

Fotopigmentos e arrastamento fótico

Photoentrainment and Photopigments

Leonardo H. R. G. de Lima

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

Contato do autor: leohrgl@ib.usp.br

Resumo. O arrastamento fótico é garantido pela ação de proteínas fotorreceptoras, que possuem propriedades muito particulares. Dentre as diversas proteínas fotossensíveis que surgiram ao longo do processo evolutivo, apenas algumas participam do arrastamento fótico. Sendo assim, este texto tem como objetivo abordar o processo de arrastamento de osciladores circadianos pelo ciclo claro/escuro e descrever as proteínas fotorreceptoras que atuam neste processo. Será dada ênfase para as propriedades e mecanismos de ação destas proteínas e serão explicadas quais as diferenças entre os processos de formação de imagens por proteínas visuais e por proteínas “circadianas” capazes de ajustar os ritmos circadianos aos ciclos ambientais de 24 horas.

Palavras-chave. *Fotopigmentos, Arrastamento fótico, Criptocromos, Melanopsina.*

Abstract. Photoentrainment is a process that depends on the activity of photosensitive proteins. Throughout the evolutionary process many different photosensitive proteins arose, but just a few have a role in photoentrainment. Therefore the purpose of this text is to exploit photoentrainment and the active photoreceptor proteins related to the process. The mechanism of action of photosensitive proteins will be emphasized, as well as the differences between visual and entrainment processes. In conclusion, it will be explained how the light/dark cycle is able to adjust circadian rhythms to the environmental 24 hours of the day.

Keywords. *Photopigments, Photoentrainment, Cryptochromes, Melanopsin.*

Recebido 18out10

Aceito 21ago12

Publicado 27dez12

Introdução

Ritmos biológicos podem ser entendidos como manifestações claras de organização temporal. Se considerarmos que a sobrevivência de determinado organismo é devida às suas possibilidades de adequar-se ao meio em que vive e que os ambientes terrestres são cíclicos, pode-se inferir que a existência de uma organização temporal interna nos seres vivos permite a eles ocupar um nicho temporal. Entretanto, sabe-se que na grande maioria das espécies o período dos ritmos endógenos é diferente de 24 horas. Para que estas espécies não fiquem sujeitas aos perigos de uma deriva temporal, um ajuste diário, por meio de uma forma particular de sincronização, o **arrastamento**, é necessário. O arrastamento de um oscilador ocorre quando este é acoplado e regido por outro, fazendo com que o primeiro oscilador assumo o período de seu regente. Esta é precisamente a interação que ocorre entre os ritmos circadianos e os ciclos ambientais, resultando na sincronização dos organismos à hora local (Pittendrigh, 1993).

Dentre as diversas pistas ambientais cíclicas fornecidas pelo ambiente para arrastar os ritmos biológicos, o ciclo claro-escuro é tido como o principal agente sincronizador ou “Zeitgeber” (Aschoff, 1960).

Arrastamento

O arrastamento é um processo que implica o controle da fase e do período do ritmo arrastado (Bruce e Pittendrigh, 1957). E em princípio isto pode ocorrer por duas vias distintas: “O sistema circadiano pode responder continuamente aos níveis de intensidade luminosa com uma modulação de sua velocidade, ou seja, ao acelerar ou desacelerar, o sistema circadiano pode ajustar sua frequência à do meio ambiente. Este processo recebe o nome de **arrastamento paramétrico**. Por outro lado pode-se pensar que o oscilador é ajustado uma ou duas vezes por dia, quando o ambiente fornece pistas discretas como, por exemplo, o amanhecer e o anoitecer. Este processo é conhecido como **arrastamento não paramétrico**” (Daan, 1977).

