que absorvem a luz azul mediam o desenvolvimento de cloroplastos e o aumento correspondente nos pigmentos carotenóides (Cohen & Schiff, 1976; Fong & Schiff, 1979). Em fungos e bactérias, o fotocontrole da carotenogênese é feito por uma porfirina ou um pigmento fotorreceptor de luz azul. Em plantas superiores o fitocromo regula o desenvolvimento de cloroplastos e a biossíntese de carotenóides (Harding & Schropshire, 1980).

Considerando as funções, bem como a ampla distribuição dos pigmentos carotenóides, não parece surpresa que a biossíntese destes pigmentos seja controlada pela luz em muitos organismos. A luz azul ativa vários processos metabólicos, de desenvolvimento e comportamentais em plantas, em organismos procariotos e eucariotos unicelulares, e sua influência direta e indireta na regulação da síntese enzimática é bem documentada (Fontes *et al.*, 1993; Rau & Schrott, 1979). O controle da biossíntese de carotenóides pela luz azul tem sido descrito para algas *Euglena gracilis* (Dolphin, 1970; Vaisberg & Schiff, 1976) *Scenedesmus obliquus* (Britton & Young, 1993) e *Chlorella vulgaris* (Claes, 1966; Desbach & Kowallik, 1974), fungos *Phycomyces* (Eslava *et al.*, 1974; Jayaram *et al.*, 1979), *Fusarium aquaeductum* (Lang-Feulner & Rau, 1975; Rau 1976), *Neurospora crassa* (Harding & Shropshire, 1980) e *Verticillium agaricinum* (Rau, 1976), e bactérias como *Flavobacterium dehydrogenans* (Weeks *et al.*, 1973), *Myxococcus*

(Buchard & Hendricks, 1969) e *Mycobacterium* (Batra *et al.*, 1969). Caratolli *et al.* (1994) demonstraram que em *N. crassa* a biossíntese de carotenóides é regulada pela luz azul, principalmente através da ativação da transcrição de alguns genes-chave na via biossintética enzimática da carotenogênese. Entretanto, a extensão da regulação da síntese pela luz difere de organismo para organismo. Em muitos organismos uma quantidade razoável de carotenóides é sintetizada no escuro e a iluminação apenas aumenta a taxa de síntese. Este parece ser o caso da acumulação de carotenos em plantas superiores mediada por fitocromo (mas não é um efeito de luz azul) (Deng, 1994). Em outras espécies, a iluminação é obrigatória para uma síntese substancial de certos carotenóides, mas o acúmulo destes pigmentos processa-se durante a iluminação, significando que a presença permanente do indutor (luz) é essencial para a resposta. A fotorregulação da carotenogênese em fungos como *F. aquaeductuum* serve como exemplo do terceiro tipo. A taxa de acúmulo é baixa no escuro, e apenas poucos minutos de exposição à luz são suficientes para uma produção de pigmentos substancial no subsequente período escuro e somente por um certo período de tempo. Este tipo de fotocontrole exhibe todas as características de um mecanismo clássico de indução, no qual a luz serve como “gatilho” e todas as reações no escuro são consequências da foto-indução.

A fotorregulação da biossíntese dos carotenóides levanta muitas questões, por exemplo: (i) quais são os fotorreceptores responsáveis pela transdução de sinal, (ii) quais as etapas da rota biossintética estão sob fotocontrole e (iii) quais os mecanismos fisiológicos envolvidos.

1.6 Fotossíntese

A fotossíntese é realizada por uma ampla variedade de organismos indo de bactérias e algas unicelulares aos grupos mais complexos de plantas superiores. As reações iniciais do processo envolvem a absorção da luz por pigmentos antena seguida da transferência da energia de excitação aos centros de reação PS I e PS II. Dentro das membranas dos tilacóides, os

carotenóides estão na maioria das vezes ligados a complexos protéicos específicos (junto com a clorofila) dos dois fotossistemas (PS I e PS II). A unidade fotossintética dos produtores primários é funcionalmente organizada em dois tipos de complexos proteínas-pigmentos; i) os complexos antena que são responsáveis pela captação dos fótons, transferência de energia de excitação e o relaxamento não-fotoquímico desta excitação sob condições de super-saturação; ii) os centros de reação onde ocorre a separação inicial de cargas. Nestes organismos fotossintéticos, a função antena é desempenhada por um carotenóide (espécie-específico) e as clorofilas (em *G. polyedra*, peridininina e as clorofilas *a* e *c₂*). Como todos os pigmentos fotossinteticamente ativos se ligam à proteínas específicas para formar complexos pigmentos-proteínas (Iglesias-Pietro & Trench, 1997), as alterações nas concentrações celulares destas proteínas devido à foto-aclimatação podem fornecer informações sobre o funcionamento do aparato fotossintético.

O complexo PCP (peridininina-clorofila *a*-proteína) é encontrado somente em dinoflagelados, assim como a peridininina que está ligada à esta proteína (Le *et al.*, 1997). Existem duas formas de PCP presentes em dinoflagelados, uma com peso molecular de 17 kDa e outra com 32 kDa. A estrutura da proteína de 32 kDa foi elucidada em *Amphidinium carterae*. A apoproteína trimérica liga duas clorofilas *a*, oito peridinininas e duas moléculas de digalactosil diacil glicerol (DGDG), que mantém a peridininina próxima à clorofila para uma transferência eficiente de energia do carotenóide para a clorofila (Hoffmann *et al.*, 1996). Estruturalmente, cada monômero possui um eixo duplo de simetria, sugerindo que a proteína evoluiu da forma menor de PCP (17 kDa) por um evento de duplicação gênica.

O estudo de Koka & Song (1977) mostrou que no complexo PCP de *G. polyedra* estão ligadas quatro moléculas de peridininina e uma molécula de clorofila.

Em organismos unicelulares como as cianobactérias *Synechococcus* *sp.*, foi demonstrado que os genes envolvidos em funções fisiológicas comuns estão arranjados em “cluster” (agrupados) no genoma e que a deleção de uma parte do operon que codifica as subunidades grande e pequena da enzima

RuBisCo, impedia a síntese de clorofila no escuro (Ronen-Taranzi *et al.*, 1995).

A enzima RuBisCo (ribulose- 1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase) é a enzima chave na fotossíntese de plantas, algas e da maioria das bactérias fotossintetizantes (Palmer, 1996). Esta enzima catalisa a primeira etapa da fixação do carbono no Ciclo de Calvin via a carboxilação de açúcares de cinco carbonos (ribulose-1,5-bisfosfato) para produzir duas moléculas de fosfoglicerato. Esta enzima é bi-funcional, catalizando duas reações que competem entre si: a assimilação fotossintética de CO₂ e a oxidação do carbono por fotorrespiração (Ishida *et al.*, 1998).

Por sua abundância, importância e distribuição a RuBisCo é tida como a enzima mais estudada em plantas (Palmer, 1996). A partir das sequências de aminoácidos já descritas para mais de 2000 plantas da subunidade maior desta enzima, avanços incríveis foram realizados na sistemática molecular (Clegg, 1993). A ribulose- 1,5 –bifosfato carboxilase/ oxigenase tipo I, que se encontra presente em plantas, algas, cianobactérias e na maior parte das bactérias, é uma proteína de alto peso molecular (Mr= 500.000- 560.000), composta de oito sub-unidades maiores e oito sub-unidades menores. A sub-unidade maior contém o sítio ativo e é codificada por um gene diferente da sub-unidade menor. A RuBisCo tipo II, típica de bactérias, apresenta apenas as sub-unidades maiores (Hayashi *et al.*, 1999).

Diferentemente de outros eucariotos, os dinoflagelados que contém peridininina possuem uma forma de enzima RuBisCo antes só descrita para algumas espécies de proteobactérias; a forma II. Além disso, esta RuBisCo não é codificada pelo DNA do cloroplasto, como em outros organismos, mas pelo DNA nuclear sugerindo uma origem evolutiva distinta para os cloroplastos de dinoflagelados (Morse *et al.*, 1995).

A enzima RuBisCo experiencia várias modificações pós-traducionais durante a sua expressão, importação, montagem e funcionamento (Ying *et al.*, 1999). Em plantas superiores foram evidenciadas modificações pós-traducionais nas sub-unidades da RuBisCo. A sub-unidade maior é codificada por um gene do plastídeo e traduzida e montada na holoenzima RuBisCo dentro do estroma do cloroplasto. Os espectros de massa e as análises das

sequências de aminoácidos dos peptídios, preparados à partir da RuBisCo, mostraram que a sub-unidade maior é processada pela remoção dos resíduos metionina-1 e serina-1, N-terminais e pela acetilação da prolina. O polipeptídeo da sub-unidade menor é pós-traducionalmente importado para o cloroplasto e processado por uma peptidase presente no estroma que remove a pré-sequência alvo. O resíduo de metionina N-terminal resultante da sub-unidade menor é submetido a uma N-metilação antes de ser acoplado à sub-unidade maior na holoenzima. Em ervilha, tabaco e espinafre, a mesma metil-transferase processa as duas sub-unidades.

Os experimentos *in vitro* de Salvucci *et al.* (1986) ressaltam que para que a RuBisCo seja cataliticamente competente, são necessários CO_2 e Mg^{2+} , que se ligam a um resíduo de lisina, próximo ao sítio catalítico da sub-unidade maior.

Hayashi *et al.* (1999) encontraram um gene, o *cbbQ*, localizado “downstream” (anterior na sequência de DNA) ao gene da RuBisCo que controla a atividade desta enzima na bactéria *Hydrogenovibrio marinus*. Este gene codifica uma proteína que possui um motivo de ligação de ATP (“ATP binding-motif”) e que desempenha um papel importante na regulação pós-traducional, modificando o estado conformacional da RuBisCo e assim regulando a sua atividade. Segundo estes autores (Hayashi *et al.*, 1999), a análise da sequência desta proteína mostrou uma semelhança desta com a NirQ de *Pseudomonas aeruginosa*, que ativa a enzima óxido nítrico redutase (essencial no processo de desnitrificação).

Em plantas, a RuBisCo ativase é uma proteína de cloroplasto codificada pelo núcleo, necessária para a ativação da RuBisCo pela luz *in vivo*. Esta enzima varia a atividade da RuBisCo através da retirada de ribulose- 1,5 bifosfato (RuBP) e outros fosfatos inibitórios do açúcar em um processo que requer a hidrólise do ATP. A atividade da RuBisCo varia com a intensidade luminosa, da mesma forma que a fotossíntese, por alternância entre as formas ativa/ inativa (Zhang & Portis Jr., 1999). A transcrição do gene da enzima 1,5-ribulose bifosfatase carboxilase/oxigenase ativase (RCA) em *Arabidopsis* é regulado pela luz e pelo relógio biológico, e esta transcrição é uma resposta à luz vermelha, mediada pelo fitocromo (Liu *et al.*, 1996).

Segundo Pechorowicz *et al.* (1981), o fator ambiental mais importante no controle da atividade da RuBisCo é a variação diária na intensidade luminosa. Durante o processo de fotossíntese existe uma razão ADP/ ATP variável. A atividade da RuBisCo ativase pode ser regulada pela razão ADP/ ATP presente no estroma. O ADP inibe a reação de hidrólise do ATP da ativase, a qual é necessária para remover os inibidores (Zhang & Portis Jr., 1999).

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA TESE

O objetivo deste trabalho é obter informações sobre os processos circadianos envolvidos na síntese de pigmentos em *Gonyaulax polyedra* e a relação da quantidade destes pigmentos com o relógio biológico e outros processos ligados à este. Além disso, sabendo que os carotenóides são sistemas de defesa antioxidante no cloroplasto, objetivou-se verificar a eficiência do extrato de carotenóides desta alga em suprimir o $O_2(^1\Delta_g)$ *in vitro*.

Para isso foram traçadas as seguintes metas experimentais:

(i) utilização do extrato de pigmentos carotenóides como supressor do $O_2(^1\Delta_g)$ no teste de oxidação do Rubreno;

(ii) quantificação de pigmentos carotenóides (β -caroteno e peridininina) e clorofila *a* por HPLC ao longo do período circadiano;

(iii) determinar a curva de dose-resposta da síntese de β -caroteno foto-induzida e o horário em que a sua indução é máxima;

(iv) indução da síntese de pigmentos por exposição a diferentes tipos de luz (verde, vermelha e azul) e tentativa de identificação dos fotorreceptores envolvidos neste processo;

(v) avaliação das possíveis alterações na expressão da enzima fitoeno sintetase (a primeira na *via* biossintética) de carotenóides ao longo do dia através de sondas e clonagem deste gene em *G. polyedra*;

(vi) variação circadiana do conteúdo protéico da enzima ligada à fotossíntese a RuBisCo (forma II) e da proteína que se liga ao carotenóide peridininina e clorofila (PCP), a qual tem extrema importância na captação de luz nesta alga.

(vii) verificação de diferenças na composição de pigmentos e nos níveis protéicos da RuBisCo II e da PCP em células mastigotas e encistadas;

(viii) determinação dos níveis de RNAm da enzima Ru II em células do dia e da noite, com vista a entender os mecanismos envolvidos na regulação gênica;

3. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Meio de Cultura: nitrato de sódio, tiamina, biotina, vitamina B₁₂, sulfato de zinco heptahidratado, cloreto de cobalto hexahidratado, cloreto de manganês tetra hidratado, molibdato de sódio tetra hidratado, cloreto de ferro hexahidratado, cloreto de cádmio, cloreto de mercúrio e nitrato de chumbo (Sigma). Fosfato de sódio monobásico anidro e sulfato de cobre pentahidratado (Merck).

Condições de crescimento das culturas: Incubadoras (Precision Scientific) equipadas com lâmpadas fluorescentes TLT 40W/ 75 RS (Phillips), papel gelatina azul (número 119), papel gelatina vermelho (número 164) e papel gelatina verde (número 139) (Rosco).

Extração de pigmentos: clorofórmio e metanol (Cinética Química), BHT (hidroxitolueno butilado), cloreto de sódio (Sigma) e hidróxido de sódio (Reagen).

Supressão de O₂(¹Δ_g): β-caroteno (Sigma), Rubreno (Aldrich).

Cromatografia líquida de alta performance (HPLC): metanol e acetato de etila (Merck), filtros 0,22 μm (Millipore), β-caroteno e clorofila a (Sigma), coluna C₁₈ / pkB 100 com 5 μm e 25 cm com pré-coluna compatível (Supelco)

Extração e análise de ácidos nucleicos: glicerol (Nuclear), fosfato de sódio bibásico, etanol, isopropanol (Merck), agarose, brometo de etídio, padrões “DNA e RNA ladder”, “PCR Reagent System Kit”, proteinase K, “Random Primers DNA Labeling Kit”, Rnase (Gibco BRL), EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), EGTA (ácido etilenoglicol bis (β- éter aminometílico) N,N,N',N'-tetracético), hidróxido de sódio (Reagen), 2-mercaptoetanol (Fluka), acetato de sódio, ácido bórico, ácido clorídrico, ampicilina, azul de bromofenol, cloreto de lítio, clorofórmio: álcool isoamílico, CTAB (hexadecil trimetil brometo de amônio), DEPC (dietil pirocarbonato), fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, Ficoll, formamida, formaldeído, isotiocianato de guanidina, meio LB (Luria Broth), MOPS (3-(N-morfolino) ácido

propano-sulfônico), N-laurilsarcosina, PIPES (piperazina-etano ácido sulfônico), PVP (polivinilpirrolidona), tetraciclina, Tris-base, xileno cianol (Sigma), α [32 P] dCTP (3000Ci/mmol), membrana de “nylon” Zeta-Probe (Amersham), papel de filtro 3 MM (Whatmann), filme fotossensível X-OMAT AR e soluções de revelação e fixação (Kodak), dodecil sulfato de sódio (Polyscience), filtros 0, 22 μ m (Nuclepore), borato, cloreto de cácio (Vetec), enzimas de restrição (New England Biolabs)

Análise de Proteínas/ Imunodeteção: ácido acético (Cinética Química), Kit ECL para Western Blot, Hyperfilm (Amersham/ Pharmacia), Reagente de Bradford (BioRad), membrana PVDF (Du Pont), SDS, Tween 20 (Polyscience), fosfato de sódio monobásico (Vetec). Persulfato de amônio, acrilamida, bis-acrilamida, Tris, glicina, azul de bromofenol, TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametil-etilenodiamina), padrão de peso molecular “Dalton Mark VII-L”, BSA (soro albumina bovina), Ponceau Red (Sigma), [γ 125 I]- proteína A (Amersham).

3.1 Cultivo de *Gonyaulax polyedra*

O clone Gp70 é originário do banco de algas do Instituto Oceanográfico de Woods Hole (EUA) e foi isolado em 1975 por Barbara B. Prézelin. Culturas unialgais (não axênicas) de *G. polyedra* STEIN foram cultivadas em frascos Fernbach contendo 1,5L de meio de cultura f/2 (Guillard & Ryther, 1962) omitindo o silicato. Este meio consiste de água do mar filtrada e autoclavada suplementada com vitamina, nitrato, fosfato e metais-traço (vide abaixo). Os frascos Fernbach foram colocados em incubadoras (Precision Scientific, modelo 818 com lâmpadas fluorescentes TLT-40 W/ 75 RS) com ciclos de 12 h de claro e 12 h de escuro (C:E), alternados. A temperatura nas incubadoras foi ajustada para 19 °C e a irradiância durante o período diurno (claro) de $69 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ medida por um quantameter com sensor esférico (Biophysical Instruments Inc., modelo QSL-100- SENSOR 4π). Para os experimentos de luz branca constante atenuada (C: C_{Aten}), houve uma diminuição de 30% ($49 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) da intensidade da lâmpada. Esta diminuição foi feita com a cobertura de uma das lâmpadas com papel preto opaco.

Em todos os experimentos foram utilizadas células coletadas durante a fase exponencial de crescimento (10^6 células / mL), onde as mesmas encontram-se no seu ótimo fisiológico. A quantidade de células foi avaliada por contagem em hemacitômetro de Neubauer. Os experimentos foram sempre realizados em triplicata. Cada ponto representa a média entre três amostras de frascos diferentes. Cada experimento foi realizado no mínimo duas vezes para confirmar os resultados.

Meio de cultura f/2:

Para cada litro de água do mar, previamente filtrada foi adicionado 0,1mL de solução estoque de vitaminas e 1 mL de cada uma das seguintes soluções estoque:

-solução de nitrato

7,5g Na NO₃ / 100mL H₂O

-solução de fosfato

0,5g Na HPO₄·H₂O / 100mL H₂O

-solução de metais-traço

3,15g FeCl₃ ·6H₂O + 4,36g Na₂EDTA / 900mL de H₂O e 1mL de cada uma das seguintes soluções :

0,98g CuSO₄ ·5H₂O / 100mL H₂O

2,20g ZnSO₄ ·7H₂O / 100mL H₂O

1,05g CoCl₂ ·6H₂O / 100mL H₂O

1,80g MnCl₂ ·4H₂O / 100mL H₂O

0,63g Na₂MoO₄ ·4H₂O / 100mL H₂O

(o volume final da solução deve ser completado para 1 litro com H₂O).

O meio de cultura completo foi então autoclavado por 20 minutos, resfriado à 20° C e à este foi adicionada a solução de vitaminas (40 µL/L de meio).

-solução estoque de vitaminas

0,1g tiamina + 0,005g biotina + 0,005g vitamina B₁₂ / 1000mL H₂O.

3.1.1 Variação Circadiana de Pigmentos, RuBisCo II e PCP

Para verificar a ocorrência de variação circadiana na quantidade de pigmentos e nas proteínas Ru II e PCP, e avaliar a influência da luz e do relógio biológico nesta variação, foram realizados experimentos durante 36 horas seguidas. Culturas de células mantidas sob condições de C: E e C: C (detalhes no item 3.1) foram coletadas a cada 3 horas para análise de seus pigmentos por HPLC e a cada 6 horas para determinação da quantidade das proteínas de interesse por imunodeteção em Western Blots.

A análise estatística dos dados foi realizada pela técnica de Análise de Variância para Experimentos Inteiramente Casualizados (ANOVA), complementada pelo "Teste de Comparações Múltiplas *t* de Student". No

presente trabalho, adotamos o nível de 5% de significância ($p < 0,05$), para todas as conclusões abordadas.