Apesar dos indícios de que a modulação da frequência por efeitos paramétricos está envolvida no arrastamento, a maior parte dos estudos está concentrada no arrastamento não paramétrico, empregando principalmente pulsos de luz ou de escuro (Aschoff, 1999). A amplitude e a direção dos deslocamentos de fase induzidos por tais estímulos dependem da fase em que estes são aplicados. Ao se plotar esses dados em função da fase circadiana é possível obter uma **curva de resposta dependente de fase** (CRF) (Johnson, 1992).

A partir de extensos estudos com roedores noturnos mantidos em escuro constante e expostos a pulsos luminosos de 15 minutos, ou a um **fotoperíodo esqueleto** (dois pulsos luminosos por ciclo de 24 horas), Pittendrigh

e Daan (1976) concluíram que: “O mecanismo do arrastamento é fundamentalmente não paramétrico. A ação paramétrica é pequena e sua principal significância funcional é conservar a relação de fase dos animais diurnos com o ponto médio da luz... através da abrangência de fotoperíodos que este animal procura explorar”. Há concordância de que o arrastamento não paramétrico tenha papel mais importante do que o paramétrico (Daan, 1982; Ferraro e McCormack, 1984; Ferraro e McCormack, 1986). Esta conclusão é baseada não apenas na utilidade das CRFs na previsão da relação de fase estabelecida entre o ritmo e o *Zeitgeber* dentro da abrangência do arrastamento e fotoperíodos variáveis, mas também na frequência do ritmo em livre curso (Pittendrigh, 1981).

Fotorreceptores

Levando em conta o modelo clássico da cronobiologia que propõe a sequência de eventos e das estruturas envolvidas na expressão de um ritmo arrastado:

Zeitgeber → Aferência → Oscilador → Eferência → Ritmo

os fotorreceptores são as vias aferentes através das quais o *zeitgeber* claro/escuro é percebido e cujo sinal é enviado ao oscilador. Esta é a etapa inicial do mecanismo do arrastamento.

As diversas proteínas fotorreceptoras (também conhecidas como fotopigmentos) descritas na literatura podem ser classificadas em um número restrito de famílias. Nesta classificação, os diferentes tipos de proteínas fotorreceptoras são reunidos em famílias de acordo com a estrutura química de seu cromóforo. O cromóforo é uma molécula não protéica capaz de absorver e transmitir a energia dos fótons para a parte protéica do fotopigmento. As famílias mais importantes de fotopigmentos são: rodopsinas, fito-

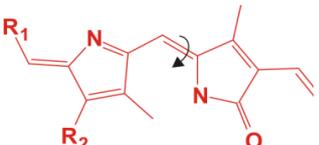
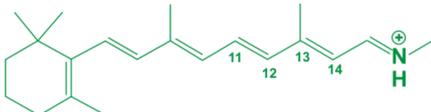
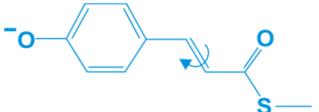
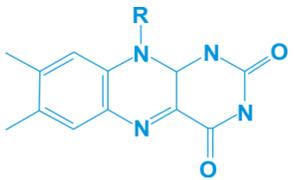
cromos, xantopsinas, criptocromos, fototropinas e proteínas que utilizam dinucleotídeo flavina-adenina (FAD) para detectar a luz azul (proteínas BLUF) (Tabela 1). Para as três primeiras famílias citadas, a alteração da configuração de seus cromóforos é uma isomerização (por exemplo, o cromóforo 11-*cis*-retinal da rodopsina é isomerizado para *all-trans*-retinal na presença de luz). Essa modificação configuracional inicia então um estado sinalizador com estabilidade suficiente para comunicar os processos de absorção de fótons a um segundo mensageiro (Van Der Horst e Hellingwerf, 2004). Deve-se ressaltar que, mesmo correta, essa classificação pode gerar confusões, pois apesar do nome, as xantopsinas, também conhecidas como proteínas fotoativas amarelas (do inglês: PYP), não são opsinas (Björn, 2010).

As proteínas fotorreceptoras atuam por distintas vias de transdução de sinal. Muitos detalhes são conhecidos para a maioria delas, porém ainda existem questões a serem elucidadas em todas as famílias (Van Der Horst e Hellingwerf, 2004). Serão apresentadas a seguir, as principais famílias de fotopigmentos envolvidas no arrastamento fótico até o momento.

Criptocromos

Os genes que codificam para criptocromos e fotoliasas são agrupados em uma família diversificada que está presente desde arqueobactérias até mamíferos. Nesta família, o cromóforo ligado à proteína é FAD. Três categorias principais de proteínas são representadas nesta família: as fotoliasas do dímero de ciclo butano (CPD), as fotoliasas adutoras do foto-produto 6-4 pirimidina-pirimidona e os criptocromos (CRYs). Fotoliasas são enzimas que utilizam energia luminosa para reparar danos induzidos por luz ultravioleta (UV) em moléculas de DNA, tanto os foto-produtos 6-4, como os dímeros de ciclo butano (Chaves et al., 2011).

Tabela 1. Classes de cromóforos e fotopigmentos bem caracterizados. Modificado de Van Der Horst e Hellingwerf, 2004.

Classes	Cromóforos	Elemento estrutural chave	Família	Fotoquímica
Tetrapirrroís	Fitocromobilina		Fitocromos	<i>trans</i> ↔ <i>cis</i>
Polienos	Retinal		Rodopsinas	<i>trans</i> ↔ <i>cis</i>
	Ácido Cumárico		Xantopsinas	<i>trans</i> ↔ <i>cis</i>
Aromáticos	Flavina		Criptocromos	Transferência de elétrons?
			Fototropinas	Formação de elétrons
			Proteínas BLUF	Transferência de prótons?

Já os criptocromos funcionam como moléculas sinalizadoras que regulam processos biológicos, como o arrastamento circadiano em plantas e animais. Estruturalmente, as fotoliasas e os criptocromos são muito similares e apresentam domínios fotoativos semelhantes, o que coloca as fotoliasas como possíveis ancestrais dos criptocromos. Em consequência, atualmente o criptocromo é definido como uma proteína semelhante às fotoliasas, que perdeu ou apresenta uma capacidade reduzida de promover reparos no DNA e ganhou uma função de sinalização (Chaves et al., 2011).

Os criptocromos foram descobertos através de estudos de germinação da planta *Arabidopsis thaliana*. Nestes estudos, sementes que apresentavam um fenótipo de inibição da elongação do hipocótilo quando iluminadas com luz azul, foram identificadas como mutantes para o gene que codifica esta proteína (Ahmad e Cashmore, 1993). Em seguida, diversas funções que afetam aspectos do crescimento e desenvolvimento desta planta foram identificadas para *Cry1* e para o seu homólogo *Cry2*.

Sabe-se que o mecanismo molecular circadiano das plantas é regulado por *Cry1* e *Cry2*. Estes parecem agir de forma redundante no arrastamento fótico, encurtando o período. Em escuro constante, sementes desta planta apresentam período de 36 horas. Entretanto, quando estas sementes são colocadas em ciclo claro-escuro, os criptocromos ajustam o período para 24 horas (Devlin e Kay, 2000; Somers et al., 1998).

Os criptocromos não são componentes do mecanismo molecular do sistema circadiano de plantas como ocorre nos animais, pois mutantes nulos para *Cry1* e *Cry2* ainda apresentam ritmos normais (Yanovsky et al., 2000).

Já os criptocromos encontrados nos animais podem ser divididos em dois grupos, de acordo com sua função no sistema circadiano. Os criptocromos sensíveis à luz que agem como fotopigmentos circadianos em *Drosophila* e em outros insetos são chamados de criptocromos tipo I. Enquanto que os criptocromos que não respondem à luz, agem como genes de relógio e funcionam como repressores da transcrição gênica como, por exemplo, em camundongos, humanos e outros vertebrados são designados criptocromos tipo II. Algumas espécies de animais, como por exemplo, o teleósteo *Danio rerio* e a borboleta monarca *Danaus plexippus*, possuem os dois tipos de criptocromos (Chaves et al., 2011).