Nos experimentos de claro: escuro (C: E), o momento em que as luzes se acendem é considerado como tempo “0”, e nos casos dos experimentos em claro constante este momento é denominado “CT 0” (“circadian time 0”). Nas células mantidas sob iluminação constante, a noite subjetiva corresponde ao período do dia onde estas estariam no escuro, caso estivessem em ciclos claro: escuro.

3.1.2 Diferentes Irradiações

Estes experimentos visam o estudo do efeito da qualidade de luz sobre a transdução de sinal e resposta do relógio biológico frente a diferentes fotorreceptores. Culturas de *G. polyedra* foram expostas à diferentes irradiações durante o período do claro do ciclo claro: escuro. Para obtenção de luz verde, vermelha e azul foram utilizados diferentes cores de papéis gelatina (Rosco), cujos espectros de absorção são observados na fig. 6. Tais filtros foram recomendados pelo Prof. Mikya Muramatsu, especialista em ótica do IFUSP.

Fig. 6. Espectros da porcentagem de transmitância (% T) dos papéis gelatina utilizados como filtros nos experimentos de irradiação com diferentes faixas do espectro luminoso. Azul (A), verde (B) e vermelho (C). Detalhes: vide Material e Métodos.

Células crescendo em ciclo claro: escuro (12: 12 h) com luz branca ($69 \mu\text{mol. m}^{-2}\text{s}^{-1}$) foram transferidas na primeira hora do período de luz para incubadoras forradas com papel gelatina de diferentes cores (azul # 119, vermelha # 164 e verde # 139). A posição dos frascos em relação à luz foi considerada para que não houvesse diferenças na intensidade luminosa em cada tipo de luz. As células foram coletadas a cada 6 horas durante 36 horas para a análise por HPLC de seus pigmentos carotenóides e clorofilas, e determinação da quantidade das proteínas Ru II e PCP por Western Blots.

3.1.3 – Indução da síntese de pigmentos em células do escuro

Curva de Dose- Resposta

Para determinar o tempo de indução da síntese de β -caroteno no qual a resposta é linear, frascos contendo células do meio do período noturno foram expostas à luz branca (intensidade luminosa de $69 \mu\text{mol. m}^{-2}\text{s}^{-1}$) por diferentes intervalos de tempo e sua quantidade de β -caroteno avaliada por HPLC.

Indução Máxima de β -caroteno

Sabendo-se do tempo de indução adequado, foram realizados experimentos para determinar em que momento da noite as células apresentavam uma indução máxima. Células de diferentes horários do período noturno foram expostas por 45 min à luz branca (intensidade luminosa de $69 \mu\text{mol. m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e a quantidade de β -caroteno presente nestas células avaliada por HPLC.

Indução da Síntese de Pigmentos

Com o objetivo de verificar o efeito da qualidade de luz visível na indução da síntese de carotenóides e clorofilas foram testadas várias irradiações: branca, verde, vermelha e azul em células do meio do período

escuro (indução máxima). Culturas mantidas em ciclo claro: escuro (12: 12 h) com luz branca foram expostas à pulsos de luz branca, azul, vermelha e verde (intensidade luminosa de $69 \mu\text{mol. m}^{-2}\text{s}^{-1}$) por 45 min. Como controle foram usadas células da metade do período escuro não-expostas à luz. Após a exposição aos pulsos de luz as células foram coletadas para análise do conteúdo de pigmentos por HPLC.

3.1.4 - Indução à formação de Cistos

Cultivos da alga foram mantidos como descrito no item 3.1. Para a indução do dinoflagelado *G. polyedra* ao encistamento, células do meio do dia foram colocadas em uma incubadora Precision com ciclo de claro: escuro (10: 14 h) com sua temperatura ajustada para 15 °C (Behrmann & Hardeland, 1995). Estas culturas permaneceram por quatro dias nesta temperatura sob a intensidade luminosa de $69 \mu\text{mol. m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e a porcentagem de células encistadas foi avaliada por microscopia ótica. Após este período, a totalidade da população se apresentava sob a forma cística. Como controle foram utilizadas culturas provenientes do mesmo inóculo que permaneceram à 20° C sob regime de luz:escuro usual (12:12 h). Além das amostras para análise de pigmentos por HPLC, foram coletados 200 mL de células para análise imunodeteção das proteínas PCP e Ru II por Western Blots.

3.2 Análise por HPLC

3.2.1- Extração de Pigmentos Totais

Em todos os experimentos relacionados à extração de pigmentos, foram considerados os cuidados descritos na literatura, para evitar sua degradação. Isto significa que todas as etapas de extração foram realizadas sob luz

vermelha fotográfica ou no escuro, sob atmosfera inerte (fluxo de N₂) e baixa temperatura (máxima 20 °C).

Culturas de células densas (10⁶ células por mL) foram filtradas à vácuo (Whatmann #3) e os seus pigmentos carotenóides e clorofilas extraídos do papel de filtro picado exaustivamente com metanol, em banho de gelo, por 5 horas no escuro. Experimentos preliminares demonstraram a eficiência desta metodologia na completa extração dos pigmentos desta alga. As amostras foram então filtradas em filtro Millipore para solvente orgânico (0,22 µm) para não danificar a pré-coluna e a coluna do HPLC. As amostras foram estocadas no escuro à -20 °C .

3.2.2 - Condições Cromatográficas

As análises foram realizadas por HPLC de fase reversa (Shimadzu) em uma coluna C₁₈ (pkB 100- Suplex; especificações: 25 cm de comprimento com 5 µm de porosidade), com pré-coluna compatível (Suplex). Para que os pigmentos carotenóides e as clorofilas de *G. polyedra* fossem resolvidos ao mesmo tempo, foi utilizado um gradiente linear binário com a fase móvel descrita a seguir. Dentre todas as condições testadas, esta fase móvel e este gradiente foram considerados os mais adequados para as nossas análises.

Eluente A: Metanol 75% em água Milli-Q

Eluente B: Acetato de Etila 100%

<i>Análise:</i>	<u>Gradiente</u>	Tempo 0,01 min	concentração de B 50%
		Tempo 15,0 min	concentração de B 100%
		Tempo 19,0 min	concentração de B 50%
		Tempo 25,0 min	concentração de B 50%
<u>Fluxo:</u> 0,7 mL/ min			

Dos cromatogramas resultantes foram feitas as análises quantitativas e qualitativas. Foram feitas corridas em paralelo no detector visível no comprimento de onda de 452 nm (que é o máximo de absorção do β -caroteno) e no detector “diode array”, que permite uma varredura minuto a minuto em todos os comprimentos de onda (230-700 nm). Para quantificarmos o β -caroteno, a clorofila *a* e a peridininina presentes nos extratos, foram utilizadas curvas de calibração dos padrões e as áreas relativas a cada pigmento nos cromatogramas. Os resultados representam a quantidade destes pigmentos por célula. Os gráficos foram elaborados com o aplicativo Microsoft Excel (versão para Windows 97) utilizando os valores da quantidade média dos pigmentos e os seus respectivos desvios-padrão, analisados por HPLC, ao longo do tempo. Para traçar a linha de tendência utilizou-se a função incluída no programa, com curva polinomial de ordem 4 em todos os gráficos.

3.3 Supressão de $O_2(^1\Delta g)$ por Carotenóides de *G. polyedra* in vitro

3.3.1 Extração de Pigmentos Carotenóides

Para a extração exclusiva dos pigmentos carotenóides, 100 mL de células foram concentradas por centrifugação e tratadas com 5 mL de uma solução clorofórmio:metanol (1:1) (v: v) contendo uma solução de NaOH 5% (m: v) e mantidas por 2 h no escuro. Esta etapa de saponificação remove o material lipídico indesejado e, em organismos fotossintetizantes, elimina as clorofilas (Davies, 1976). A extração foi repetida algumas vezes para garantir a máxima recuperação dos carotenóides. A fase orgânica foi lavada várias vezes em funil de separação com uma solução de NaCl de 0,9%. As soluções foram mantidas no escuro e sob atmosfera de nitrogênio durante todo o processo.

3.3.2 Teste da Oxidação do Rubreno

A eficiência do extrato de carotenóides em suprimir o $O_2(^1\Delta g)$ *in vitro* foi determinada pela sua capacidade em retardar a oxidação do Rubreno (5,6,11,12-tetrafenilnaftaceno) em comparação com o β -caroteno comercial. O Rubreno é um hidrocarboneto vermelho brilhante o qual reage rapidamente com $O_2(^1\Delta g)$ ($K_r = 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Monroe, 1985) formando um composto incolor (Khan *et al.*, 1992). A reação foi monitorada em um espectrofotômetro da marca Hitashi (U2000) a 540 nm. O $O_2(^1\Delta g)$ foi gerado quimicamente pela termodissociação do endoperoxídeo DMNO₂ (1,4-dimetilnaftaleno) que produz DMN e $O_2(^1\Delta g)$ (Di Mascio *et al.*, 1992), segundo a seguinte reação:

Reação de geração do oxigênio singlete

A constante global da taxa de supressão $k_t (= k_q + k_r)$ foi calculada à partir das curvas obtidas da reação monitorada em espectrofotômetro utilizando a equação para reações que seguem o modelo de Stern-Volmer:

$$k_o/k = 1 + (k_q + k_r) k_d^{-1} [Q]$$

onde k_q é a taxa de supressão física, k_r a de supressão química de $O_2(^1\Delta g)$ pelo supressor $[Q]$ e k_d é a constante de decaimento do $O_2(^1\Delta g)$. A meia vida do $O_2(^1\Delta g)$ ($=231 \pm 19 \mu\text{s}$) em clorofórmio usada para o cálculo de k_t é uma média dos valores descritos por diferentes autores para este solvente (Monroe, 1985). A concentração final do supressor $[Q]$ (β -caroteno comercial ou extrato de carotenóides de *G. polyedra*) variou até $4 \mu\text{M}$. A constante da taxa de oxigenação k_o ou k do Rubreno foi medida na ausência e na presença dos supressores, respectivamente. Com os carotenóides, $k_q \gg k_r$, portanto, a supressão química pode ser desconsiderada permitindo com este método a determinação direta da k_q . A adição de BHT (hidroxitolueno butilado) não mostrou diferenças na k_q , excluindo a possibilidade de interferência de radicais livres.

3.4 Southern Blots

3.4.1 Extração de DNA genômico

Em todos os experimentos desenvolvidos foi utilizada a centrífuga de bancada Sorvall TLC 6 e o rotor ST-Micro.

Foram seguidos protocolos descritos em Sambrook *et al.* (1989). As células (peso fresco de 2 g) foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido e 10 mL de tampão GIT (isotiocianato de guanidina 4,0 M; Tris-base 0,05 M; EDTA 70 mM; EGTA 0,025 M; N-laurilsarcosina 2%; 2-mercaptoetanol 1%). Ao macerado foi adicionado igual volume da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e a solução centrifugada à 5000 rpm por 15 min a 4° C. Recuperou-se a fase aquosa e uma nova extração foi realizada. A seguir os ácidos nucleicos foram precipitados com a adição de 0,7 volumes de isopropanol. Com o auxílio de um bastão de vidro o DNA foi recolhido, lavado em solução de etanol 70% e ressuspenso em TE (Tris-base 10 mM pH: 8,0; EDTA 2,0 mM) e mantido por 16 h à 4 °C. Foi adicionada proteinase K (concentração final de 50 µg/ mL) e a amostra incubada à 37 °C durante 2 h. Após o término desta reação, foi adicionado à amostra o mesmo volume de tampão CTAB (Tris-base 0,18 M; Na₂EDTA 0,063 M; CTAB 55 mM; NaCl 1,8 M), pré-aquecido à 65 °C, seguido de incubação à 65 °C por 30 min para a remoção de polissacarídeos. Na etapa seguinte foi realizada uma extração com 1X o volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e a amostra foi mantida sob agitação durante 10 min e centrifugada a 7000 rpm por outros 10 min. O sobrenadante foi recolhido e os ácidos nucleicos precipitados com adição de 0,6 volumes de isopropanol durante 4 h (a-20°C). Os ácidos nucléicos foram recolhidos com um bastão de vidro, lavados com etanol 70% e solubilizados durante a noite a 4°C em tampão TE. No dia seguinte foi realizada nova extração com CTAB e depois de precipitada e solubilizada em TE, a amostra foi incubada com RNase A (25µg/mL) por 2 horas, à 37°C. Seguiram-se extrações orgânicas com fenol:clorofórmio (5:1) e por fim somente clorofórmio. O DNA foi precipitado novamente com 0,6 volumes de

isopropanol e ressuspendido em TE. Para a quantificação, 5 µL foram utilizados para leitura em espectrofotômetro OD₂₆₀, segundo descrito a seguir:

$$\text{Quantidade de DNA (}\mu\text{g/ mL)} = A \cdot D \cdot 50$$

onde:

A= absorbância

D= diluição

50= fator de conversão para determinar a concentração de DNA

3.4.2 Obtenção da sonda *psyAra17*

Dos pesquisadores Glenn Bartley e Pablo Scolnik da Du Pont americana foi obtido o plasmídeo contendo o gene da fitoeno sintase de *Arabidopsis thaliana* (pArapsy17). O clone de 1,769 kb encontrava-se em um vetor pBluescript SK- com resistência a Ampicilina (figura 7; mapa de restrição).

Fig. 7. Mapa de restrição do gene completo (1.739 bp) da enzima fitoeno sintase de *A. thaliana* (*psyAra17*), utilizado como sonda em experimentos de Southern Blot.

Uma colônia de *E. coli* da linhagem JM109 foi crescida em 50 mL de meio LB-Tetraciclina, sob agitação (250 rpm) à 37 °C, durante 16h.

Esta cultura foi utilizada como pré-inóculo (4 mL) e adicionada a 400 mL de meio LB, sob as mesmas condições de crescimento anteriormente descritas, até atingirem a DO₆₀₀ de 0,375-0,380 (fase de crescimento log).

As células foram mantidas em gelo por 10 min, centrifugadas à 1600g por 7 min e ressuspensas em uma solução de CaCl₂ (60mM CaCl₂; 15% glicerol; 10mM PIPES, pH=7,0) gelada. Esta solução foi substituída após a centrifugação das células à 1100 g por 5 min. As bactérias em solução foram mantidas em gelo por mais 30 min e novamente centrifugadas. As células foram então ressuspensas em um volume menor de solução de CaCl₂, aliquotadas em tubos Eppendorf e congeladas imediatamente em freezer -70 °C.

Para a transformação foi utilizado o protocolo de Ausubel *et al.* (1987), ou seja, 2 µL do plasmídeo contendo a sequência a ser amplificada (além do gene de resistência ao antibiótico ampicilina) foi adicionado à 100 µL das células competentes. A mistura permaneceu no gelo por 10 min e então foi colocada em um banho à 42 °C por 2 min. A seguir o meio LB foi adicionado. As células foram incubadas à 37 °C por uma hora sob agitação e em seguida plaqueadas em meio LB-ampicilina. As placas foram incubadas por 16 h à 37 °C. Os clones positivos foram considerados os que crescem em meio com ampicilina e após eletroforese em gel de agarose 0,8% em TBE 1x apresentavam o plasmídeo.

As colônias positivas foram, então, crescidas em 2 mL de meio LB-ampicilina por 16 h à 37 °C sob agitação para a produção do plasmídeo em larga escala.

O plasmídeo foi isolado segundo Ausubel *et al.* (1987) e digerido com as enzimas de restrição *Eco RI* e *Xho I* por 12 h para liberar o fragmento do gene *psy* (fitoeno sintase) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% "Low melting point". A banda com o fragmento de 1,739 bp foi excisada deste gel

sob UV manual e isolada segundo o protocolo descrito a seguir (Heery *et al.*, 1990) a fim de ser utilizado como sonda.

As fatias de gel contendo o fragmento de DNA de interesse são transferidas a um Eppendorf estéril e furado (na lateral junto ao fundo) cujo fundo continha lã de vidro compactada (Saiki *et al.*, 1988). Este foi colocado em cima de outro Eppendorf estéril e o sistema foi centrifugado a 6000 rpm por 10 min. O eluído contendo o fragmento de DNA foi coletado no tubo inferior e a recuperação pôde ser visualizada pelo exame de sua fluorescência sob UV. O método indica recuperação de 90% para fragmentos entre 0,1 e 3,0 Kb.

3.4.3 Slot Blots

Como controle da sonda, foram realizados experimentos de Slot-Blots com o DNA de *Arabidopsis thaliana*. Cerca de 5 µg, 10µg e 15µg de DNA genômico de *G. polyedra* e 5 µg de DNA genômico *A. thaliana* foram transferidos sob vácuo para uma membrana Zeta-Probe utilizando o sistema de transferência "Slot-Blot" da Bio-Rad. Para a marcação radioativa da sonda e a hibridação foram utilizados os protocolos descritos a seguir (item 3.4.4). Após a incubação, a membrana foi exposta em filme X-Omat AR (Kodak) por 3 dias e procedeu-se a revelação.

3.4.4 Gel de Agarose/ Transferência/ Hibridação

Aproximadamente 10µg de DNA genômico de *G. polyedra* foi digerido por 24 h com as enzimas de restrição *Pst I*, *Eco RI* e *Xho I* (50 U cada) à 37 °C. Uma alíquota de 10 µL (µg de DNA) resultante desta digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0 % em tampão TBE 1x (TBE 5X: Tris-HCl 0,44 M; Borato 0,44 M; EDTA 10,0 mM). Como controle, foi aplicado o plasmídeo (~2 µg) contendo o gene *psy* de *A. thaliana* . A

eletroforese foi realizada a 20 V por 16 h. Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador "Ladder" 1 Kb.

Para a eletroforese do DNA foi utilizado o tampão TBE 1x. Após a eletroforese, o gel com os fragmentos de DNA foi visualizado sob luz UV e documentado com o aparelho *Image Master VDS* (Pharmacia Biotech, USA)

O gel foi desnaturado por 30 min em solução de NaOH 0,4 M/NaCl 0,8 M, copiosamente enxaguado com água deionizada autoclavada e os fragmentos de DNA do gel transferidos por capilaridade para uma membrana Zeta-Probe em SSC 10X (1,5 M NaCl; 0,15 M citrato de sódio) durante 16 h, segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

Após a transferência a membrana foi mantida a 80 °C por 2 h, para fixar o DNA e a seguir hibridada com a sonda *psyAra17* segundo os dois protocolos abaixo (Sambrook *et al.*, 1989). A membrana foi mantida por 30 min em solução de hibridação (pré-hibridação) antes de ser adicionada a sonda radioativa. Para a marcação da sonda foi utilizado o kit "Random Primers DNA Labeling System" (GIBCO BRL). Cerca de 25ng de DNA (fragmento de fitoeno sintase de *A. thaliana*) foram desnaturados a 95 °C por 5 min. Depois que a amostra estava no gelo, foram adicionados 1µL de solução de dATP, 1µL de dGTP, 1µL de dTTP, 20µL de tampão (2,5 X), 5µL (~50µCi) de ³²P dCTP, água destilada para completar 49µL e 1µL do Fragmento "Klenow". A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 2 h e a sonda adicionada à membrana imersa em solução de hibridação. A membrana foi incubada com a sonda por aproximadamente 16 h, sob agitação constante a 48 ou 42 °C e submetidas as lavagens como descrito abaixo.

Protocolo I

Solução de hibridação e pré-hibridação

Pré-hibridar por 2 h à 65 °C, remover a solução e incubar à 48 °C por 16 h com a seguinte solução: 5 x SSC; 0,1% SDS; 0,25% leite em pó desnatado; 0,2% PVP; 0,2% Ficoll

Soluções de lavagem

Lavar uma vez à 48 °C por 15 min nas soluções:

A: 5x SSC; 0,5% SDS

B: 3x SSC

Protocolo II

Solução de hibridação e pré-hibridação

Pré-hibridar por 15 min à 45 °C e hibridar por 16 horas à 42 °C com a seguinte solução: 50% Formamida; Na₂HPO₄ 0,12 M pH:7,2; 7% SDS; NaCl 0,25 M; EDTA 1mM

Soluções de lavagem

Lavar à 42 °C duas vezes com cada solução por 15 min.

A: 2X SSC; SDS 0,1%

B: 0,5X SSC; SDS 0,1%

Após a incubação, a membrana foi exposta em filme X-Omat AR (Kodak) durante cerca de 3 dias e revelada.

3.4.5 Análise das Sequências de Fitoeno Sintase

Após consulta do GenBank foram obtidas todas as sequências de aminoácidos desta enzima que já haviam sido descritas na literatura. De posse destas informações, foram comparadas estas sequências de vários organismos distintos (*Arabidopsis thaliana*, *Capsicum annum*; *Erwinia herbicola*, *Lycopersicon esculentum*, *Neurospora crassa*, *Rhodobacter capsulatus*; *Synechocystis* sp.; *Synechococcus* sp). Foi constatado que existem algumas regiões de cerca de 7 aminoácidos, distantes entre si em 33 aminoácidos, conservadas entre estes organismos. Estes fragmentos de sequencia são adequados para a construção de "primers" para a geração de sondas a partir dos produtos amplificados. A figura 8 mostra o resultado do

alinhamento entre as sequências da enzima fitoeno sintase, executado pelo programa MACAW (versão 2.05). Os resíduos conservados estão destacados em negrito, ao longo da sequência de aminoácidos. Estes blocos como regiões conservadas foram utilizados para a síntese de “primers” degenerados.

	BLOCO 1	POSIÇÃO NA SEQUÊNCIA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KTFYLG T	144-151
<i>Capsicum annum</i>	KTFYLG T	141-148
<i>Lycopersicon esculentum</i>	KTFNLG T	133-140
<i>Neurospora crassa</i>	ETSYLGL	141-148
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	YTFHAAS	19-26
<i>Synechocystis sp.</i>	KTFYLG T	61-68
<i>Synechococcus sp.</i>	KTFYLG T	31-38

	BLOCO 2	POSIÇÃO NA SEQUÊNCIA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	FDMLDAAL	205-213
<i>Capsicum annum</i>	FDMLDAAL	205-213
<i>Erwinia herbicola</i>	RDLNDAAL	167-175
<i>Lycopersicon esculentum</i>	FDMLDGAL	193-201
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	FDMEADAL	66-73
<i>Synechocystis sp.</i>	EDDCDVAL	91-99

	BLOCO 3	POSIÇÃO NA SEQUÊNCIA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NILRDVG	294-303
<i>Capsicum annum</i>	NILRDVG	282-289
<i>Lycopersicon esculentum</i>	NILRDVG	294-303
<i>Neurospora crassa</i>	NIARDIV	478-485
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	NIARDVG	170-177
<i>Synechocystis sp.</i>	NILRDVG	216-223

	BLOCO 4	POSIÇÃO NA SEQUÊNCIA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GRVYLP	308-314
<i>Capsicum annum</i>	GRVYLP	308-314
<i>Lycopersicon esculentum</i>	GRVYLP	294-300
<i>Neurospora crassa</i>	GRVYLP	490-496
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	GRIYLP	182-188
<i>Synechocystis sp.</i>	GRIYLP	128-134

Fig. 8. Estudo comparativo das sequências de fitoeno sintase de diferentes organismos disponíveis no GenBank, Os resíduos conservados estão destacados em negrito, ao longo da sequência de aminoácidos. Estes blocos com regiões conservadas foram utilizados para a confecção de “primers” degenerados.

3.4.6 Síntese de “primers” degenerados- PCR

Oligonucleotídeos foram sintetizados pela Gibco BRL para servirem com “primers” (iniciadores) das reações de amplificação. Os “primers” foram confeccionados considerando regiões conservadas da fitoeno sintase identificadas no alinhamento (figura 8). Estes estão relacionados na tabela 2.

Tab.2. Oligonucleotídios sintéticos utilizados como “primers” na amplificação do gene da fitoeno sintase por PCR, elaborados à partir dos blocos de aminoácidos conservados em vários organismos. Sentido direto (F- forward), sentido reverso (R).

5'.....
...3'

BLOCO 1: F- AA(A,G)ACNTT(T,C)TA(T,C)(C,T)TNACNGG
BLOCO 2: F- TT(T,C)GA(T,C)AT(A,G)(T,C)TNGA(T,C)GCNGCN(T,C)T
BLOCO 2: R- NA(A,G)NGCNGC(A,G)TCNA(A,G)(T,C)AT(A,G)TC(A,G)AA
BLOCO 3: F- GA(T,C)AT(T,C,A)(G,T,C)(C,T)NAG(A,G)(T,C)AT(A,G)TNG(G,T)
BLOCO 3: R- N(C,A)CNA(T,C)NAC(A,G)TC(T,C)CTN(G,A)(C,A,G)(A,G,T)AT(A,G)TC
BLOCO 4: R- NGGNA(A,G)(A,G)TANA(T,C)(T,C)CTNCC

A amplificação por “Polymerase Chain Reaction” (PCR) foi feita após a extração de DNA total de *G. polyedra*, utilizando ~5,0 ng de DNA por amplificação. A sequência alvo, determinada pela hibridação de oligonucleotídeos específicos é amplificada exponencialmente através de ciclos repetitivos de desnaturação do DNA molde, hibridação dos “primers” e extensão com DNA polimerase *Taq* (Sambrook *et al.*, 1989).

As reações de amplificação foram realizadas utilizando o Kit PCR-REAGENT SYSTEM da Gibco- BRL segundo o descrito a seguir: 5 µL da solução de DNA molde (25 ng/ µL) , 23 µL de água destilada, 5 µL de tampão 10X com magnésio para a *Taq* polimerase (fornecido pelo Kit), 6 µL de dNTPs, 5 µL de cada um dos dois “primers” (0,25 µg/ mL) e 1 µL de *Taq* polimerase. À superfície da reação foi adicionado óleo mineral, para evitar a evaporação.

As amplificações foram feitas em um aparelho de PCR do modelo PTC-1 Cyclar da Life Technologies Inc. segundo o esquema abaixo:

Amplificação por PCR

Para as reações de amplificação foram sempre feitos controles positivos e negativos em paralelo. O controle positivo consistiu da utilização de um DNA molde e “primers Mix” disponíveis no Kit (Gibco: “PCR Reagent System Kit”) e para o controle negativo foi omitido da reação o DNA molde.

Após a amplificação, uma alíquota de 8 μ L foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 1X, empregando marcador de peso compatível (ϕ 174/ *Hinf*).

3.5 Northern Blots

3.5.1 Extração do RNA total

Para a extração e a manipulação do RNA, foram utilizados todos os procedimentos necessários para evitar a sua degradação. Todo material foi autoclavado e colocado em estufa à 180°C e todas as soluções preparadas com água Milli-Q tratada com DEPC (0,1%) por 10 h e autoclavada.

As células de *G. polyedra* foram filtradas à vácuo, raspadas do papel de filtro e maceradas em um almofariz (pré-gelado) com nitrogênio líquido até a pulverização total, sendo imediatamente armazenadas em freezer a -70 °C.

Para a extração do RNA total, as células pulverizadas foram suspensas em tampão de extração (Tris-HCl (100 mM- pH=9,0); LiCl 8M; 1,00 mL EDTA 0,5M; SDS 10% em H₂O) e centrifugadas por 10 min à 3000 rpm. Ao sobrenadante foram adicionados 10 mL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:25:1). Na fase aquosa desta mistura encontram-se o DNA e o RNA enquanto que na fase orgânica são encontradas proteínas, lipídios e as carapaças das células. Após nova centrifugação do sobrenadante por 10 min à 3000 rpm, seguiu-se uma outra extração com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico. O sobrenadante resultante foi centrifugado por 5 min à 3000 rpm, transferido para um novo tubo, e submetido a extração com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1).

Para a precipitação do RNA, foi adicionado cloreto de lítio, ao sobrenadante da etapa anterior, em quantidade suficiente para que a concentração final da solução fosse de 2M, e incubado à -20 °C por 1h. Esta solução foi então centrifugada por 20 min. à 10000 rpm e o sobrenadante descartado. O precipitado contendo o RNA foi ressuspense em 600 µL de H₂O e à esta solução foi adicionado LiCl para a concentração final de 2M. Repetiu-se as etapas de incubação à -20 °C por 1h e a centrifugação por 20 min. à 10000 rpm. O precipitado foi ressuspense em água e a sua concentração medida em espectrofotômetro à OD₂₆₀.

Quantidade de RNA ($\mu\text{g/ mL}$)= $A \cdot D \cdot 40$

onde:

A= absorbância

D= diluição

40= fator de conversão para determinar a concentração de RNA

O RNA foi visualizado sob luz UV e documentado com o aparelho *Image Master VDS* (Pharmacia Biotech, USA)

3.5.2 Obtenção da sonda *Rull*

A sonda da enzima RuBisCo forma II proveniente de *G. polyedra* foi enviada pelo Prof. David Morse da Universidade de Montreal (Canadá) (figura 9-mapa de restrição). Este fragmento possui 1,3 kb e mostra alto grau de homologia de sequência de aminoácidos com enzimas de proteobactérias. Foram utilizados os mesmos procedimentos de isolamento descritos para a sonda *psyAra17* (item 3.4.2).

Fig. 9. Mapa de restrição do gene da enzima RuBisCo tipo II de *G. polyedra* (1.300 bp), utilizado como sonda em experimentos de Northern Blot.

3.5.3 Gel de Formaldeído/ Transferência/ Hibridação

As amostras de RNA total extraído de células do meio do dia e do meio da noite, mantidas sob ciclo 12:12 h (claro: escuro), foram submetidas à eletroforese em gel de agarose/ formaldeído 1,2% (Sambrook *et al.*, 1989). Às amostras de RNA (5,0 µL) foram adicionados 1,0 µL de tampão MOPS 10 x [MOPS 0,2 M (pH 7,0); NaOAc 80 mM; EDTA 10 mM (pH 8,0)], 3,5 µL de formaldeído 35%, e 10 µL de formamida (100%). Esta reação foi incubada em um banho à 65 °C por 10 min e colocada em gelo por 15 min. cada amostra adicionou-se 1,0 µL de uma solução de brometo de etídeo (2,0 mg/mL) e 1,0 µL de “RNA Loading Buffer” (glicerol 50%; EDTA 1 mM; Bromofenolblue 0,25%; Xileno cianol 0,25%; H₂O_{DEPC} 1,48 mL). Uma pré-corrida (20-40 V) por 10 min do gel precedeu a aplicação das amostras, que foram separadas à 30 V durante 4 horas.

A transferência e a hibridação foram executadas como descritas no item 3.4.4. A solução de hibridação empregada, no entanto foi a descrita por Church & Gilbert (1984) por ser mais adequada para esta sonda.

Solução de hibridação e pré-hibridação

As membranas foram pré-hibridadas por 2 h à 65 °C e hibridadas por 16 h, sob agitação na mesma temperatura na seguinte solução: 1% BSA; 1 mM EDTA; 0,5 M NaHPO₄ pH 7,2; 7% SDS

Soluções de lavagem

As membranas foram lavadas 2 vezes na sol. A e 8 vezes na sol. B por 5 min, substituindo as soluções a cada lavagem.

Solução A: 0,5% BSA; 1mM EDTA; 40 mM NaHPO₄ pH 7,2; 5% SDS

Solução B: 1mM EDTA; 40 mM NaHPO₄ pH 7,2; 1% SDS

As membranas secas foram autorradiografadas em filmes X-OMAT à – 80 °C por dois dias utilizando “intensifying screens” e a seguir procedeu-se a revelação.

3.6 WESTERN BLOTS

3.6.1 Obtenção de Extrato Bruto Protéico

Para a preparação de extratos brutos protéicos, culturas densas (10^6 células/ mL) foram filtradas através de um sistema à vácuo, utilizando papel de filtro Whatman como suporte. As células retidas neste filtro foram removidas com espátula e suspensas em tampão fosfato 100 mM (pH 7,5). As células foram rompidas por pressão em bomba de N₂ sob uma pressão de 2000 psi (Parr Instr.), por 20 min, em banho de gelo. O homogenado foi centrifugado por 20 min, a 4° C a 12000 g. O precipitado, constituído por tecas e membranas celulares foi descartado e o sobrenadante utilizado para análises posteriores.

O conteúdo protéico de cada amostra foi estimado pelo método descrito por Bradford (1976) usando o BSA como padrão.

3.6.2 SDS-PAGE/ Transferência para Membrana PVDF

As amostras de extratos brutos protéicos de *G. polyedra* coletados em diferentes horários foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE), seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970). O gel de corrida 12% consistiu de: 12% de solução acrilamida/bis-acrilamida em tampão TRIS-base 380 mM, (pH 8,9), 0,4% SDS; 0,3% de persulfato de amônio (solução estoque 10%) e 0,1% de TEMED. Para o empilhamento foi utilizada a seguinte solução: 4% de de acrilamida/bis-acrilamida em tampão TRIS-base 62 mM, (pH 6,8); tampão de eletrodo: 25 mM TRIS-base, 190 mM de glicina; 0,1% SDS; 0,3% de persulfato de amônio e 0,1% TEMED. O tampão de corrida utilizado foi: solução de 25 mM TRIS-base, 190 mM de glicina e 0,1% SDS.

Foi adicionado às amostras do extrato bruto tampão de amostra [4 X: SDS 10% (m, v); Glicerol 20% (v, v); 2-mercaptoetanol 30% (v, v); tampão de

empilhamento 12,5% e azul de Bromofenol 2% (m, v) em água deionizada] com concentração final de 1 X e a seguir estas foram mantidas a 100 °C por 5 min. e colocadas em banho de gelo por 15 min.

O conteúdo protéico da proteína PCP e da enzima RuBisCo II foram determinados por imunodeteccões em “Western Blot” (Towbin *et al.*, 1979), utilizando-se anticorpos policlonais contra estas proteínas purificados de *G. polyedra*. Estes anticorpos marcam bandas protéicas específicas de 32 kDa (PCP) e 55 kDa (RuBisCo II) quando imunoprecipitados.

Em um sistema BioRad Mini-Protean II Slab Cell, aplicamos o extrato bruto (20 µg de proteína). Estas amostras foram submetidas à eletroforese por 3 h. A diferença de potencial utilizada na eletroforese foi de 50 V para o empilhamento e 100 V para a corrida.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando o aparelho BioRad Mini Trans-Blot Cell. A transferência foi efetuada por 2 h, à uma voltagem constante de 100 V em banho de gelo. O sistema composto por gel de poliacrilamida, papel de filtro e membrana PVDF estava imerso em uma solução de transferência (20 % de metanol (v, v), 25 mM de TRIS-base, 1% SDS e 190 mM de glicina 190 mM).

Ao final da transferência, a membrana de PVDF é corada com uma solução de “Commassie Blue” (“Commassie Blue” 0,1% em metanol 50%) e descoradas com uma solução “De-stain” (50% metanol, 10% ácido acético glacial e 40% água) para que seja verificada a sua eficiência.

3.6.3 Utilização de Anticorpos Policlonais

A membrana foi incubada com os anticorpos policlonais contra RuBisCo forma II e PCP purificados de *G. polyedra*, cedidos pelo Prof. David Morse da Universidade de Montreal. O protocolo de imunodeteccção segue a seguir:

Bloqueio: as membranas foram submetidas à incubação em solução de albumina sérica bovina (BSA) 3% (m, v) em tampão TBS-T [1M Tris (pH 7,4); 5

M NaCl; 0,05% Tween 20] para bloqueio de possíveis ligações inespecíficas das proteínas de *G. polyedra* com os anticorpos primários e secundários.

Incubação com Anticorpo-primário: Os anticorpos primários AbRuBisCo II (anti-RuBisCo forma II) e AbPCP(anti-Proteína ligada a peridinina e clorofila a) foram diluídos 1:500 e 1:1000, respectivamente, em TBS-T e as membranas incubadas por 16 h nesta solução à 4 °C sob agitação. A lavagem do excesso de anticorpo primário da membrana foi efetuada sob agitação durante 30 min com três trocas de tampão TBS-T em temperatura ambiente.

Incubação com Anticorpo-secundário: As membranas foram então tratadas seguindo o protocolo do reagente ECL. Estas foram incubadas por 3 h com anticorpos secundários conjugados à peroxidase (diluição de 1:5000, em TBS-T). A membrana foi lavada como descrito anteriormente. As membranas foram colocadas sobre um filme plástico e a elas foram adicionados os reagentes 1 e 2 do Kit ECL. Após a retirada do excedente desta solução (1+2), o filme plástico foi fechado e as membranas colocadas em um cassete (todas as etapas subsequentes foram realizadas sob luz fotográfica vermelha). As membranas envolvidas pelo filme plástico foram expostas ao filme Hyperfilm por 3 min. e o filme prontamente revelado.

4. RESULTADOS

4.1 Análises por HPLC

A extração utilizada e as condições cromatográficas empregadas permitiram separar os pigmentos de *G. polyedra* investigados: clorofila *a*, β -caroteno e a xantofila peridinina (figura 10). Para a identificação e quantificação do β -caroteno e da clorofila *a* foram utilizados padrões comerciais como descrito no item 3.2.1 de material e métodos. Para a identificação e quantificação da peridinina utilizou-se um padrão purificado e caracterizado em nosso laboratório (Pinto Jr. *et al.*, 2000). Todos os pigmentos analisados foram caracterizados por espectroscopia de massa (MS) pelo nosso grupo. A figura 10 mostra um exemplo do perfil cromatográfico de uma das amostras analisadas.

Fig. 10. Cromatograma obtido em análise por HPLC a 452 nm dos pigmentos de células mastigotas de *G. polyedra*. Pico 1: peridinina; pico 2: clorofila *a* e pico 3 β -caroteno. À direita, visualizam-se os perfis cromatográficos dos padrões utilizados. A- peridinina; B- clorofila *a* e C- β -caroteno. Detalhes: vide Material e Métodos.

4.1.1 Variação Circadiana nas diferentes Irradiações

Os resultados mostram uma variação circadiana significativa na quantidade de β -caroteno ao longo das 36 horas de experimento nas células mantidas em ciclo claro: escuro (12:12 h), com a luz branca incidente durante o período de luz (figura 11 a). O gráfico mostra que a maior quantidade deste carotenóide ocorre durante o meio do dia ($5,31 \pm 0,25 \mu\text{mol} \times 10^{-6} \text{ cél.}$) e que a menor ocorre durante a noite ($2,60 \pm 0,15 \mu\text{mol} \times 10^{-6} \text{ cél.}$). Esta variação na quantidade parece ser resposta à um controle endógeno, pois, o ritmo persiste em condições de luz constante (figura 11 b).

Com o intuito de verificar os efeitos da qualidade de luz sobre o relógio biológico, as células foram submetidas a três faixas de luz “monocromáticas”: luz vermelha, luz verde e luz azul (espectros de absorbância visualizados na figura 5). Considerando-se as células mantidas sob luz azul e luz verde durante o período de luz (figura 12 a e b) verifica-se que sob estas irradiações não ocorreram diferenças significativas em relação ao controle (mantido sob luz branca) no ritmo circadiano da quantidade de β -caroteno. Por outro lado, as células expostas no ciclo claro: escuro à luz vermelha durante o período iluminado (figura 12 c), apresentam uma alteração no ritmo, que diminui em amplitude, e sofre um deslocamento de 3 h no seu máximo, no segundo período de luz. Este deslocamento pode estar caracterizando um aumento do tamanho do período deste ritmo (τ) em relação ao controle (figura 11 a).

As quantidades de peridinina e clorofila *a* ($\mu\text{mol} \times 10^{-6} \text{ cél.}$) ao longo das 36 horas de experimento não variaram de maneira significativa. As figuras 13 e 14 mostram que a razão peridinina/ clorofila *a* também não variou significativamente a despeito das diferentes irradiações à que foram expostas as células.

Fig. 11. Análise por HPLC da quantidade de β - caroteno ($\mu\text{mol} \times 10^8 \text{ cél.}$) em *G. polyedra* ao longo de 36 h. **A:** células mantidas sobre o ciclo claro: escuro (C: E/ 12:12 h) e **B:** células mantidas sob luz constante aten. 30% (C: C_{Aten}). A área sombreada representa a noite ou a noite subjetiva no caso das células expostas à luz constante. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados representam a média e o desvio padrão dos mesmos.