O criptocromo do tipo I mais bem estudado até o momento é o de *Drosophila*. Ao contrário da maioria dos insetos que também possuem criptocromo do tipo II, esta mosca possui apenas um gene para o criptocromo (Chaves et al., 2011).

Assim como os criptocromos de plantas, o criptocromo de *Drosophila* não é capaz de fazer reparos no DNA. A função deste gene em *Drosophila* foi determinada a partir de mutantes que possuem o alelo hipomórfico *Cry^b*. Estes mutantes ainda apresentam ritmos circadianos, mas mostram forte redução da capacidade de serem arrastados por ciclos claro-escuro (Emery et al., 1998; Stanovsky et al., 1998). Além disto, o arrastamento é completamente abolido em mutantes *Cry^b* que também não possuem o sistema visual, o que sugere que outros fotopigmentos do sistema

visual também façam parte do processo de arrastamento (Helfrich-Förster et al., 2001).

Sabe-se hoje que o dímero protéico CLOCK e CYCLE age como um elemento positivo que estimula a transcrição de *Per* e *Tim* em *Drosophila*, atuando em regiões regulatórias E-box nos promotores desses genes. Conforme as proteínas PER e TIM se acumulam, estas formam dímeros no citoplasma e voltam para o núcleo, onde atuam como repressores, interferindo na ligação do dímero CLOCK e CYCLE com os elementos E-box de *Per* e *Tim*.

Além disso, sabe-se também que a transcrição de *Cry* é controlada de forma circadiana pelo dímero CLOCK e CYCLE e que a interação da proteína CRY com a proteína TIM é dependente de luz, pois na presença de luz, TIM é degradada. Isto significa que, na presença de luz, os elementos repressores são degradados, permitindo que os elementos positivos iniciem um novo ciclo (Stanovsky, 2002).

Os dois homólogos de *Cry* encontrados em mamíferos, *Cry1* e *Cry2*, pertencem ao tipo II e a função destes genes foi elucidada em camundongos *knockout* para cada um destes genes, assim como para ambos. Nos animais com apenas um ou outro *Cry*, foram encontrados fenótipos com períodos longos e curtos respectivamente para *Cry1* e *Cry2* (Van der Horst et al., 1999; Burnelle et al., 2007). Já os duplos *knockout* são completamente arrítmicos e perdem a expressão rítmica de genes de relógio (Okamura et al., 1999; Van der Horst et al., 1999; Brunelle et al., 2007). Estas observações colocaram os criptocromos no coração do oscilador circadiano de mamíferos (Fig. 1). Como a indução de *Per* em resposta a estímulo luminoso não é abolida no animal duplo *knockout* para *Cry*, a possível função destes genes no arrastamento de mamíferos foi descartada (Okamura et al., 1999).

Os mamíferos não são os únicos que apresentam criptocromos do tipo II, pois todos os vertebrados estudados até o momento como, por exemplo, o teleósteo *Danio rerio*, a rã *Xenopus laevis* e a galinha *Gallus gallus* apresentam este tipo de criptocromo. Interessantemente, *D. rerio* possui criptocromos tanto do tipo I, como do tipo II (Kobayashi

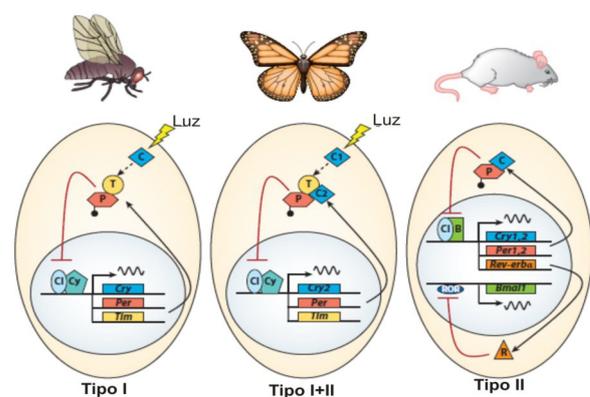


Figura 1. Representação simplificada de três osciladores moleculares, baseada na composição de seus criptocromos. As linhas vermelhas indicam a inibição e as linhas pretas pontilhadas indicam a degradação de TIM que ocorre na presença de luz e mediada pela interação com CRY. Tipo I em *Drosophila*, Tipo I+II em *Danaus plexippus*, Tipo II em camundongos. Modificado de Chaves et al. (2011).

et al., 2000). O genoma de *D. rerio* apresenta seis genes *Cry* que podem ser subdivididos em tipo I (*zCry3* e *zCry4*) e tipo II (*zCry1a* e *b*, e *zCry2a* e *b*) (Chaves et al., 2011).

Rodopsinas

Rodopsinas são proteínas de sete domínios transmembrânicos (com peso molecular entre 30-50kD) cuja porção protéica é denominada “opsina”. Estas opsinas utilizam como cromóforo o retinal, o aldeído da vitamina A, ligado a uma lisina de sua sétima alça transmembrânica por uma ligação covalente chamada “Base de Schiff”. As opsinas não absorvem energia de forma constante ao longo do espectro eletromagnético. A sensibilidade de cada opsina depende de sua estrutura atômica, principalmente no que se refere ao aminoácido que funciona como contra íon para estabilizar a ligação entre o retinal e a lisina da sétima alça transmembrânica (Terakita, 2005). As opsinas são classificadas em “tipo 1” e “tipo 2”.

Opsinas tipo 1 são proteínas muito antigas encontradas em Arqueobactérias, Bactérias e Eucariotos. Os precursores destas opsinas podem ter existido antes da divergência de arqueobactérias, bactérias e eucariotos (Spudich, 2006; Sharma et al., 2006). Isto significa que o mecanismo de transporte de íons dependente de luz pode ter precedido a evolução da fotossíntese e representar um dos primeiros meios pelos quais os organismos passaram a utilizar a radiação solar como fonte de energia (Spudich, 2006; Sharma et al., 2006).

Opsinas “tipo 2” são encontradas somente em eucariotos (Sharma et al., 2006). A maioria dos estudos relacionados ao arrastamento fótico foi realizada neste tipo de opsina. Sendo assim, o restante desta revisão abordará as propriedades funcionais deste tipo de opsina relacionadas ao arrastamento e explicará a diferenças entre este processo e os processos de formação de imagem nos metazoários.

Tipos de células fotorreceptoras e vias de sinalização utilizadas por rodopsinas

Fotorreceptores ciliares são células capazes de responder a estímulos luminosos por conterem opsinas embebidas na bicamada lipídica de discos membranosos ciliares que

compõem o segmento externo das células fotorreceptoras da retina de vertebrados. Cada disco membranoso do segmento externo das células fotorreceptoras contém milhares de moléculas de pigmento visual. Quando um fóton atinge o segmento externo dos fotorreceptores, o retinal-11-*cis* é isomerizado para a forma *all-trans*, causando alterações conformacionais na molécula da proteína, o que inicia a sinalização (Arendt et al, 2004). A partir de então a metarodopsina II ativa a proteína trimérica G, que libera sua subunidade α chamada de transducina, ativando a cascata de sinalização resumida da seguinte forma:

Fótons \rightarrow rodopsina \rightarrow rodopsina ativada (metarodopsina II) \rightarrow uma proteína ligante de GTP (transducina) \rightarrow uma enzima que hidrolisa GMPc (GMPc-fosfodiesterase) \rightarrow fechamento de canais iônicos ao se desligarem de GMPc.