Fig. 12. Análise por HPLC da quantidade de β -caroteno ($\mu\text{mol} \times 10^{-6}$ cél.) em *G. polyedra* ao longo de 36 h. Células mantidas sobre o ciclo claro: escuro (12:12 h); A: luz azul no período de luz, B: luz verde no período de luz e C: luz vermelha no período de luz. A área sombreada representa a noite (período de escuro). Os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados representam a média e o desvio padrão dos mesmos

Fig. 13. Análise por HPLC da razão peridínina/ clorofila a em *G. polyedra* ao longo de 36 h. **A:** células mantidas sobre o ciclo claro: escuro (C: E/ 12:12 h) e **B:** células mantidas sob luz constante atenuada 30% (C: C_{Aten}). A área sombreada representa a noite ou a noite subjetiva no caso das células expostas à luz constante. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados representam a média e o desvio padrão dos mesmos.

Fig. 14. Análise por HPLC da razão peridinin/ clorofila *a* em *G. polyedra* ao longo de 36 h. Células mantidas sobre o ciclo claro: escuro (12:12 h). A: luz azul no período de luz; B: luz verde no período de luz e C: luz vermelha no período de luz. A área sombreada representa a noite (período de escuro). Os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados representam a média e o desvio padrão dos mesmos.

4.1.2 Indução da Síntese de Pigmentos em Células do Escuro

Curva de Dose- Resposta

A figura 15 mostra a curva Dose-Resposta para a o aumento na concentração de β -caroteno ($\mu\text{mol} \times 10^{-6}$ cél.) em porcentagem do valor máximo obtido. Verificou-se que o maior aumento ocorre quando as células do período noturno são expostas por 45 minutos à luz branca.

Indução Máxima de β -caroteno

Quando as células de diferentes horários do período noturno são expostas por 45 minutos à luz branca, a maior resposta indutiva, isto é, o aumento da concentração de β -caroteno ($\mu\text{mol} \times 10^{-6}$ cél.) é verificada nas células do meio da noite (18 horas após o início da luz) como podemos evidenciar na figura 16.

Fig. 15. Indução do aumento na concentração de β -caroteno ($\mu\text{mol} \cdot 10^{-9} \text{cél.}$). As células do período noturno foram expostas por diferentes intervalos de tempo (pulsos) à luz branca ($69 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e a quantidade de β -caroteno avaliada por HPLC. Os dados foram plotados em porcentagem do valor máximo obtido e representam a média de seis experimentos.

Fig. 16. Indução máxima de β -caroteno. Células de diferentes horários do período noturno foram expostas por 45 min à luz branca e a quantidade de β -caroteno ($\mu\text{mol} \cdot 10^6 \text{ cél.}$) presente nestas células avaliada por HPLC. Símbolos abertos representam as células induzidas e símbolos fechados o controle. Início do período de escuro: 12 h. A área sombreada indica o período de escuro.

A tabela 3 apresenta os resultados da análise por HPLC da indução de peridinina e clorofila *a* (em $\mu\text{mol} \times 10^{-6}$ cél.) em células de *G. polyedra* do meio do período escuro por exposição de 45 min a diferentes irradiações: azul, vermelha, verde e branca. Como controle foram utilizadas células do meio da noite.

Tab 3. Concentração de peridinina e clorofila *a* ($\mu\text{mol} \times 10^{-6}$ cél.) e razão peridinina/ clorofila *a* em *G. polyedra* após indução. Células do meio da noite foram expostas por 45 min à diferentes irradiações (branca, azul, verde e vermelha) na mesma intensidade ($69 \mu\text{mol. m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e a quantidade destes pigmentos avaliada por análise por HPLC. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os dados representam a média e o desvio padrão dos mesmos.

	peridinina	clorofila <i>a</i>	Peridinina/clorofila <i>a</i>
Controle	49,69±3,50	10,87±1,50	4,50±0,01
Branca	49,61±2,50	10,94±1,70	4,50±0,01
Azul	46,40±3,60	10,95±2,60	3,60±0,30
Verde	47,43±2,80	11,13±2,10	3,90±0,06
Vermelha	49,14±3,00	11,07±2,90	4,10±0,03

Nenhuma alteração significativa foi verificada nas concentrações de peridinina e clorofila *a* em resposta à exposição das células por 45 min as luzes branca e vermelha em relação ao controle (não expostas). Por outro lado, as células expostas a luz verde e luz azul apresentaram uma redução significativa desta razão. Quando consideramos os níveis de β -caroteno, estes revelam um aumento significativo em resposta as luzes branca, azul e verde como mostrado na figura 17, sugerindo que a indução da síntese deste pigmento ocorra através de um fotorreceptor de luz azul/verde.

Fig. 17. Indução da síntese de β -caroteno em *G. polyedra*. Células do meio da noite foram expostas por 45 minutos à diferentes irradiações (branca, azul, verde e vermelha) na mesma intensidade ($69 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e a quantidade de β -caroteno ($\mu\text{mol} \cdot 10^6 \text{ cél.}$) presente foi avaliada por HPLC. Estes experimentos foram realizados em triplicatas e os dados representam a média e o desvio-padrão dos mesmos.

4.1.3 Quantificação dos Pigmentos em Cistos.

A forma cística de *G. polyedra* foi induzida por abaixamento da temperatura e dias curtos como descrito no item 3.1.4 e os seus pigmentos analisados. A figura 18 apresenta um exemplo do perfil cromatográfico de extratos metanólicos obtidos de células encistadas analisados por HPLC. Comparando-se a figura 18 com a figura 10 (células mastigotas) observa-se um aumento no pico relativo à peridinina (1) e uma redução nos picos referentes a clorofila *a* e β -caroteno (2 e 3). A tabela 4 mostra os resultados da concentração dos pigmentos identificados ($\mu\text{mol} \times 10^{-6}$ cél.) e a razão peridinina/ clorofila *a* em cistos e em células mastigotas (controle) nas triplicatas.

Tab. 4. Quantidade ($\mu\text{mol} \times 10^{-6}$ cél.) de cada pigmento e razão entre as quantidades de peridinina/clorofila *a* e β -caroteno/clorofila *a* estimadas por análise por HPLC nos extratos metanólicos obtidos de cistos e células mastigotas de *G. polyedra*. As células de *G. polyedra* foram induzidas ao encistamento (100% de células encistadas) por estarem crescendo sob ciclo claro: escuro (10:14 h) a 15° C; como controle foram utilizadas células mastigotas do mesmo horário, crescendo sob ciclo claro: escuro (12: 12h) e à temperatura de 20° C. Estes resultados se referem às médias e desvios-padrão entre as triplicatas.

	peridinina	clorofila <i>a</i>	β -caroteno	peridinina/ cl orofila <i>a</i>	β -caroteno/ clorofila <i>a</i>
Cistos	59.1 $\pm$ 1,3	4,7 $\pm$ 0,6	1,8 $\pm$ 0,1	12.6 $\pm$ 1,7	0.3 $\pm$ 0,001
Controle	50,4 $\pm$ 0,6	10,5 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,1	4.8 $\pm$ 0,1	0.4 $\pm$ 0,02

A análise da tabela 4 indica que os pigmentos nos cistos de *G. polyedra* apresentam uma situação diferente do controle. É verificado um aumento significativo na quantidade de peridinina (20%) e uma diminuição drástica na concentração da clorofila *a* (55,17%) e do β -caroteno (59,41%) nas células encistadas quando comparadas com as células mastigotas. A existência de

uma alteração significativa na razão entre as quantidades peridinina/ clorofila *a* nos cistos, sugere uma possível reorganização do maquinário fotossintético.

Fig. 18. Cromatograma obtido em análise por HPLC a 452 nm dos pigmentos de cistos de *G. polyedra*. Pico 1: peridrina; 2: clorofila *a* e 3 β -caroteno. Detalhes: vide Material e Métodos.

4.2 Supressão de $O_2(^1\Delta g)$ por Carotenóides de *G. polyedra* in vitro

Os carotenóides presentes em *G. polyedra* foram mais eficientes em suprimir o $O_2(^1\Delta g)$ gerado quimicamente que o β -caroteno comercial (figura 19). A figura 19 mostra os resultados do ensaio de oxidação do Rubreno onde utilizamos a termodissociação do 1,4- dimetilnaftaleno para gerar o $O_2(^1\Delta g)$. A partir da inclinação das retas, derivaram-se os valores de $k_t = k_q + k_r$, usados na equação de Stern-Volmer. Os valores da constante de supressão de $O_2(^1\Delta g)$ k_t calculados foram de $2,04 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o β -caroteno comercial e $4,75 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o extrato de carotenóides de *G. polyedra*. Considerando tais valores pode-se sugerir um papel eficiente e importante dos carotenóides em suprimir o $O_2(^1\Delta g)$ gerado nos cloroplastos nesta alga.

Fig. 19. Análise de Stern-Volmer. Os dados representam a supressão do $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ gerado quimicamente pela termodissociação do DMNO_2 pelo extrato de carotenóides de *G. polyedra* e β -caroteno comercial em clorofórmio, monitorada em espectrofotômetro. Símbolos abertos: extrato de carotenóides e símbolos fechados: β -caroteno comercial. Detalhes: vide Material e Métodos.

4.3 Slot-Blots

Para determinar se o fragmento de fitoeno sintase proveniente de *Arabidopsis thaliana* (*psyAra17*) era capaz de reconhecer e hibridar com o DNA de *G. polyedra* foi realizado um "Slot-Blot". Na figura 20, podemos observar que ocorreu a hibridação da sonda *psyAra17* apenas com o DNA de *A. thaliana*, controle positivo. Apesar da realização das hibridações em condições de baixa estringência, não houve nenhum sinal de reconhecimento desta sonda pelo DNA de *G. polyedra*. Novas condições de hibridação em "Southern Blots" foram então testadas na expectativa de que, com o DNA total de *G. polyedra* digerido por enzimas de restrição, o resultado fosse positivo.

Slot-blot

Fig. 20. Autorradiografia do *Slot-blot* utilizando o DNA total de *G. polyedra* (10 μ g) e de *A. thaliana* – controle (5 μ g). Observa-se apenas hibridação com o DNA de *A. thaliana* (seta indicando).

4.4 Southern Blots

Com o intuito de verificar se o clone da enzima fitoeno sintase de *A. thaliana* (*psyAra17*) reconhecia porções do mesmo gene em *G. polyedra* foram realizadas hibridações em “Southern Blots”. A figura 21 mostra o resultado da digestão de 10 µg do DNA genômico de *G. polyedra* pelas enzimas *Pst I*, *Eco RI* e *Xho I*. Como controle foi utilizado o plasmídeo *psyAra17*. Embora tenham sido utilizadas condições de baixa estringência na hibridação (detalhes: Material e Métodos) não houve reconhecimento pela sonda do DNA de *G. polyedra*, apenas do controle (próprio plasmídeo).

Tendo em vista a dificuldade de utilização de sondas heterólogas, foram confeccionados “primers” degenerados a partir do alinhamento de sequências de aminoácidos de fitoeno sintase disponíveis no GenBank, como descrito na tabela 2 (item 3.4.6, em Material e Métodos). Embora diferentes condições de hibridação tenham sido testadas (variações nas temperaturas de hibridação dos “oligos” com o DNA molde, variações nos tempos dos ciclos e na quantidade de DNA utilizados) uma vez mais não foram obtidos resultados positivos e não conseguimos amplificar nada além do controle do próprio Kit da Gibco (“PCR Reagent System Kit”).

Southern blots

Fig. 21. Hibridação em *Southern blots* com a sonda *psyAra17* de *A. thaliana*. A: Resultado da digestão do DNA genômico de *G. polyedra* (10 µg) em gel de agarose 1%. Canaleta 1: padrão de peso molecular, 2: DNA digerido; 3: DNA não digerido, 5: plasmídeo com a sonda *psyAra17*. B: Autorradiografia da hibridação com a sonda *psyAra17*. Verificamos a hibridação apenas com o plasmídeo (canaleta 5).

4.5 Northern Blots

Com o objetivo de verificar se a enzima RuBisCo forma II (Rull) presente em *G. polyedra* apresentava variação circadiana na quantidade do seu RNAm, foram realizados experimentos em “Northern Blot”. A figura 22 mostra que a quantidade do transcrito *rull* não variou, pois encontramos as mesmas quantidades deste nas células do meio do dia e do meio da noite, o que sugere um controle não-transcricional deste gene.

Northern blot

Fig. 22. Hibridação em *Northern blot* de RNA total de células de *G. polyedra*, coletadas no meio do dia e no meio da noite, com a sonda *Ru II*. **A**: RNA total (2 μ g) em gel de Formaldeído 1,2%; **B**: Autorradiografia mostrando o resultado da hibridação com a sonda RU II (1,3 Kb).

4.6 Western Blots

Os resultados obtidos sugerem que a variação na concentração de pigmentos ao longo de 36 h não é intensa o suficiente para justificar a conhecida oscilação na capacidade fotossintética. Com o intuito de verificar se esta oscilação era devida a quantidade da enzima Rubisco II (limitante na fixação do carbono) ou da PCP-proteína complexada a peridina e clorofila *a*, ligada ao fotossistema II (muito importante na captação da energia luminosa) foram realizados experimentos de imunodeteção utilizando anticorpos policlonais (AbPCP e AbRubisco) contra estas duas proteínas. Os níveis protéicos de PCP e RuII foram determinados por Western Blot em extratos protéicos de células mantidas sob diferentes ciclos claro: escuro ao longo de 24 h. Cabe ressaltar que os pigmentos presentes originalmente nos extratos bruto protéicos não interferem na migração eletrofoética dos polipeptídeos em géis denaturantes, pois estes são eliminados durante o processo (banho à 95 °C com tampão de amostra por 5 min). A figura 23 mostra o Western Blot e a relativa análise densitométrica de células crescendo sob o regime claro: escuro e claro constante (intensidade luminosa atenuada em 30%) das proteínas PCP (23 a e c) e Ru II (23 b e d). Como pode ser verificado nesta figura (23 a-d), a quantidade destas proteínas não variou significativamente, mesmo quando as células foram mantidas sob iluminação constante atenuada em 30%.

Para investigar se o controle da síntese destas duas proteínas estaria ligado a um fotorreceptor específico, as células foram mantidas em regime claro: escuro sob diferentes irradiações (luz azul, luz vermelha e luz verde) por 36 h e coletadas a cada 6 horas para confecção extratos brutos protéicos. Os resultados são mostrados na figura 24 (a-f). A análise densitométrica dos resultados de imunodeteção mostra que a despeito da faixa do espectro luminoso na qual são mantidas estas culturas, não ocorre uma alteração significativa na quantidade protéica de PCP ou de Ru II ao longo das 36 h de experimento.

Quando as concentrações destas proteínas em células mastigotas (controle) e células encistadas de *G. polyedra* foram comparadas, verificamos que a quantidade da Ru II permanece inalterada mas a PCP se encontra diminuída nos cistos em relação ao controle (figura 25 a e b).

Western blots

Fig 23. Western blot e análise densitométrica correspondente. A: AbPCP células mantidas em C: E; B: AbRull células mantidas em C: E; C: AbPCP nas células mantidas C: C_{Aten}; e D: AbRull nas células C: C_{Aten} 30% (canaletas 8-12). As células foram coletadas a cada 6 h ao longo de 24 h. Detalhes em Material e Métodos.

Western blots

Fig. 24. *Western blot* e análise densitométrica correspondente. A: AbPCP células mantidas em C: E (luz azul); B: AbRull células mantidas em C: E (luz azul); C: AbPCP células mantidas em C: E (luz verde); D: AbRull células mantidas em C: E (luz verde); E: AbPCP células mantidas em C: E (luz vermelha); F: AbRull células mantidas em C: E (luz vermelha). As células foram coletadas à cada 6 h ao longo de 36 h de experimento. Detalhes em Material e Métodos.

Western blots

Fig. 25. *Western blot* e análise densitométrica correspondente. **A:** AbPCP- canaletas 1 e 3 células mastigotas (controle) e 2 e 4 cistos; **B:** AbRull- canaletas 1 e 3 células mastigotas (controle) e 2 e 4 cistos. Detalhes em Material e Métodos.

5. DISCUSSÃO

5.1 Variação Circadiana nas diferentes Irradiações

A maior quantidade de peridinina (valores médios entre 46,3 - 50,4 $\mu\text{mol} \times 10^{-6}$ cél.) encontrada nas células de *G. polyedra* nos experimentos esta de acordo com os resultados preliminares de Knoetzel & Rensing (1991) que sugerem que este é o pigmento mais abundante nesta alga. A maioria dos dinoflagelados possui a peridinina como carotenóide predominante. Este pigmento forma um complexo com a clorofila, conhecido como PCP (peridinin: chlorophyll *a*: protein), possibilitando que o organismo capte energia solar na região azul/verde do espectro (470 à 550 nm), a qual é inacessível para a clorofila (Hoffman *et al.*, 1996). Estudos mostram que 60% da peridinina estão ligados aos centros de reação PS I e PS II e os outros 40% estão ligados ao PCP (Knoetzel & Rensing, 1991). Em *G. polyedra* a razão no complexo PCP é de 4 moléculas de peridinina para 1 molécula de clorofila (Song *et al.*, 1976).

Os resultados obtidos mostram que os valores médios da quantidade de clorofila *a* variaram entre 10,8 – 11,1 $\mu\text{mol} \times 10^{-6}$ cél. ao longo dos experimentos, valores que estão coerentes com os apresentados na literatura. Estudos preliminares com dinoflagelados (Hastings, 1961; Prézelin *et al.*, 1977) verificaram que os dinoflagelados *Ceratium furca*, *Glenodinium spp* e *G. polyedra* apresentavam ritmo circadiano no seu PSII mas que as quantidades de peridinina e de clorofila *a* não variavam em 24 h, ou seja, eram constantes ao longo do ciclo circadiano. Os resultados obtidos por análise em HPLC confirmam estas evidências preliminares. Ao longo do experimento (36 h) a concentração destes pigmentos (peridinina e clorofila *a*) variou de forma aleatória e não significativa (dados não mostrados). Shimura *et al.* (1975) testaram as mesmas radiações monocromáticas (verde, azul e vermelha) em culturas da diatomácea *Phaedactylum tricornutum* e também não evidenciaram alteração na composição dos pigmentos destas algas.

Os valores médios da quantidade de β -caroteno encontrada nas células de *G. polyedra* variaram entre 2,6 - 5,3 $\mu\text{mol} \times 10^{-6}$ cél. ao longo do dia. Observando-se a figura 11, que mostra a variação na quantidade de β -caroteno durante o período circadiano, pode-se verificar que este pigmento está presente nesta alga em quantidade duas vezes maior durante a fase de claro em relação a fase de escuro. Além disso, essa oscilação diária é rítmica, mantendo a característica circadiana mesmo quando as células são colocadas sob claro constante (figura 11 a e b). Prézelin *et al.* (1977) também observaram que células de *Glenodinium spp*, transferidas para condições de luz constante atenuada, não apresentavam alteração significativa na quantidade de seus pigmentos e que o ritmo circadiano da capacidade fotossintética persistia.

Johnsen & Sakshaug (1993) afirmam que o fitoplâncton tem a capacidade de rapidamente adaptar a sua composição de pigmentos e características bio-ópticas qualitativa e quantitativamente em resposta à variações no regime de luz (irradiância, composição espectral e duração do dia). Dessa forma, seria esperado uma alteração significativa na abundância de cada pigmento, principalmente um aumento nos pigmentos antena como a peridinina, quando as células de *G. polyedra* fossem expostas à luz branca constante atenuada. Os experimentos de Iglesias-Pietro & Trench (1997) mostraram que a quantidade de todos pigmentos presentes é aumentada quando os dinoflagelados *Symbiodinium microandriaticum*, *Cassiopeia xamachana* e *Symbiodinium kawanagutti*, são mantidos em condições de iluminação constante atenuada (abaixo da intensidade utilizada na fotossíntese). Schubert *et al.* (1994) e Johnsen & Sakshaug (1993) também observaram um grande aumento na quantidade de todos pigmentos em microalgas cultivadas em luz atenuada. Prézelin *et al.* (1977) observou um aumento na concentração de peridinina, clorofila *a* e clorofila *c*₂, à partir de 6 h em iluminação constante atenuada em *Glenodinium spp*; e verificou que a razão peridinina/ clorofila *a* aumentava. Em *G. polyedra* submetida a iluminação constante atenuada este aumento na razão peridinina/clorofila *a* foi muito discreto (figura 13 a e b). Talvez a resposta não tenha sido tão evidente porque a atenuação utilizada

neste trabalho foi de 30% e nos experimentos de Prézelin *et al.* (1977) a luz foi atenuada em 50-90%.