A fototransdução rabdomérica apresenta semelhanças e diferenças notáveis em relação à fototransdução ciliar. Em ambas, a via de transdução é iniciada pela isomerização da opsina por luz, e pela interação dessa proteína com a proteína trimérica ligante de GTP (proteína G). Porém nos fotorreceptores rabdoméricos, ao invés da opsina se ligar à proteína G transducina, que é uma fosfodiesterase de GMPc, a opsina se liga a uma proteína Gq que ativa uma fosfolipase C (PLC), que então catalisa a conversão de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) a inositol-1,3,5-trisfosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). A produção de DAG, em insetos, leva à abertura de canais iônicos, o que permite o influxo de Na⁺ e de Ca²⁺. Já em *Limulus sp*, IP₃ libera cálcio de compartimentos, o qual, combinado à calmodulina, ativa uma guanilil ciclase. O aumento de GMPc ocasiona a abertura de canais de sódio dependentes de nucleotídeos cíclicos e ocorre a despolarização (Fig. 2) (Arendt, 2003; Arendt et al., 2004).

Qual comprimento de onda é responsável pelo arrastamento?

O padrão de sensibilidade de comprimento de onda, ou seja, o espectro de absorção é como uma impressão digital única de cada molécula de fotopigmento (Fig. 3).

No campo da fotobiologia, o espectro de ação é uma

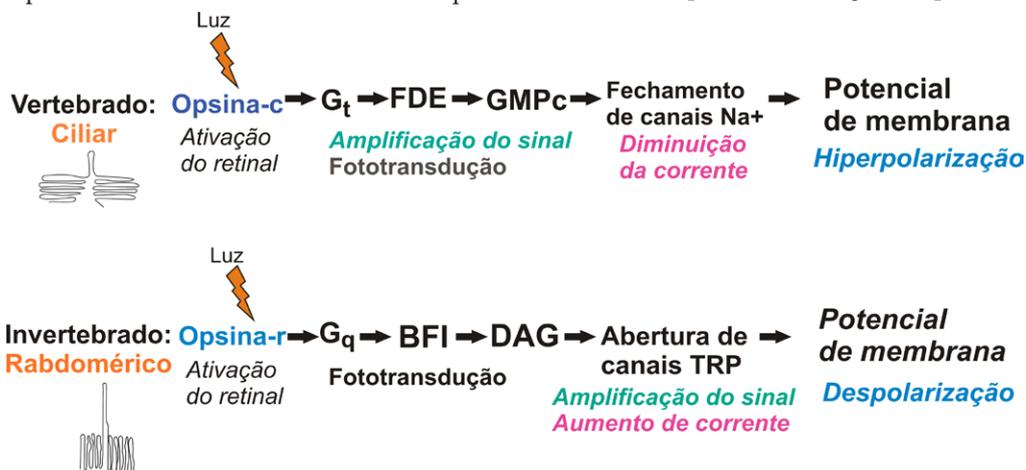


Figura 2. Representação esquemática das vias de sinalização de fotorreceptores ciliares e rabdoméricos. Modificado de Fernald (2006).

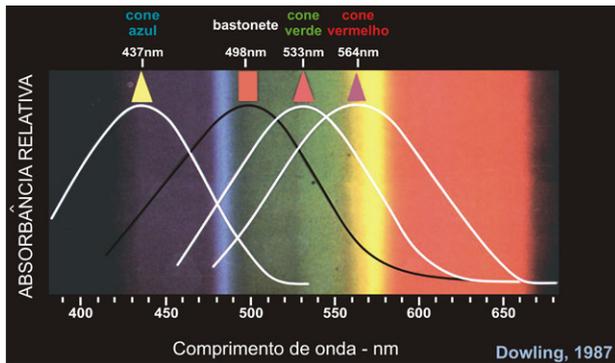


Figura 3. Pico de sensibilidade espectral de três tipos de cones e de bastonetes na retina de primatas. Extraído e modificado de www.webvision.med.utah.edu/

das principais ferramentas utilizadas para identificar o fotopigmento que inicia uma resposta induzida por luz. Um espectro de ação é formado pela resposta relativa de um organismo a diferentes comprimentos de onda de radiação eletromagnética, visuais e não visuais. Existem dois tipos de espectro de ação: policromáticos e analíticos. Geralmente quando se inicia o estudo das reações biológicas sensíveis à luz, o primeiro passo é determinar o espectro de ação policromático de uma resposta.