Segundo Murtas & Millar (2000) os componentes do sistema circadiano sofrem influência da qualidade de luz incidente. O sinal luminoso que chega ao relógio biológico resulta das contribuições de múltiplos receptores: alguns destes funcionando em resposta à comprimentos de ondas específicos. Os principais fotorreceptores já descritos são os fitocromos, que captam a luz na faixa infra-vermelho/ vermelho, e os criptocromos, que absorvem luz azul (revisão em Bogner *et al.*, 1999). Em plantas verdes, já foi observado que existe regulação por luz da transcrição de alguns genes mediada *via* fitocromo. Entretanto, os fitocromos foram detectados somente em clorofitas (algas verdes), implicando que devam existir mecanismos alternativos para respostas à luz vermelha/ infra-vermelha nos outros grupos de algas (Lohuis & Miller, 1998). Segundo Cashmore *et al.* (1999), as flavinas e as clorofilas poderiam ser responsáveis pela fororrecepção da luz vermelha.

Em *G. polyedra* observou-se uma diminuição na quantidade de β -caroteno no CT 6 (meio do dia) nas células mantidas sob luz vermelha em relação ao controle (figura 12 c). Considerando todas as outras radiações monocromáticas utilizadas no presente trabalho, o β -caroteno manteve o ritmo circadiano em sua concentração observado no controle (figura 11 a) quando as células foram expostas à luz azul (figura 12 a) em ciclo claro: escuro e à luz verde em ciclo claro: escuro (figura 12 b). A semelhança entre as respostas à luz branca, azul e verde pode ser explicada pelos espectros de absorção destas radiações. Os espectros da luz verde e da azul sobrepõe-se nos comprimentos de onda próximos à 500 nm e na luz branca sabe-se que existe um forte componente de luz azul. Levando-se em consideração os resultados em resposta à luz vermelha e o fato da oscilação circadiana na quantidade deste pigmento persistir mesmo em condições constantes (luz branca atenuada em 30%), concluímos que a variação na concentração de β -caroteno ao longo do dia está ligada ao relógio biológico. Os resultados sugerem que o fotorreceptor envolvido na transdução de sinal do meio externo ao oscilador é um fotorreceptor de luz azul. Recentemente Cashmore *et al.* (1999) mostraram que a habilidade de perceber e responder à luz azul (400-500 nm) está

disseminada entre plantas e animais, e os exemplos são a produção de antocianinas e carotenóides em plantas e fungos e o arrastamento de fase de ritmos em moscas e mamíferos. Por muitas décadas a natureza deste fotorreceptor tem sido discutida. Alguns autores sugerem que seja uma flavoproteína e outros especulam que este fotorreceptor contém um carotenóide ou um cromóforo retinal. No caso de *G. polyedra*, o β -caroteno poderia ser um fotorreceptor ligado à transdução de sinal do oscilador controlando a sua própria síntese, pois a indução da síntese é máxima no mesmo horário em que existe o deslocamento de fase. Os resultados mostram que quando as células são expostas à luz vermelha (figura 12 c) existe uma diminuição na amplitude do ritmo da quantidade de β -caroteno. Além disso, existe no segundo período de luz (após 24 h) um deslocamento do máximo em 3 h, indicando um aumento do tamanho do período.

Morse *et al.* (1994) observaram que o ritmo da bioluminescência em células de *G. polyedra* expostas à luz vermelha, teve o tamanho do seu período aumentado, enquanto que a luz azul provocou o efeito inverso. Estes autores observaram ainda que o ritmo de agregação das culturas de *G. polyedra* não ocorria sincronizado com o ritmo de bioluminescência, sugerindo que nesta alga estavam presentes dois osciladores: O oscilador do tipo “A” responderia à luz azul, e a este oscilador estariam associados os ritmos de bioluminescência, divisão celular e fototaxia. O segundo oscilador, o tipo “B”, responderia tanto à luz azul quanto a luz vermelha e controlaria os ritmos descritos de fotossíntese, agregação e atividades de SOD e Nitrato Redutase em *G. polyedra*. Em um trabalho posterior, Morse *et al.* (1996) sugeriram que existam mais de dois osciladores controlando os ritmos circadianos nesta alga. Os resultados do ritmo de síntese de β -caroteno indicam que este esteja ligado ao oscilador tipo “A” ou que um oscilador, que responda tanto à luz azul quanto à luz verde, também deva existir em *G. polyedra*.

5.2 Indução da Síntese de Pigmentos em Células do Escuro

No ambiente natural, os ritmos diários são arrastados a períodos de 24 h pela alternância do ciclo claro: escuro. Estas mudanças na intensidade luminosa alimentam um oscilador circadiano interno que controla vários processos bioquímicos e fisiológicos. O arrastamento ocorre quando a luz desloca a fase do oscilador, alterando assim a fase do ritmo (Johnson & Hastings, 1989). A extensão e a direção do deslocamento depende da fase na qual a luz é administrada.

A curva de dose-resposta (figura 15) mostra que um pulso de luz de 45 min é suficiente e capaz de induzir a síntese de β -caroteno em células do período noturno (CT 18), sugerindo uma rápida mobilização desta via biossintética quando necessário. É interessante ressaltar que a concentração dos outros pigmentos analisados não apresentam variação significativa (tabela 3). O aumento na quantidade de β -caroteno pode ser devido à uma rápida mobilização de defesas anti-oxidantes, pois nesta situação de iluminação inesperada (período escuro), muitas das enzimas, responsáveis pela defesa anti-oxidante, como por exemplo a SOD encontram-se em menor quantidade (Asano *et al.*, 1995). Zhang *et al.* (1999b) mostraram que no meio do período de claro (seis horas após o início da luz), onde a fotossíntese é máxima, ocorre um aumento na quantidade de β -caroteno ligado ao citocromo b_6f . Estes autores sugerem que esta ligação aumentaria a proteção do aparato fotossintético contra danos oxidativos. Um outro papel do β -caroteno no PS II é garantir a integridade da proteína D1. A proteína D1 é a proteína central do PS II e sua integridade é essencial para que a fotossíntese ocorra (Shapira *et al.*, 1997). Em *Chlamydomonas reinhardtii*, Trebs & Depka (1997) observaram que em células tratadas com um inibidor da síntese de β -caroteno, o norflurazon, após uma hora de exposição à luz, não detectou-se mais proteína D1 presente ou um PS II funcional. Portanto, parece lógico ter-se observado nos experimentos descritos, uma rápida síntese de β -caroteno, um pigmento tão essencial para a manutenção da integridade do maquinário fotossintético.

As células de *G. polyedra* do meio da noite (18 horas após o início da fase clara) apresentaram a indução máxima da síntese de β -caroteno, quando expostas por 45 min à luz branca. Essa exposição dobrou a quantidade de β -caroteno presente nas células do meio período noturno, atingindo valores similares àqueles das células do dia (figuras 16 e 17). Isto caracteriza um reajuste de fase do oscilador interno ligado à síntese de β -caroteno, pois ocorreu um avanço de 12 h no período deste ritmo. A indução máxima de síntese de β -caroteno ocorre no mesmo período do dia (CT) em que observamos a mudança de fase (CT18), sugerindo que este polieno possa estar agindo como um composto captador de luz (fotorreceptor) para o mecanismo central de temporização do relógio biológico.

O mais importante sincronizador para os ritmos circadianos é a alternância claro: escuro. As alterações na intensidade luminosa alimentam um oscilador central circadiano, o qual por sua vez, temporiza vários processos bioquímicos e fisiológicos. O arrastamento ocorre quando a luz desloca a fase do oscilador, causando uma mudança de fase no ritmo (Pittendrigh & Minis, 1979). A extensão e a direção do deslocamento dependem da fase na qual o estímulo luminoso é dado (Johnson & Hastings, 1989). A representação gráfica da fase de deslocamento de um ritmo contra a fase em que a luz foi administrada durante o período escuro produz a curva de resposta de fase (PRC). Em *G. polyedra*, a PRC mostra um pico no CT 18. Mudanças no período circadiano em função da irradiação são frequentemente explicados em termos de resposta fase- dependente do dado oscilador à luz. Um pulso de luz administrado na porção avançada do PRC, acelera o relógio e na porção atrasada do PCR, desacelera o relógio. O arrastamento representa o equilíbrio, onde a quantidade de deslocamento de fase induzida a cada ciclo é igual a diferença entre o período natural (~24 h) e o período em condições de luz constante (Di Mascio *et al.*, 1995). Embora saiba-se que o deslocamento de fase envolva o mecanismo central de temporização do relógio biológico, os intermediários do processo de deslocamento de fase e os fotorreceptores são ainda desconhecidos.

Quando as células do meio da noite foram expostas à diferentes irradiações, verificou-se a indução da síntese de β -caroteno em células expostas à luz branca (controle), azul e verde. Estes resultados confirmam que o fotorreceptor envolvido na síntese deste pigmento é um fotorreceptor de luz azul/verde. Em *G. polyedra*, a exposição a luz vermelha não induz a síntese de β -caroteno. A não indução da síntese de β -caroteno por luz vermelha foi também observada em outros organismos, como por exemplo *Verticillium agaricinum*, no qual como em *G. polyedra*, a luz azul induz a carotenogênese com aumento de β -caroteno e a luz vermelha não interfere na sua síntese (Hsiao & Björn, 1982).

A foto-indução da síntese de carotenóides em micro-organismos têm sido extensivamente estudada (Cerdá-Olmedo, 1987; Rau & Schrott, 1987). Em bactérias como *Myxococcus xanthus*, a luz azul é necessária para que ocorra a síntese de carotenóides (Buchard & Hendricks, 1969) e estes também são induzidos pela luz verde. Fontes *et al.* (1993) verificaram que a luz azul ativa a síntese de carotenóides em microorganismos eucarióticos. A foto-indução da biossíntese de carotenóides em *N. crassa* é uma resposta à luz azul (De Fabo *et al.*, 1976). Lang-Feulner & Rau (1975) demonstraram que a carotenogênese no fungo *F. aquaeductuum* é normalmente induzida somente por luz azul ou próxima a UV. Infelizmente, nenhum destes organismos se comporta como o nosso dinoflagelado, por serem não fotossintetizantes. Os experimentos destes autores mostram que células crescendo no escuro, somente após a exposição à luz apresentam pigmentos carotenóides. Poucos autores discutem qual pigmento carotenóide é especificamente acumulado, normalmente tratando o resultado como um todo (medindo a absorbância a 452 nm em espectrofotômetro), o que impossibilita uma comparação com nossos resultados.

O trabalho de Lyman (1980) com *Euglena sp.*, relata um aumento rápido da biossíntese de clorofilas (*a* e *b*) quando estas algas são expostas às luzes azul, vermelha e amarela. Em *Chlamydomonas reinhardtii*, Herman *et al.* (1999) verificaram que o gene da enzima glutamato 1-semialdeído aminotransferase, que participa na biossíntese de clorofila, é induzido somente por luz azul. Não foi verificada uma alteração na quantidade de clorofila *a* em

G. polyedra, a despeito da faixa do espectro luminoso sob a qual esta alga cresceu por 36 h. Isto sugere uma síntese independente da luz ou que múltiplos fotorreceptores traduzam o sinal para o oscilador, garantindo que esta biossíntese ocorra sempre. A redução na razão peridinina/ clorofila *a* observada nas células expostas à luz azul e verde talvez esteja relacionada ao controle enzimático de uma etapa posterior a síntese de β -caroteno, que leva à formação da peridinina, na *vía* biossintética dos pigmentos carotenóides nestas irradiações em *G. polyedra*.

5.3 Quantificação dos Pigmentos em Cistos

Além da luz, a temperatura também pode ser considerado um importante temporizador externo, causando alteração nos ritmos em plantas (Kreps & Simon, 1997). Foi observado por Hardeland (1994) que células de *G. polyedra* crescendo à 15° C com um dia curto (10:14) são 100 % induzidas ao encistamento após serem mantidas por 4 dias nestas condições.

Foi verificado que após o encistamento *G. polyedra* apresenta uma alteração na sua composição de pigmentos (figuras 10 e 18). A figura 18 e a tabela 5 mostram uma diminuição na quantidade de clorofila *a* e β -caroteno e um aumento de 20% no carotenóide secundário peridinina.

Bar *et al.* (1995) verificaram que a alga verde *Chlorella zoofringens* mantida em meio com deficiência de nitrogênio tem a sua composição de pigmentos completamente alterada. Após três dias, ocorre uma redução na quantidade de clorofila *a* e β -caroteno presentes; enquanto um aumento significativo do carotenóide secundário astaxantina nesta alga é observado. Os cistos de *G. polyedra* apresentaram uma alteração semelhante (figura 18 e tabela 4).

A deficiência de nitrogênio ou baixas temperaturas são capazes de induzir o encistamento em dois dinoflagelados de água doce: *Peridinium cinctum* e *Peridinium willey* (Chapman & Pfister, 1995). Se a resposta à deficiência de nitrogênio e à baixa temperatura interferirem nas mesmas rotas

bioquímicas em algas unicelulares o mesmo efeito de alteração na composição de pigmentos observado em *C. zoofringens* ocorreria em cistos de dinoflagelados.

Quando a alga verde *Haematococcus pluvialis* cresce sob condições desfavoráveis ou estresse nutricional (depleção de nitrogênio ou fosfato), ocorre uma conversão de β -caroteno à astaxantina mediada pela enzima β -c-4 oxigenase (Lotan & Hirschberg, 1995). Podemos especular que tenha ocorrido uma conversão de β -caroteno à peridinina nos cistos, pois a quantidade de peridinina aumentou e quantidade de β -caroteno diminuiu em uma situação de dormência. Isto é possível se as enzimas posteriores a síntese de β -caroteno forem ativadas, levando a síntese de peridinina nesta situação.

O trabalho de Derenne *et al.* (1992) discute que os carotenóides secundários poderiam servir como precursores para a síntese de proteínas semelhantes à esporopolenina (uma proteína presente em esporos de plantas) constituinte da parede celular da alga *H. pluvialis*. Esta sugestão está baseada em quatro observações: 1) o aparecimento da esporopolenina sob estresse; 2) acúmulo de carotenóides secundários na periferia da célula; 3) inibição da carotenogênese com a formação de compostos semelhantes à esporopolenina; 4) marcação radioativa *in vivo* de carotenóides secundários incorporados na esporopolenina. A parede dos cistos de *G. polyedra* possui esporopolenina (Dr. Lawrence Fritz, Northern Arizona Univ., comunicação pessoal). Portanto, pode se assumir que em *G. polyedra*, uma parte dos pigmentos carotenóides pode estar sendo convertida à esporopolenina após alguns dias de encistamento, com o propósito de aumentar a rigidez da parede do cisto.

Ao observarem os cistos de dinoflagelados de água doce sob microscopia ótica e eletrônica, Bibby & Dodge (1972) verificaram a presença de vacúolos de reserva ("accumulation bodies") cheios de pigmentos carotenóides. Estes autores sugerem que as clorofilas, por serem ricas em nitrogênio, são provavelmente catabolizadas e podem eventualmente se tornar componentes dos cristais que se acumulam em grande número nos vacúolos. Behrmann & Hardeland (1995) também observaram uma grande quantidade de

grânulos de amido e vacúolos lipídicos em cistos de *G. polyedra*. Fritz *et al.* (1990) encontraram uma redução no número de “scintillons” durante o encistamento em *G. polyedra*, sugerindo que isto seria uma característica do estado de dormência. Os resultados sugerem que neste estado de dormência, exista uma menor necessidade da presença de clorofila, um pigmento essencialmente fotossintetizante.

Segundo Behrmann & Hardeland (1995) o encistamento é acompanhado de uma reorganização de organelas e estruturas celulares. Os cistos induzidos por dias curtos e temperatura de 15° C apresentam principalmente cloroplastos do tipo compacto e a estrutura dos cloroplastos de cistos induzidos por dias curtos assemelha-se à de células mastigotas, no escuro. Além disso, as células encistadas apresentam uma maior quantidade de grânulos de amido e vacúolos lipídicos, o que também é típico para células mastigotas durante a maior parte do período escuro (Schmitter, 1971; Rensing *et al.*, 1980).

Devemos ressaltar que assim como ocorre uma reorganização morfológica do cloroplasto deve ocorrer um rearranjo de pigmentos nos fotossistemas, tendo em vista as razões peridinina/ clorofila *a* e β -caroteno/clorofila *a* nos cistos de *G. polyedra*, observadas por nós.

Além de suas funções já bem estabelecidas de captadores de energia luminosa, supressores de espécies reativas de oxigênio e desativadores de estados triplete da clorofila, os pigmentos carotenóides atualmente vêm sendo considerados de importância estrutural como estabilizadores de membranas de tilacóides nos cloroplastos (Havaux, 1998). Estudos recentes revelaram que em plantas e algas os carotenóides da família das xantofilas são deslocados dos complexos de captação de luz (LHC) para as membranas dos tilacóides. A interação resultante entre as moléculas de xantofilas e os lipídios de membrana causam a diminuição da fluidez da membrana, um aumento na termo-estabilidade da membrana diminuindo assim a suscetibilidade à peroxidação lipídica (Havaux, 1998). O aumento da peridinina em células encistadas de *G. polyedra* pode estar relacionado a uma necessidade de aumentar a estabilidade e a proteção das membranas nos cloroplastos. Como os cistos podem resistir por vários anos (Fritz *et al.*, 1989), o aumento da

quantidade de xantofilas exercendo um papel estrutural parece ser uma estratégia importante para a sua sobrevivência.

5.4 Supressão de $O_2(^1\Delta g)$ por Carotenóides de *G. polyedra* *in vitro*

A fotossíntese, o processo pelo qual as plantas transformam a energia solar para gerar compostos de carbono, como a glicose, sustenta a vida na terra (Foyer & Noctor, 1999). É um processo complexo de sucessivas reações de oxi-redução que utilizam dióxido de carbono (CO_2) e água produzindo carboidratos ricos em energia e oxigênio como produtos finais. A evolução da fotossíntese produzindo oxigênio alterou radicalmente a atmosfera da Terra e permitiu o desenvolvimento da vida aeróbica. Além da sua função de pigmentos-antena, aumentando o espectro de absorção de luz pela clorofila, os pigmentos carotenóides são compostos biológicos importantes por sua habilidade de desativar moléculas eletronicamente excitadas como o $O_2(^1\Delta g)$ por um processo chamado supressão física (99% de supressão física e 1% de oxidação de carotenóides). Estes polienos são, portanto, considerados essenciais para a sobrevivência dos organismos fotossintéticos. Telfer *et al.* (1994) demonstraram a habilidade dos pigmentos carotenóides de suprimir a 3Chl e o $O_2(^1\Delta g)$ em complexos PSII *in vitro*. Segundo Björkman & Schäfer (1989), mesmo plantas cultivadas, com altas taxas fotossintéticas, não conseguem utilizar toda a radiação incidente, e a fração excedente pode ser tão grande quanto a fração utilizada nas cadeias de transporte de elétrons. Como consequência, esta energia de excitação não utilizada pode acumular dentro do sistema fotoquímico, conduzindo à reações adversas, inclusive a foto-oxidação. Isto também foi verificado por Bar *et al.*, (1995) para a alga verde *Chlorella zofringens*. A constatação de que os pigmentos carotenóides presentes em *G. polyedra* tinham a capacidade de suprimir o $O_2(^1\Delta g)$ em taxas compatíveis com as de difusão deste, demonstra que também nesta alga o controle desta EROs dentro do cloroplasto é mediado por carotenóides. Os resultados mostram que os extratos de pigmentos carotenóides de *G. polyedra*

são mais eficientes em suprimir o $O_2(^1\Delta g)$ que o β -caroteno comercial (figura 19). Como foram utilizados extratos totais de carotenóides não foi possível detectar qual dos carotenóides presentes é o anti-oxidante mais eficiente nesta alga.

Recentemente Pinto Jr *et al.* (2000) isolaram peridina e β -caroteno de *G. polyedra* e verificaram que a primeira é o principal carotenóide na supressão do $O_2(^1\Delta g)$ nesta alga, pois, apesar da constante de supressão do β -caroteno de *G. polyedra* ser dez vezes maior do que a da peridina, esta se encontra em maior quantidade nesta alga (peridina= 55% do total de pigmentos e β -caroteno= 4,1% dos pigmentos totais em *G. polyedra*).

5.5 Slot-Blots, Southern Blots e PCR- Aspectos Moleculares

Existem poucos estudos do DNA de dinoflagelados, devido a complexidade do seu genoma e características atípicas, o crescimento relativamente lento destas culturas e as dificuldades de utilizar a metodologia usualmente empregada em biologia molecular sem ter que alterar significativamente os protocolos. Até o momento foram clonados poucos genes em *G. polyedra*: *LBP*, *PCP* e *RuBisCo II*, todos eles amplamente expressos e presentes em um grande número de cópias (*PCP*~5000 e *LBP*~ 1000 cópias por célula)

Segundo Sandman (comunic. pessoal, Leiden 1996) o gene relativo a fitoeno sintase surgiu há mais de 2 bilhões de anos, antes da divisão evolutiva de bactérias, algas, cianobactérias, fungos e plantas terrestres. Kavourni *et al.* (1995) encontraram 91% de similaridade e 85% de identidade entre as *psy* de plantas.

Armstrong & Hearst (1996) observam que as fitoeno sintase de eucariontes e eubactérias descritas até o momento são conservadas tanto estrutural quanto funcionalmente. Estes autores sugerem que pelo fato das reações iniciais da biossíntese de pigmentos carotenóides serem comuns a todos os organismos carotenogênicos, as enzimas devam ser semelhantes e conservadas ao longo da evolução. O trabalho de Pecker *et al.* (1992) relata

uma homologia entre o gene que codifica a enzima fitoeno desaturase (a próxima enzima na via biossintética de carotenóides) entre a cianobactéria *Synechococcus* e a alga verde *Dunaliella bardawii*. Esperávamos que a sonda de *Arabidopsis* ou os “primers” conseguissem identificar o gene para esta enzima em *G. polyedra* (figuras 20 e 21). As sequências da enzima fitoeno sintase utilizadas para o delineamento dos “primers” utilizados, apesar de não mostrarem uma grande homologia entre si, apresentavam regiões extremamente conservadas de bactérias à plantas superiores, regiões estas que foram utilizadas para a construção destes “primers”.

Uma outra hipótese para explicar o insucesso em identificar o gene *psy* em *G. polyedra* pode ser o número de cópias deste gene no genoma desta alga. Corona *et al.* (1996) mostraram que em tomate este gene se encontrava em uma única cópia no genoma. A partir desta descoberta resolvemos investigar a variação na transcrição do gene da enzima RuBisCo, enzima-chave da fotossíntese. Em *G. polyedra*, a capacidade fotossintética é máxima no meio do dia e mínima no meio da noite (Prézelin *et al.*, 1977).

5.6 Northern Blots

A variação circadiana da transcrição de alguns genes têm sido amplamente evidenciada. A maior parte dos genes controlados circadianamente, descritos para plantas, estão ligados à fotossíntese, com o pico de expressão máxima durante a manhã (Wang & Tobin, 1998). Em *Drosophilla* as proteínas PER e TIM regula em conjunto a transcrição dos seus respectivos genes de maneira circadiana por um controle de retro-alimentação (Myers *et al.*, 1996). Outro organismo onde a transcrição circadiana de alguns genes (WC-1, WC-2 e FRQ) foi observada no fungo *N. crassa* (Crosthwaite *et al.*, 1997). Também Wang & Tobin (1998) encontraram um fator de transcrição CCA1 (“circadian clock associated 1”) associado à variação circadiana do RNAm do gene *lhcb* (“light-harvesting chlorophylla/b-protein”) em *Arabidopsis*.

No dinoflagelado *Amphidinium carterae*, o controle da transcrição dos genes da PCP e da LHC (“light-harvesting complex protein”) ocorre por de-

metilação de motivos de DNA específicos (CpG/CpNpG), localizados próximos ou dentro da região codificadora destes genes (Lohuis & Miller, 1998). Em *Licopersicum esculentum*, a enzima RuBisCo exibe um ritmo circadiano de transcrição (Martino-Catt & Ort, 1992).

Os resultados mostram que não existe variação na quantidade de transcritos de RuBisCo II (figura 22) e, portanto, este gene não é regulado no nível de transcrição em *G. polyedra*. Os outros genes já clonados neste organismo *lbp* e PCP também mostram uma regulação na tradução (Morse *et al.*, 1989). Na região promotora do gene da PCP em *G. polyedra* não foram encontradas sequências regulatórias conhecidas como TATA BOX ou os motivos CCACAC, GCCAAT ou WGATAR (Le *et al.*, 1997).

Milos *et al.* (1990) demonstraram que em *G. polyedra*, embora a expressão de LBP seja rítmica, os níveis de RNAm que a codificam permanecem constantes no período de 24 horas, sugerindo que o controle não seja transcricional. Recentemente, Mittag *et al.* (1994) demonstraram que a regulação da expressão da LBP ocorre na tradução. Estes resultados mostraram uma proteína repressora CCTR ("circadian-controlled translational regulator"), controlada pelo relógio biológico que se liga à região 3' do RNAm da LBP, impedindo a sua tradução. A atividade de ligação desta proteína também apresenta variação circadiana e a tradução ocorre quando o CCTR não está ligado ao RNAm (Mittag *et al.*, 1995). Em *Chlamydomonas reinhardtii*, Mittag (1996) encontrou um fator de regulação análogo ao CCTR que controlaria a tradução de três proteínas nesta alga (*CHLAMY-1*, *CHLAMY-2* e *CHLAMY-3*). Shapira *et al.* (1997) investigando a expressão gênica da enzima RuBisCo I em *Chlamydomonas* constataram que o gene que codifica a sub-unidade maior desta enzima que faz parte do repertório gênico do cloroplasto tendo sua transcrição regulada pela luz. Por outro lado, o gene da sub-unidade menor é nuclear e não é influenciado pela luz. Em *G. polyedra*, a RuBisCo II é codificado pelo núcleo e só apresenta a sub-unidade maior (Morse *et al.*, 1995). Os resultados sugerem que, talvez por ser o *RuBisCo II* em *G. polyedra* também um gene nuclear, a luz não influencie a sua transcrição, e, portanto, células do meio do dia e do meio da noite apresentam a mesma quantidade de transcritos (figura 22).

Em populações da cianobactéria *Synechococcus sp* crescendo no ambiente natural, foi verificado por Wyman (1999) uma oscilação circadiana na quantidade de transcritos dos genes da sub-unidade maior da RuBisCo (*rbcL*) e da glutamina sintetase. Em *Arabidopsis*, este gene é codificado no cloroplasto e também têm um controle transcricional (Isono *et al.*; 1997). Em tabaco, Shiina *et al.* (1998) observaram que a transcrição destes genes era independente da luz e que quando esta planta é colocada no escuro, ocorre um aumento da estabilidade do RNAm desta enzima para continuar com a mesma quantidade que as plantas expostas a luz. Já o gene da sub-unidade menor da RuBisCo (*rbcS*), era fotoregulado tanto por luz azul quanto por luz vermelha em *Pteris vittata* (Eilenberg *et al.*, 1998). Em milho o controle também é dependente de luz, a expressão do gene *rbcS* é ativada por luz branca mas não é ativada por luz vermelha (Bilang & Bogorad, 1996).

No caso do gene da RuBisCo II de *G. polyedra*, não foi possível verificar, com os experimentos desenvolvidos, se ocorre uma transcrição contínua deste gene ou se existe uma síntese em algum período do dia e o RNAm de RuBisCo II é estável o suficiente para que o seu “pool” seja constante.

5.7 Western Blots

Constatando-se que não ocorre variação na transcrição do gene RuBisCo II em *G. polyedra*, esperávamos uma variação circadiana no seu conteúdo protéico, para justificar a variação diária na capacidade fotossintética nesta alga.

O trabalho de Volkmandt & Hardeland (1984) mostra géis SDS-PAGE de proteínas totais de *G. polyedra* com subsequente incorporação de leucina [³H] visualizado em autoradiografias. Estes autores observaram que várias proteínas não identificadas apresentavam variação circadiana nas suas quantidades. Os padrões de síntese protéica nesta alga foram agrupados em três classes de proteínas: final do dia/ início da noite; meio da noite e final da noite/ início do dia (Morse *et al.*, 1996). Markovic *et al.* (1996) estimaram a

síntese de várias proteínas, pela quantidade de metionina S³⁵ incorporada em géis bi-dimensionais, durante a marcação *in vivo* a cada duas horas durante o ciclo circadiano. Os autores sugerem que a RuBisCo II e a PCP estão entre estas proteínas, pois, foram identificadas proteínas abundantes com o mesmo peso molecular (55 kDa e 32 kDa). Estes autores verificaram que apesar da síntese variar ritmicamente, não ocorreu variação nos níveis das proteínas sintetizadas em 24 h, e, apenas a proteína considerada como sendo a LBP apresentou uma variação na taxa de síntese concomitante à variação nos níveis da proteína, correlacionada com o ritmo de bioluminescência nesta alga. A partir do horário em que a síntese das proteínas ocorria, Markovic *et al* (1996) sub-dividiram estas proteínas em três classes, onde a RuBisCo pertence a segunda classe (síntese no início do CT 18) e a PCP pertence a terceira classe (síntese entre o CT 21 e CT 1).

Fagan *et al.* (1999) verificaram que a tradução da enzima de cloroplasto Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) era regulada de forma circadiana em *G. polyedra*. Estes autores clonaram dois genes nucleares que codificam para esta enzima, um correspondendo a isoforma citoplasmática e outro à proteína endereçada ao plastídeo. Com base nos dados da análise de microsequência destas proteínas, Fagan *et al.* (1999) concluíram que a síntese da isoforma do plastídeo é regulada pelo relógio biológico. Esta regulação não está relacionada aos níveis de RNAm, que permanecem constantes ao longo do ciclo, sugerindo um mecanismo de controle traducional, contrastando com a regulação transcricional da GAPDH de *Neurospora* (Shinohara *et al.*, 1998). Em *G. polyedra*, embora o ritmo da síntese de GAPDH tenha uma grande amplitude, os ritmos de abundância e atividade são extremamente atenuados, o que pode ser atribuído à grande meia-vida desta proteína (Fagan *et al.*, 1999).

Aparentemente em *G. polyedra* a síntese de RuBisCo II e de PCP não estão ligadas a fotorreceptores. Os resultados mostram que o conteúdo protéico da enzima RuBisCo II não se altera quando as culturas são mantidas por 36 h sob diferentes irradiações (azul, verde e vermelha) durante o período de claro (figura 24). Por outro lado, quando as células do flagelado *Chlorogonium elongatum* são transferidas de uma condição heterotrófica para

uma condição autotrófica existe um aumento de 10 vezes na quantidade da enzima RuBisCo que nesta alga é codificada pelo genoma do cloroplasto. Foi verificado que esta era uma resposta a luz azul, e que as clorofilas não eram os fotorreceptores envolvidos, mas sim os criptocromos (Boege *et al.*, 1981).

Prézelin *et al.* (1977) sugerem que em *G. polyedra* a oscilação observada na capacidade fotossintética está ligada à atividade da RuBisCO. Como não se observou uma alteração no conteúdo desta proteína nesta alga (figura 23), as regulações pós-traducionais devem ser responsáveis por esta variação.

Com base na literatura, podemos especular o que acontece com a enzima RubisCo em *G. polyedra*. Um dos controles sugeridos por Walter & Blobel (1981) é o processamento no retículo endoplasmático de proteínas secretadas pelo núcleo que devam ser endereçadas ao cloroplasto. Neste caso, apenas após este processamento, a proteína se tornaria funcional. Como a RuBisCo II é codificada pelo núcleo, talvez ela seja sintetizada fora do cloroplasto em *G. polyedra* e torne-se funcional após um direcionamento ao cloroplasto.

Apesar de não ter sido descrita, até o presente momento, a presença de RuBisCo ativase nesta alga, esse é um controle muito difundido entre os organismos fotossintetizantes. Knoetzel & Rensing (1990 b) também sugerem a existência de uma RuBisCo ativase em *G. polyedra*.

Uma explicação também aceitável seria a compartimentalização regulando a atividade da RubisCo. Segundo Borksenious *et al.* (1998), de 40 a 100% da enzima localiza-se dentro de pirenóides. Os pirenóides são estruturas proteináceas encontradas nos cloroplastos da maior parte da algas unicelulares, onde ocorre a fixação do CO₂. Resultados preliminares de KyungSuk & Fritz (em elaboração) comprovam a localização da RubisCo II em pirenóides também em *G. polyedra*. Estes autores também verificaram que ocorre uma alternância rítmica na presença e ausência de pirenóides nesta alga, e durante a noite esta organela não é observada. Pode-se inferir que a RuBisCo em *G. polyedra* só seja funcional quando dentro dos pirenóides, ou seja durante o dia.

Uma outra hipótese para explicar a diferença na capacidade fotossintética de *G. polyedra* são os mecanismos de regulação pós-traducionais ligados à fosfatases e quinases. Comolli *et al.*, (1994; 1996) sugerem que modificações pós-traducionais (por fosforilação/desfosforilação) estejam envolvidas no mecanismo central do relógio biológico em *G. polyedra*. Em *Drosophilla* Edery *et al.* (1994) mostraram que além das regulações transcricionais e traducionais existe um controle rítmico da fosforilação de *PER* pós-tradução. A fosforilação também regula a atividade de carboxilases em *Bryophyllum*, a qual parece neste caso estar sobre controle circadiano (Carter *et al.*, 1991).

O conteúdo protéico da PCP também não apresenta variação circadiana ou após exposição das culturas por 36 h a diferentes irradiações (figuras 23 e 24). Apesar de não ocorrer variação nos níveis destas proteínas ao longo do dia, já foi demonstrado que a ligação desta proteína ao PS II varia. Segundo Knoetzel & Rensing (1990b) durante o dia a PCP está acoplada ao PS II, aumentando o tamanho da antena captadora de luz e a noite este complexo PCP está “solto” no estroma. Elich *et al.* (1993) demonstraram que as proteínas centrais do PSII, D1; D2 e CP43 sofrem desfosforilação estimulada pela luz *in vivo*. Talvez seja esta também a regulação da PCP (em ligar-se ou desligar-se do PS II) em *G. polyedra*, pois, esta proteína também faz parte deste complexo.

6. CONCLUSÕES

Gonyaulax polyedra é uma alga unicelular marinha que tem sido extremamente utilizada para se estudar os mecanismos celulares e moleculares dos relógios biológicos.

Apesar de já ser conhecido que em *G. polyedra* a capacidade fotossintética é ritmica, a causa desta variação circadiana ainda não foi esclarecida. Nesta Tese enfocamos os experimentos nos processos de fotossíntese. Estes envolvem a captação de luz por pigmentos auxiliares da clorofila, os carotenóides, que também desempenham um importante papel na proteção dos cloroplastos contra as EROs; e regulação de proteínas capazes de catalisar a montagem do esqueleto carbônico com a liberação de oxigênio.

Em nossos resultados mostramos que:

- Os pigmentos carotenóides presentes em *G. polyedra* são eficientes em suprimir o $O_2(^1\Delta g)$ *in vitro* confirmando o seu papel de antioxidantes nos cloroplastos desta alga;
- Os cistos de *G. polyedra* apresentam uma composição de pigmentos diferente das células mastigotas, com diminuição da clorofila *a* e de β -caroteno e aumento de peridinina.
- Os experimentos de Western Blot mostraram que as duas proteínas investigadas encontram-se presentes nos cistos, mas apenas a PCP se encontra em menor quantidade, sugerindo que nos cistos uma maior quantidade de peridinina estaria fora do complexo PCP, desempenhando uma função estrutural.
- Existe uma variação circadiana na quantidade de β -caroteno em *G. polyedra* e este ritmo assim como a indução de sua síntese são mediados por um fotorreceptor de luz azul/ verde;
- A quantidade da proteína PCP não varia ao longo do dia, mesmo quando as células são mantidas em iluminação constante atenuada;
- A enzima RuBisCo II nesta alga tem um controle pós-tradução, pois os níveis de RNAm e de proteínas não variaram ao longo do dia;

- A síntese de PCP e RuBisCo II aparentemente não estão relacionadas à um fotoreceptor único ou exclusivo;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, R.C.; Stjernholm, R.L. & Steele, R.H. (1972). Evidence for the generation of an eletronic excitation state (s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 47: 679.
- Anderson, D.M.; Kulis, D.M. & Binder, B.J. (1984). Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis* cyst yield in batch cultures. **J. Phycol.**, 20: 418.
- Armstrong, G.A. ; Schmidt, A., Sandmann, G. & Hearst, J.E. (1993). Genetic and biochemical characterization of carotenoid biosynthesis mutants of *Rhodobacter capsulatus*. **Methods Enzymol.**, 214: 297.
- Armstrong, G.A.. & Hearst, J.E. (1996). Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. **FASEB J.**, 10: 228.
- Asada, K. & Takahashi, M. (1987). Photoinhibition. Kyle, D.J.; Osmond, C.B. e Arntzen, C.J. eds, Elsevier, Amsterdam.
- Asano C.S., Colepicolo, P. & Aida, E. (1995). Nitrate reductase activity in the diatom *Biddulphia longicruris*: characterization and daily oscillation. **Bolm. Inst. Oceanogr. São Paulo**, 43: 123.
- Asano, C.S.; Okamoto, O.K.; Hollnagel, H.C.; Stringher, C.G.: Oliveira, M.C. & Colepicolo, P. (1996). The activity of SOD oscillates in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. **Ciência e Cultura**, 48: 64.

- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D. Seidman, J.G.; Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.). (1987). Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Assoc, and Wiley Interscience, New York.
- Baima, S.; Caratolli, A.; Macino, G. & Morelli, G. (1992). Photoinduction of *albino-3* gene expression in *Neurospora crassa* conidia. **J. Photochem. Photobiol. B.**, 15: 233.
- Balzer, I. & Hardeland, R. (1991). Photoperiodism and effect of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. **Science**, 253: 795.
- Balzer, I. & Hardeland, R. (1992). Effects of indoleamines and short photoperiods on the encystment of *Gonyaulax polyedra*. **Chronobiol Int.**, 9: 260.
- Bar, E.; Rise, M.; Vishkautsan, M. & Arad, S. (1995). Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. **J. Plant Physiol.**, 146: 534
- Bartley, G.E; Vitanen, P.; Bacot, K.O. & Scolnik, P. (1992). A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of carotenoi biosynthesis pathway. **J. Biol. Chem.**, 267: 5036.
- Batra, P.P. & Rilling, H.C. (1964). On the mechanism of photoinduced carotenoid synthesis: aspects of the photoinductive reactions. **Arch. Biochem.**, 107: 485.
- Behrmann, G. & Hardeland, R. (1995). Ultrastructural characterization of asexual cysts of *Gonyaulax polyedra* Stein (Dinoflagellata). **Protoplasma**, 185: 22.
- Bibby, B.T. & Dodge, J.D. (1972). The encystment of a freshwater dinoflagellate: a light and electron- microscopical study. **Br. Phycol.**, 7: 85.

- Bilang, R & Bogorad, L. (1996). Light dependent developmental control of *rbcS* gene expression in epidermal cell of maize leaves. **Plant Molec. Biol.**, 31: 83.
- Binkley, S. (1993). Structures and molecules involved in generation and regulation of biological rhythms in vertebrates and invertebrates. **Experientia**, 49: 648.
- Björkman, O. & Schäfer, C. (1989). Biosynthesis of phytoene from isopentenyl pyrophosphate by a *Neurospora* enzyme system. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, 323: 309.
- Boege, F.; Westhoff, P.; Zimmerman, R & Zetsche, K. (1981). Regulation of synthesis of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase and its subunits in the flagellate *Chlorogonium elongatum*. The effect of light and acetate in the synthesis and the degradation of the enzyme. **Eur. J. Biochem.**, 113: 581.
- Bognar, L.K.; Hall, A.; Adam, E.; Thain, S.C.; Nagy, F. & Millar, A.J. (1999). The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 96: 14652.
- Bonk, M.; Hoffman, B.; Von Lintig, J.; Schledz, M.; Al-Babili, S.; Hoibrera, E.; Kleing, H. & Beyer, P. (1997). Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes *in vitro* reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. **Eur. J. Biochem.**, 247: 942.
- Borksenious, O.N.; Manson, C.D. & Moroney, J.V. (1998). The intracellular localization of ribulose-1,5-biphosphate carboxilase/oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiol.**, 116: 1585.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyt. Biochem.**, 72: 248.

- Braumann, Th.; Weber, G. & Grimme, L.H. (1982). Carotenoid and chlorophyll composition of light-harvesting and reaction center proteins of the thylakoid. **Photobiochem. Photobiophys.**, 4: 1.
- Brigagão, M.R.P.L. & Colepicolo, P. (1996). Oscillation in superoxide anions. Release by polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by human saliva. **Biol. Rhythm Res.**, 27: 261.
- Britton, G. (ed) (1983). The biochemistry of natural pigments, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Britton, G. & Young, A.J. (eds.) (1993). Carotenoids in photosynthesis. Chapman & Hall. London, pp.409.
- Broda, H.; Johnson, C.H.; Taylor, W.R. & Hastings, J.W. (1989). Temperature dependence of phase response curves for drug-induced phase-shifts. **J. Biol. Rhythms**, 4: 327.
- Buch, K. (1995). FAD is a further essential cofactor of the NADP(H) and O₂ dependent zeaxanthin epoxidase. **FEBS lett**, 376: 45
- Buchard, R.P. & Hendricks, S.B. (1969). Action spectrum for carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. **J. Bacteriol.**, 97: 1165.
- Cadenas, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. **Ann. Rev.Biochem.**, 58: 79.
- Caratolli, A.; Ballario, R-N; Morelli, G. & Macino, G. (1991). The *Neurospora crassa* carotenoid biosynthesis gene *al-3* reveals highly conserved regions among prenyl-transferases. **J. Biol. Chem.**, 266: 5854.

- Cashmore, A .R.; Jarillo, J. A .; Wu, Y-J; & Liu, D. (1999). Cryptochromes: blue light receptors for animals and plants. **Science**, 284: 760.
- Cerdá-Olmedo, E & Torres-Matínéz, S. (1979). The genetics of *Phycomyces blakesleanas*, **Pure Appl. Chem.**, 51: 631
- Cerdá-Olmedo, E. (1987). Production of carotenoids with fungi. **Methods Enzymol.**, 110: 220.
- Chapman, A D. & Pfister, L.A (1995). The effect of temperature and nitrogen on the encystment and growth of freshwater dinoflagellates *Peridiniunz cinctum* and *Peridinium willey* in culture (Dinophyceae). **J. Phycol**, 1995: 355.
- Chisholm, S. W. (1981). Temporal patterns of cell division in unicellular algae. **Can. Bull. Fish. aquat. Sci.**, 210: 150.
- Church, M.C. & Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81: 1991.
- Claes, H. (1966). Maximal effectiveness of 670 μm in the light dependent carotenoid synthesis in *Chlorella vulgaris*. **Photochem. Photobiol.**, 5:515.
- Clegg, M.T. (1993). Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90: 363.
- Cohen, D. & Schiff, J.A. (1976). Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts. Photoregulation of the transcription of chloroplastic and cytoplasmic ribosomal RNAs. **Arch. Biochem. Biophys.**, 177: 201.

- Colepiccolo, P.; Camarero, V.P.C. & Hastings, J.W. (1992). A circadian rhythm on the activity of SOD in the photosynthetic algae *Gonyaulax polyedra*. **Chronobiol. Internl**, 9: 244.
- Comolli,J.; Taylor, W. & Hastings, J.W. (1994). An inhibitor of protein phosphorylation stops the circadian oscillator and blocks light-induced phase shifting in *Gonyaulax polyedra*. **J. Biol. Rhythms**, 9: 13.
- Comolli,J.; Taylor, W.; Rehman, J. & Hastings, J.W. (1996). Inhibitors of serine/threonine phosphoproteins phosphatases alter circadian properties in *G. polyedra*. **Plant Physiol.**, 111: 285.
- Corona, V.; Aracri, B.; Kosturkova, G.; Bartley, G. Pitto, L.; Giorgetti, L.; Scolnik, P. & Giuliano, G. (1996). Regulation of carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. **Plant J.**, 9: 505.
- Crosthwaite, S.K.; Dunlap, J.C. & Loros, J.J. (1997). *Neurospora wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses and the origin of circadian rhythmicity. **Science**, 276: 763.
- Crosthwaithe, S.K.; Loros, J.J. & Dunlap, J.C. (1995). Light-induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in frequency transcript. **Cell**, 81: 1003.
- Davies, K.J.A. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I- General aspects. **J. Biol. Chem.**, 262: 9895.
- De Fabo, E.C.; Harding, R.W. & Schropshire, W.Jr. (1976). Action spectrum between 260 and 800 nanometers for the photoinduction of carotenoid biosynthesis em *Neurospora crassa*. **Plant Physiol.**, 57: 44.

- Deng, X.-W. (1994). Fresh view of light signal transduction in plants. **Cell**, 76: 423.
- Derenne, S.C.; Largeau, C.; Berkaloﬀ, B.; Rousseau, B.; Wilhelm, C. & Hatcher, P.G. (1992). Non-hydrolysable macromolecular constituents from outer walls of *Chlorella furca* and *Nonochlorum eukaryotum*. **Phytochemistry**, 31:1923.
- Di Mascio, P.; Hollnagel, H.C.; Sperança, M. & Colepicolo, P. (1995). Diurnal rhythm of β -carotene in photosynthetic algae *Gonyaulax polyedra*. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, 376: 297.
- DiMascio, P.; Bechara, E. & Rubin, J.C. (1992). Dioxygen NIR FT-emission ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma^-_g$) and Raman spectra of 1,4-dimethylnaphthalene endoperoxide: A source of singlet molecular oxygen. **Appl. Spectr.**, 46: 236.
- Dogbo, O.; Barda, F.; Laferriere, A.; Quennemet, J.; Brangeon, J. & Camara, B. (1988). Metabolism of plastid terpenoids. I- biosynthesis of phytoene in plastid stroma isolated from higher plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85: 7054.
- Dolphin, B.H. (1970). Photoinduced carotenogenesis in chlorotic *Euglena gracilis*. **Plant Physiol**, 46: 685.
- Dunlap, J.C. (1996). Genetic and molecular analysis of circadian rhythms. **Ann. Rev. Genet.**, 30: 579.
- Dunlap, J.C.; Loros, J.J. & Crosthwaite, S.K. (1999). Eukaryotic circadian systems: cycles in common. **Genes Cells**, 4: 1.
- Eckardt, N.A.; Snyder, G.W.; Portis Jr., A.R. (1997). Growth and photosynthesis under high and low irradiance of *Arabidopsis thaliana* antisense mutants with reduced ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/ oxygenase activase content. **Plant Physiol.**, 113: 575.

- Edery, I; Rutila, J. & Rosbash, M. (1994). Phase-shifting of the circadian clock by induction of the *Drosophilla* period protein. **Science**, 263: 237.
- Eich, T.D.; Edelman, M. & Mattoo, A.K. (1993). Dephosphorylation of photosystem II core protein is light-regulated *in vivo*. **EMBO J.**, 12: 4857.
- Eilenberg, H; Hanania, U.; Stein, H. & Zilberstein, A. (1998). Characterization of *rbcS* genes in the fern *Pteris vitatta* and their photoregulation. **Planta**, 206: 204.
- Eslava, A.P.; Alvarez, M.I.; Cerdá-Olmedo, E. (1974). Regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces* by vitamin A and β -ionone. **Europ. J. Biochem.**, 48: 617.
- Fagan, T.; Morse, D. & Hastings, J.W. (1999). Circadian synthesis of a nuclear-encoded chloroplast Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is translational controlled. **Biochem.**, 38: 7689.
- Fong, F & Schiff, J.A. (1979). Blue-light induced absorbance changes associated with carotenoids in *Euglena*. **Planta**, 146: 119.
- Fontes, M.; Ruiz-Vazquez, R.; Murillo, F.J. (1993). Growth-phase dependence of the activation of a bacterial gene for carotenoid synthesis by blue light. **EMBO J.**, 12: 1265.
- Foote, C.S.; (1968). Mechanisms of photosensitized oxidation. **Science**, 162: 963.
- Foote, C.S.; Denny, R.W.; Weaver, L.; Chang, Y.; Peters, J. (1970). Chemistry of singlet oxygen. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 171: 139.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. (1999). Leaves in the dark see light. **Science**, 284: 599.

- Fritz, L; Anderson, D.M. & Triemer, R.E. (1989). Ultrastructural aspects of sexual reproduction in the red tide flagellate *Gonyaulax tamarensis*. **J. Phycol.**, 25: 95.
- Fritz, L.; Morse, D. & Hastings, J.W. (1990). The circadian bioluminescence rhythm of *Gonyaulax* is related to daily variations in the number of light-emitting organelles. **J. Cell Sci.**, 95: 321.
- Frosch, S. & Mohr, H. (1980). Analysis of light-controlled accumulation of carotenoids in mustard (*Sinapsis alba*) seedlings. **Planta**, 148: 279.
- Giuliano, G.; Bartley, G.E.; Scolnik, P.A. (1993). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. **Plant Cell**, 5: 379.
- Golombeck, D. Cardinali, D. & Aguilar-Roblero, R. (1997). Mecanismos de temporização em vertebrados. In: Cronobiologia: princípios e aplicações, 2^a. edição (Marques, N & Menna-Barreto, L.; eds.) EDUSP, pp.163.
- Goodwin, T.W. (1976). Chemistry and biochemistry of plant pigments, vol.1 e 2, Academic Press Inc., Londres.
- Goodwin, T.W. (1980). The biochemistry of carotenoids, vol. 1, Plants, Chapman & Hall Ltd., Nova Iorque.
- Goodwin, T.W. (1988). Plant pigments, Academic Press Inc., Londres.
- Guillard, R.R.L. & Ryther, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms: *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun. **Can. J. Microbiol.**, 8: 229.

- Halliwell, B. & Guttendrich, J.M.C. (eds) (1999). Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford University Press, Nova Iorque, 543 p.
- Hardeland, R. & Rodriguez, C. (1995). Versatile melatonin: a pervasive molecule serves various functions in signalling and protection. **Chronobiology Int.**, 12: 157.
- Hardeland, R. (1994). Induction of cyst formation by low temperature in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* Stein: dependence on circadian phase and requirement of light. **Experientia**, 50: 60.
- Hardeland, R.; Balzer, I.; Poeggeler, B.; Fuhrberg, B.; Uria, H.; Behrmann, G.; Wolf, R.; Meyer, T.J. & Reiter, R.J. (1995). On the primary functions of Melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation and scavenging of free radicals. **J. Pineal Res.**, 18:104.
- Harding, R.W. & Shropshire, Jr. (1980). Photocontrol of carotenoid biosynthesis. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 31: 217.
- Harding, R.W. & Turner, R.V. (1981). Photoregulation of the carotenoid biosynthetic pathway in albino and white collar mutants of *Neurospora crassa*. **Plant Physiol.**, 68: 745.
- Hastings, J.W. (1959). Unicellular clocks. **Ann. Rev. Microbiol.**, 13: 297.
- Hastings, J.W. (1983). Biological diversity, chemical mechanism and evolutionary origin of bioluminescence systems. **J. Mol. Evol.**, 19: 309.
- Hastings, J.W. & Dunlap, J.C. (1986). Cell-free components in dinoflagellate bioluminescence-The particular activity: scintillons, the soluble components: luciferase, luciferin and luciferin binding protein. **Meth. Enzym.**, 133: 307.

- Hastings, J.W. & Schweiger, H.G. (eds.) (1976). The Molecular Basis of Circadian Rhythms. Abakon Verlagsges., Berlin.
- Hastings, J.W.; Astrachan, L. & Sweeney, B.M. (1961). A persistent daily rhythm in photosynthesis. **J. Gen. Physiol.**, 45: 69.
- Hastings, J.W.; Rusak, B. & Boulos, Z. (1991). Circadian rhythms: the physiology of biological timing. Offprints from neural and integrative animal physiology (ed. Prosser, C.L.). Wiley-Liss. New York, p. 435.
- Havaux, M. (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. **Trends Plant Sci.**, 3: 147.
- Hayashi, N.R.; Arai, H.; Kodama, H. & Igarashi, Y. (1999). The cbbQ genes , located downstream of the form I and form II RuBisCo genes, affect the activity of both RuBisCos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265: 177.
- Herman, C.A.; Im, C.S. & Beale, S.I. (1999). Light-regulated expression of the *gsa* gene encoding the chlorophyll biosynthetic enzyme glutamate 1-semialdehyde aminotransferase in carotenoid deficient *Chlamydomonas reinhardtii* cells. **Plant Mol. Biol.**, 39: 289.
- Heery, D.M.; Gannon, F. & Powell, R. (1990). A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. **Trends Genet.**, 6: 173.
- Hoffmann, E.; Wrench,, P.M. Sharples, F.P.; Hiller, F.G.; Welte, W. & Diederichs, K. (1996). Structural basis of light-harvesting by carotenoids: peridinin-chlorophyll *a*-protein from *Amphidinium carterae*. **Science**, 272: 1788.
- Holm-Hansen, O. (1969). Algae: amounts of DNA and carbon in single cells. **Science**, 163: 87.

- Hoshino, T.; Fujii, R.; Nakahara, T. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the *crtB* gene of *Thermus thermophilus* HB27, an extreme thermophile producing carotenoid pigment. **Appl. Environ. Microbiol.**, 59: 3150.
- Hsiao, K.C. & Börn, L.O. (1982). Aspects of photoinduction of carotenogenesis in the fungus *Verticillium agaricinum*. **Physiol. Plant.**, 54: 235.
- Hundle, B.S. & Hearst, J. (1991). Carotenoids. **The Spectrum**, 4:1.
- Hundle, B.S.; O'Brien, D.A.; Beyer, P.; Kleinig, H.; Hearst, J.E. (1993). *In vitro* expression and activity of lycopene cyclase and β -carotene hydroxylase from *Erwinia herbicola*. **FEBS Lett.**, 315: 329
- Iglesias-Prieto, R. & Trench, R.K. (1997). Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II Response of chlorophyll-protein complexes to different photon-flux densities. **Mar. Biol.**, 130: 23.
- Ilan, J. (ed.) (1987). Translational regulation of gene expression New York, Plenum Press. 350 p.
- Ishida, H.; Shimizu, S.; Makino, A. & Mae, T. (1998). Light-dependent fragmentation of the large subunit of ribulose- 1,5- bisphosphate carboxylase/ oxygenase in chloroplasts isolated from wheat leaves. **Planta**, 204: 305.
- Isono, K.; Niwa, Y.; Satoh, K. & Kobayashi, H. (1997). Evidence for the transcriptional regulation of plastids photosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana* roots. **Plant Physiol.**, 114: 623.

- Jacobshagen, S.; Kindle, K.L. & Johnson, Q-H. (1996). Transcription of *CAB II* is regulated by the biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Molec. Biol.**, 31: 1173
- Jayaram, M.; Pesti, D. & Delbruck, M. (1979). Light-induced carotene synthesis in *Phycomyces*. **Exp. Mycol.**, 3: 42.
- Johansen, J.E.; Svec, W.; Liaaen-Jensen, S. & Haxo, F.T. (1974). Carotenoids of the dinophyceae. **Phytochem.**, 13: 2261.
- Johnsen, G & Sakshaug, E (1993). Chromoprotein and pigment-dependent modeling of spectral light absorption in two dinoflagellates *Prorocentrum minimus* e *Heterocapsa pygmaea*. **J. Plant Physiol.**, 29: 627.
- Johnson, C.H. & Hastings, J.W. (1986). The elusive mechanism of the circadian clock.. The quest for the chemical basis of the biological clock is beginning to yield tantalizing clues. **Am. Sci.**, 74: 29
- Johnson, C.H. & Hastings, J.W. (1989). Circadian phototransduction: phase resetting and frequency of the circadian clock of *Gonyaulax* cells in red light. **J. Biol. Rhythms** 4: 417.
- Johnson, C.H.; Inoue, S.; Flint, A. & Hastings, J.W. (1985). Compartmentalization of algal bioluminescence: autofluorescence of bioluminescent particles in the dinoflagellate *Gonyaulax* as studied with image intensified video microscopy and flow cytometry . **J. Cell. Biol.**, 100: 1435.
- Karvourni, Z.; John, I; Taylor, J.; Watson, C.; Turner, A. J. & Grierson, D. (1995). Isolation and characterization of a melon cDNA clone encoding *phytoeno synthase*. **Plant Mol. Biol.**, 27: 1153.

- Kellog, E.W. & Fridovich, I. (1975). Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by xanthine oxidase. **J. Biol. Chem.**, 250: 8812.
- Khan, A U.; Mei, Y.H. & Wilson, T. (1992). A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89: 11426.
- Kippert, F. (1985). Chrono-colloquium. On the origin of circadian rythms. **J. Interdiscipl. Cycle Res.**, 16: 77.
- Knoetzel, J. & Rensing, L. (1990a). Characterization of the photosynthetic apparatus from the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* I. Pigment and polypeptide composition of the pigment-protein complexes. : **J. Plant Physiol.**, 136: 271.
- Knoetzel, J. & Rensing, L. (1990b). Characterization of the photosynthetic apparatus from the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* II. Circadian rhythmicity of photosynthesis and the supramolecular oragnization of pigment - protein complexes. **J. Plant Physiol.**, 136: 280.
- Koka, P, & Song, P-S. (1977). The chromophore topography and binding environment of peridinin-chlorophyll *a*-protein complexes from marine dinoflagellate algae. **Biochim. Biophys. Acta**, 495: 220.
- Kondo, T.; Mori, T. Lebedeva, N.V.; Aoki, S. Ishura, M & Golden, S. (1997). Circadian rhythms in rapidly dividing Cyanobacteris. **Science**, 275: 224.
- Konopka, R.J. & Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 68: 2112.
- Kreps, J,A.; & Simon, A .E. (1997). Environmental and genetic effects on circadian regulated gene expression in *Arabdopsis*. **Plant Cell**, 9: 927.

- Krinsky, N.I. (1984). Biology and photobiology of singlet oxygen. Oxygen radicals in chemistry and biology. (eds Bors, W; Saran, M; Tait, D. & De Gruyter, W.). New York, Plenum Press , p. 453
- Krinsky, N.I. (1989). Antioxidant function of carotenoids. **Free Rad. Biol. Med.**, 7:617.
- Krinsky, N.I. (1998). Overview of lycopene, carotenoids and disease prevention. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 218: 95.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680.
- Lang-Feulner, J & Rau, W. (1975). Redox dyes as artificial photoreceptors in light-dependent carotenoid synthesis. **Photochem. Photobiol.**, 21: 179.
- Le, Q.H.; Markovic, P.; Hastings, J.W.; Jovine, R.V.M. & Morse, D. (1997). Structure and organization of the peridinin-chlorophyll *a*-binding protein gene in *Gonyaulax polyedra*. **Mol. Gen. Genet.**, 255: 595.
- Lewy, A.J.; Sack, R.L.; Miller, S. & Hoban, T.M. (1987). Antidepressant and circadian phase-shifting effect of light. **Science**, 235: 352.
- Liaaen-Jensen, S. (1978). Marine Natural Products. Scheuer, P.J. (ed.) Academic Press, Nova Iorque. p18.
- Liu, Z.; Taub, C.C. & McClung, C.R. (1996). Identification of an *Arabidopsis thaliana* RCA minimal promoter regulated by light and the circadian clock. **Plant Physiol.**, 112: 43.

- Lohuis, M.R. ten & Miller, D.J. (1998) Light-regulated transcription of genes encoding peridinin:chlorophyll *a*:protein and the major intrinsic light-harvesting complex protein in the dinoflagellate *Amphidinium carterae* Hulburt (Dinophyceae). **Plant Physiol.**, 117: 189.
- Lonergan, T.A. (1984). Regulation of the photosynthetic reactions by the biological clock.. **Photochem. Photobiol.**, 40: 789.
- Lotan, T. & Hirschberg, J. (1995). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -c-4-oxygenase, that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. **FEBS Lett.**, 364: 125.
- Lyman, H. (1980). Synergism between yellow and red light for the chlorophyll synthesis in *Euglena*. **J. Cell Biol.**, 87: MC 1421.
- Ma, D.; Cook, D.N.; O'Brien, D.A.; Hearst, J.E. (1993.). Analysis of the promoter and regulatory sequences of an oxygen-regulated *bch* operon in *Rhodobacter capsulatus* by site directed mutagenesis. **J. Bacteriol.**, 175: 2037.
- Machabée, S.; Wall, L. & Morse, D. (1994). Expression and genomic organization of a dinoflagellate gene family. **Plant Mol. Biol.**, 25: 23
- Markovic, P.; Roennenberg, T. & Morse, D. (1996). Phased protein synthesis at several circadian times does not change protein levels in *Gonyaulax*. **J. Biol. Rhythms**, 11: 57.
- Marques, N.; Stingher, C.G.; Asano, C.S. & Colepicolo, P. (1997). Aspectos celulares e moleculares dos ritmos biológicos. In: Cronobiologia: princípios e aplicações, 2^a. edição (Marques, N & Menna-Barreto, L.; eds.) EDUSP, pp.163.

- Marrs, B. (1981). Mobilization of the genes for photosynthesis from *Rhodopseudomonas capsulata* by a promiscuous plasmid. **J. Bacteriol.**, 146:1003
- Martino-Catt, S. & Ort, D.R. (1992). Low temperature interrupts circadian regulation of transcriptional activity in chilling-sensitive plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89: 3731.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **J. Biol. Chem.**, 243: 5753.
- Millar, A.J. (1997). Circadian Rhythms: Phasing Time. **Curr. Biol.**, r474.
- Millar, A.J.; Carré; Strayer, C.A.; Chua, N-H. & Kay, S.A. (1995). Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by Luciferase imaging. **Science**, 267: 1163
- Milos, P.; Morse, D. & Hastings, J.W. (1990). Circadian control over synthesis of many *Gonyaulax* proteins is at translational level.. **Naturwissenschaften**, 77: 87.
- Misawa, N.; Nakagawa, M.; Kobayashi, K.; Yamano, S.; Izawa, Y.; Nakamura, K. & Harashima, K. (1990). Elucidation of the *Erwinia uredovae* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed by *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, 172: 6704.
- Mittag, M. (1996). Conserved circadian elements in phylogenetically diverse algae. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 10: 14401.
- Mittag, M.; Lee, D.H. & Hastings, J.W. (1994). Circadian expression of the luciferin-binding protein correlates with the binding of a protein to the 3' untranslated region of its RNAm. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.**, 91: 5257.

- Mittag, M.; Lee, D-H. & Hastings, J.W. (1995). Evolution of the circadian clocks. (Hokkaido Univ. Press- Sapporo, Japan) pp.97.
- Monroe, B.M. (1985). Singlet oxygen in solutions. Lifetimes and reaction rate constants. Singlet oxygen, Vol. I. Frimer, A. A. (ed.). Boca Ratón, FL, USA, CRC Press, pp. 177.
- Moore-Ede, M.C. (ed) (1982). The clock that time us. Cambridge, USA; Harvard University Press. 140 p.
- Moore-Ede, M.C. (1983). Circadian timekeeping in health and disease. **N.Engl.J.Med.**, 309: 469.
- Moreno, C. Fischer, F.M. & Mena-Barreto, L. (1997). Aplicações da cronobiologia. In: Cronobiologia: princípios e aplicações, 2ª. edição (Marques, N & Menna-Barreto, L.; eds.) EDUSP, pp. 239.
- Morse, D.; Hastings, J.W. & Ronneberg, T. (1994). Different phase-responses of the two circadian oscillators in *Gonyaulax*. **J. Biol. Rhythms**, 9: 263.
- Morse, D.; Salois, P.; Markovic, P. & Hastings, J.W. (1995). A nuclear encoded form II Rubisco in dinoflagellates. **Science**, 268: 1622.
- Morse, D.S.; Fritz, L. & Hastings, J.W. (1990). What is the clock? Translational regulation of circadian bioluminescence. **Trends Biochem. Sci.**, 1990, 15: 262.
- Morse, D.S.; Markovic, P. & Roenneberg, T. (1996). Several clocks may simplify the circadian system of *Gonyaulax*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 29: 101.

- Morse, D.S.; Milos, P.M.; Roux, E. & Hastings, J.W. (1989). Circadian regulation of bioluminescence in *Gonyaulax* involves translational control. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** 86: 172.
- Murtas, G. & Millar, A.J. (2000). How plants tell the time. **Curr. Opin. Plant Biol.**, 3: 43.
- Myers, M.P.; Wager-Smith, K.; Rothenfluh-Hilfiker, A.. & Young, M. (1996). Light induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophylla* circadian clock. **Science**, 271: 1736.
- Nishinaga, A.. (1977). Biochemical and medical aspects of active oxygen. (eds Hayaishi, O. & Asada, K.). University park press, Tokyo, p 13.
- Norris, B. & Miller, D. (1994). Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the precursor of the peridinin-chlorophyll a-binding protein from the dinoflagellate *Symbiodinium*. **Plant Molec. Biol.** 24: 673.
- Oelmüller, R & Mohr, H. (1985). Carotenoid composition in milo (*Sorghum vulgare*) shoots as affected by phytochrome and chlorophyll. **Planta**, 164: 390.
- Okamoto, O.K.; Shao, L.; Hastings, J.W. & Colepicolo, P. (1999). Acute and chronic effect of toxic methals on viability, encystment na d bioluminescence in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. **Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, 123: 75.
- Palmer, J.D. (1996). Rubisco surprises in dinoflagellates. **Plant Cell**, 8: 343

- Pecker, I.; Chamovitz, D.; Linden, H.; Sandman, G. & Hirschberg, J. (1992). A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to ξ -carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, 89: 4962.
- Perchorowicz, J.T.; Raynes, D.A. & Jensen, R.G. (1981). Light limitation of photosynthesis and activation of ribulose biphosphate carboxylase in wheat seedlings. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, 78: 2985.
- Pinto Jr, E. ; Catalani, L.H.; Lopes, N.P.; Di Mascio, P. & Colepicolo, P. (2000). Peridinin as the major biological carotenoid quencher of singlet oxygen in *Gonyaulax polyedra*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 268: 496.
- Pittendrigh, C.S. & Minis, C. (1979). The entrainment of circadian oscillation by light and their role as photoperiodic clock. **Am. Nat.**, 98: 261.
- Prézelin, B. B. & Ley, A.C. (1980). Photosynthesis and chlorophyll a fluorescence rhythms in marine phytoplankton. **Mar. Biol.**, 55: 295.
- Prézelin, B.B.; Meeson, B.W. & Sweeney, B.M. (1977). Characterization of photosynthetic rhythm in marine dinoflagellates: I pigmentation, photosynthetic capacity and respiration. **Plant Physiol.**, 60: 384.
- Price, J.L.; Dembiska, M.E.; Young, M.W. & Rosbash, M. (1995). Supression of period protein abundance and circadian cycling by the *Drosophila* clock mutation timeless. **Embo J.**, 14: 4044.
- Rabadji, R.C.; Brigagão, M.R.P.L.; Camarero, V.C.P.C. & Colepicolo, P. (1996). Oscillation of reactive oxygen species released by activated neutrophils. **Biol. Rhythm Res.**, 27: 269.

- Ramalho, C.B.; Hastings, J.W. & Colepicolo, P. (1995). Circadian oscillations of Nirate Reductase activity in *Gonyaulax polyedra* is due to changes in cellular protein levels. **Plant Physiol.**, 107: 1.
- Rau, W & Schrott, E.L. (1979). Light-mediated biosynthesis in plants. **Photochem. Photobiol.**, 30: 755.
- Rau, W & Schrott, E.L. (1987). Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms, vol. 1. Senger, H. (ed.). CRC Press. Inc., Boca Raton. 169p.
- Rau, W. (1976). Photoregulation of carotenoid biosynthesis in plants. **Pure Appl. Chem.**, 47:237.
- Read, B.A. & Tabita, F.R. (1994). High substrate specificity factor ribulose biphosphate carboxilase/ oxygenase from eukariotic marine algae and properties of recombinant cyanobacterial RuBisCo containing "algal" residue modifications. **Arch. Biochem. Biophys.**, 312: 210.
- Reinbothe, S. & Reinbothe, C. (1996). The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis. **Eur. J. Biochem.**, 237-323.
- Rensing, L; Taylor, W; Dunlap, J. & Hastings, J.W. (1980). The effect of protein synthesis inhibitors on *Gonyaulax* clock. **J. Comp. Physiol**, 138: 9
- Roennenberg, T. & Morse, D. (1993). Two circadian oscillators in the cell. **Nature**, 362: 362.
- Roennenberg, T. & Morse, D. (1994). Two photoreceptors influence the circaian clock of a unicellular alga. **Naturwissenschaften**, 81: 343.

- Roennenberg, T.; Colfax, G.N. & Hastings, J.W. (1989). A circadian rhythm of population behaviour in *Gonyaulax polyedra*. **J. Biol. Rhythms**, 4: 201.
- Ronen-Taranzi, M.; Lieman-Hurwitz, J.; Gabay, C.; Orus, M.I. & Kaplan, A. (1995). The genomic region of *rbcLS* in *Synechococcus* sp. PCC 7942 contains genes involved in the ability to grow under low CO₂ concentration and in chlorophyll biosynthesis. **Plant Physiol.**, 108: 1461.
- Saiki, R.K.; Chang, C.A., Levenson, C.H.; Warren, T.C.; Rohem, C.D. & Ehrlich, H.A. (1988). Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatic amplified DNA and non-radioactive allele-specific oligonucleotides probes. **N. Engl. J. Med.**, 319: 537.
- Salvucci, M.E.; Portis Jr., A.R. & Ogren, W.L. (1986). Purification of ribulose-1,5 biphosphate carboxylase/ oxigenase with high specific activity by Fast Protein Liquid Chromatography. **Anal. Biochem.**, 153: 97.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (eds) (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York..
- Sassone-Corsi, P. (1994). Rhythmic transcriptopn and autoregulatory loops: winding up the biological clock. **Cell**, 78: 361.
- Schmid, R. (1987). Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms, vol. 1. Senger, H. (ed.). CRC Press. Inc., Boca Raton. 169p.
- Schmitter, R.E. (1971). The fine structure of *Gonyaulax polyedra*: a bioluminescent flagellate. **J. Cell Sci**, 9: 147.

- Schubert, H.; Kroon, M. A. B. & Matthijs, H.C.P. (1994). *In vivo* manipulation of the xanthophyll cycle and the role of zeaxanthin in the protection against photodamage in the green algae *Chlorella pyrenoidosa*. **J. Biol. Chem.**, 269: 7267.
- Shapira, M.; Lers, A.; Heifetz, P.B.; Irihimovitz, V.; Osmond, C.B.; Gillham, N.W. & Boynton, J.E. (1997). Differential regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* during photoacclimation: light stress transiently suppresses synthesis of the Rubisco LSU protein while enhancing synthesis of the PSII D1 protein. **Plant Molec. Biol.**, 33: 1001.
- Shiina, T.; Alisson, L. & Maliga, P. (1998) RbcL transcripts levels in tobacco plastids are independent of light: reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability. **Plant Cell**, 10: 1713.
- Shimura, S. & Fujita, Y. (1975). Changes in the activity of fucoxanthin-excited photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Mar. Biol.**, 33: 185.
- Shinohara, M.L.; Loros, J.J. & Dunlap, J.C. (1998). Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase is regulated on a daily basis by circadian clock. **J. Biol. Chem.**, 273: 446.
- Shivanand, K M.; Hearst, J.E. & Poulter, C.D. (1992). The *crtE* gene in *Erwinia herbicola* encodes geranylgeranyl diphosphate synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89: 6761.
- Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. **Angew Chem. Int. Ed.**, 25: 1058.

- Song, P.S.; Koka, P.; Prézélin, B.B. & Haxo, F.T. (1976). Molecular topology of the photosynthetic light-harvesting pigment complex, PCP, from marine dinoflagellates. **Biochem.**, 15: 4422.
- Spector, D.L.(ed.) (1984). Dinoflagellate nuclei. Dinoflagellates. Academic Press, p.107
- Sulzman, F. M.; Gooch, V.D.; Homma, K. & Hastings, J.W (1984). Neural and integrative animal physiology. (L. Prosser, ed.). Wiley-Liss, pp 438.
- Sulzman, F.M.; Gooch, V.D.; Homma, K. & Hastings, J.W. (1982). Cellular autonomy of the *Gonyaulax* circadian clock. **Cell Biophys.**, 4: 97
- Sweeney, B.M. & Hastings, J.W. (1958). Rhythmic cell division in populations of *Gonyaulax polyedra*. **J. Protozool.**, 5: 217.
- Tabata, K.; Ishida, S.; Nakahara, T & Hoshino, T. (1994). A carotenogenic gene cluster exist on a large plasmid in *Thermus thermophilus*. **FEBS Lett.**, 341: 251
- Telfer, A ; Dhami, S.; Bishop, S.M.; Phillips, D. & Barber, J. (1994). β -carotene quenches singlet oxygen formed by isolated Photosystem II reaction centers. **Biochem.**, 33: 14469.
- Thornber, P.J. (1975). Chlorophyll-protein: light-harvesting and reaction center components of plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, 26: 127.
- Towbin, H.; Staehlin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamde gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.**, 76: 4350.

- Trebs, A. & Debka, B. (1997). Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamidomonas reinhardtii*. **FEBS Lett.**, 400: 359.
- Vaisberg, A.J. & Schiff, J.S. (1976). Events surrounding the early development of Euglena chloroplasts. **Plant Physiol.**, 57: 260.
- Vernet, M. & Whitehead, K. (1996). Release of ultraviolet-absorbing compounds by the red-tide dinoflagellate *Lingulodinium polyedra*. **Mar. Biol.**, 127: 35.
- Viestra, R.D. (1993). Protein degradation in plants. **Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Molec. Biol.**, 44: 385.
- Volkandt, W. & Hardeland, R. (1984) Circadian rhythmicity of protein synthesis in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*: a biochemical and radioautographic investigation. **Comp. Biochem. Physiol.**, 77 B: 493.
- Von Stosch, H.A.. (1973) . Observations on vegetative reproduction and sexual life cycle of two freshwater dinoflagellate, *Gymnodinium pseudopalustre* and *Woloszynskia apiculata*. **Br. Phycol. J.**, 8: 103.
- Walter, P. & Blobel, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. III signal recognition protein causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. **J. Cell Biol.**, 91: 557.
- Wang, Z-Y & Tobin, E.M. (1998). Constitutive expression of the circadian clock associated 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. **Cell**, 93: 1207.
- Weeks, O.B.; Salem, F.K., Wirahadikusumah, M & Berry, R. (1973). Photoregulated carotenoid biosynthesis in non-photosynthetic microorganisms. **Pure Appl. Chem.**, 121: 35.

- Wever, R. (1979). The Circadian System of Man: Experiments Under Temporal Isolation. Springer-Verlag, New York. 324 p.
- Willekens, H.; Chamnongpol, S.; Davey, M. Schraudner, M.; Langebartels, C.; Montagu, M. van; Inzé, D. & Van Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. **EMBO J.**, 16: 4806.
- Wolf, R.; Hardeland, R. & Balzer, I. (1994). Cell Biological Problems in Chronobiology. Hardeland, R. (ed.). Univ. Goettingen, Alemanha, pp. 150.
- Wyman, M. (1999). Diel rhythm in ribulose 1,5-biphosphate carboxilase/oxygenase and glutamine syntetase gene expression in a natural population of marine picoplanktonic Cyanobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65: 3651.
- Ying, Z.; Mulligan, R.M.; Janney, N. & Houtz, R.L. (1999). RuBisCo small and large subunit *N*-methyl transferases. **J. Biol. Chem.**, 274: 36750.
- Zhang, Z.; Green, B.R. & Cavalier-Smith, T. (1999a). Single genes circles in dinoflagellate chloroplast genomes. **Nature**, 400: 155.
- Zhang, H.; Huang, D. & Cramer, W.A. (1999b). Stoichiometrically bound beta-carotene in the cytochrome *b6f* complex of oxygenic photosynthesis protects against oxygen damage. **J. Biol. Chem.**, 274: 1581.
- Zhang, N & Portis Jr., A.R. (1999). Mechanism of light regulation of RuBisCo: a specific role for the larger RuBisCo activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-*f*. **Plant Biol.**, 96: 9438.

Curriculum vitae

Heloísa Candia Hollnagel

Nascida em 26/10/1966 em Porto Alegre, RS

Estado civil: casada, dois filhos

Endereço: Rua Corinto n. 739, apto 64 / bl. A

CEP 05586-060, Butantã, São Paulo, SP

Telefone:(011) 815-3540

Idiomas:

Proficiência em Inglês e Alemão

Formação Acadêmica:

1985-1989

Graduação: Bacharelado em Ciências Biológicas

"Influência de extratos de folhas de *Solanum fastigiatum* Willd na germinação e crescimento de *Lactuca sativa* var. White Boston".

Orientação: Prof. Dr. Maria Estefânia Aquila.

Instituto de Biosciências na Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFRGS

1991-1994

Pós-graduação: Mestrado em Ciências

Área de concentração: Oceanografia Biológica

"Bactérias e outros microorganismos dos sedimentos do infralitoral da Praia do Perequê, Guarujá, SP".

Orientação: Prof. Dr. Hilda de Souza Lima Mesquita.

Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

1994-2000

Pós-graduação: Doutorado em Ciências

Área de concentração: Bioquímica

“Aspectos Bioquímicos da Biossíntese de Pigmentos Carotenóides em *Gonyaulax polyedra* (Dinophyceae)”.

Orientação: Prof. Dr. Pio Colepicolo

Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Visitas a laboratórios Nacionais e Internacionais:

- ◆ Prof. Dr. Helmut Sies. Universidade de Düsseldorf- 1996
- ◆ Prof. Dr. Rudiger Hardeland- Universidade de Göttingen- 1996
- ◆ Prof. Dr. Ivonne Balzer- Universidade de Göttingen- 1996
- ◆ Prof. Dr. Paulo Ferreira. Universidade Federal do Rio de Janeiro- 1997

Publicações Científicas:

Di Mascio, P.; Hollnagel, H.C.; Sperança, M. & Colepicolo, P. (1995). Diurnal Rhythm of β -carotene in Photosynthetic Alga *Gonyaulax polyedra*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 376: 297-301.

Hollnagel, H.C.; Di Mascio, P.; Asano, C.S.; Okamoto, O. K.; Stringher, C.G.; Oliveira, M.C. & Colepicolo, P. (1996). The effect of light on the biosynthesis of β -carotene and superoxide dismutase activity in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29: 105-110.

Asano, C.S.; Okamoto, O.K.; Hollnagel, H.C.; Stringher, C.G.; Oliveira, M.C. & Colepicolo, P. (1996). The activity of superoxide dismutase oscillates in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Ciência e Cultura*, 48: 64-67.

Participação em Reuniões Científicas

Second International Conference- Antioxidant Vitamins and β -carotene in Disease Prevention. ICC Berlin, 10-12 de outubro de 1994.

Poster: "Molecular Basis of the Biological Clock: Induction of Carotenoids may be related to the Clock Reseting in the Photosynthetic dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*".

Autores: Di Mascio, P.; Hollnagel, H.C.; Sperança, M.; Marinelli, D. & Colepicolo, P.

III Latin American Symposium on Chronobiology. Caraguatatuba, 23-26 de maio de 1995.

Poster: " Carotenoids may be related to the Clock Reseting in the Marine Photosynthetic Algae *Gonyaulax polyedra*".

Autores: Hollnagel, H.C.; Di Mascio, P. & Colepicolo, P.

11th International Sympoisum on Carotenoids. Leiden (Holanda) de 18 a 23 de agosto de 1996.

Poster: "Light Induction of β -carotene Synthesis in the Marine Photosynthetic Dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*".

Autores: Hollnagel, H.C.; Di Mascio, P. & Colepicolo, P.

Universidade de Göttingen (Alemanha) de 24 à 28 de agosto.

Palestra: "Light Induction of β -carotene Synthesis in the Marine Photosynthetic Dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*" no Instituto de Botânica na mesma universidade no dia 27 de agosto de 1996.

Singlet Molecular Oxygen: Chemical, Biological and Medical Aspects.

Caraguatatuba, São Paulo de 02-05 de setembro de 1998.

Poster: "The importance of xanthophylls in the quenching of singlet oxygen in *Gonyaulax polyedra*".

Autores: Pinto Jr., E.; Hollnagel, H.C.; Di Mascio, P. & Colepicolo, P.

29th Meeting of the Brazilian Biochemical Society, Caxambú, Minas

Gerais, Brasil, 27-30 de maio de 2000.

Poster. "Alteration in pigment composition of asexual cysts of the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* Stein".

Autores: Hollnagel, H.C. & Colepicolo, P.