Pesquisas feitas com estímulos policromáticos, tanto em humanos como roedores envolvendo respostas de síntese de melatonina pela glândula pineal, adiantamento de fase circadiana ou respostas fotoperiódicas sugerem que a região espectral entre 450-550nm forneça o maior estímulo para respostas circadianas e neuroendócrinas em mamíferos (Figs. 4, 5 e Tabela 2) (Hanifin e Brainard, 2007).

Estudos em pacientes com deficiência de visão indicaram que um sistema funcional normal com os três cones e bastonetes não é necessário para a supressão de melatonina. Estes resultados deixaram claro que havia um “fotorreceptor desconhecido”, diferente de cones e bastonetes, atuando na fototransdução circadiana. Nos anos 1980, cronobiologistas e neuroendocrinologistas começaram a empregar comprimentos de onda monocromáticos nesses estudos, sofisticando as técnicas fotobiológicas para determinação do espectro de ação analítico (Grossweiner, 1989; Horspool e Song, 1994; Coohill, 1991; 1999).

O espectro de ação analítico de uma resposta é determinado pela comparação dos efeitos de dois ou mais estímulos monocromáticos com faixa de pico médio de 15-20nm ou menos. O espectro de ação é então formado, plotando-se os fótons incidentes necessários para produzir a resposta biológica versus o comprimento de onda. Espectros de ação analíticos recentes demonstram a sensibilidade a diferentes comprimentos de onda para diversas respostas fisiológicas (Tabela 2).

Mas qual opsina atua no arrastamento?

Primeiramente é necessário enfatizar que os criptocromos não são as únicas proteínas fotorreceptoras que atuam no arrastamento dos ritmos circadianos dos invertebrados. Em *Drosophila*, a rodopsina 1 e a rodopsina 6 estão envolvidas com o arrastamento por luz vermelha (Hanai et al.,

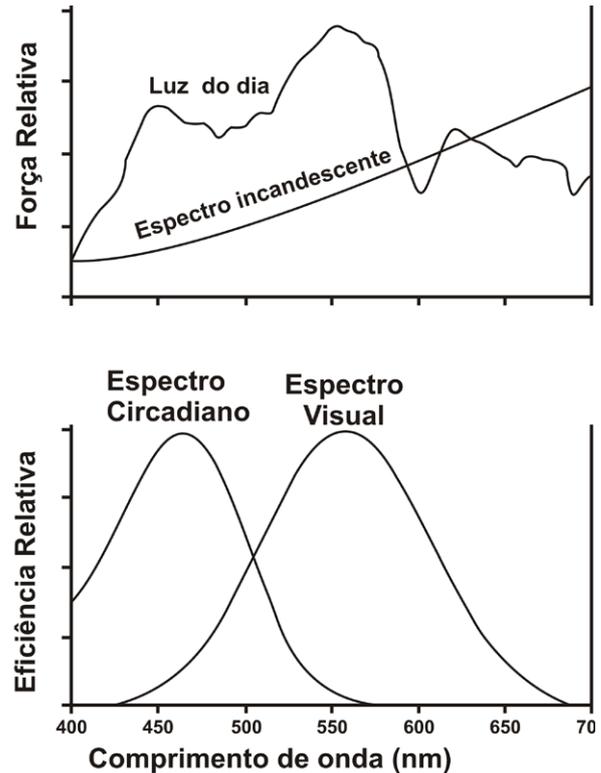


Figura 4. Distribuição espectral da luz do dia versus a distribuição espectral da luz emitida por lâmpadas incandescentes (gráfico superior). No gráfico inferior, a linha representada pela visão fótica indica a sensibilidade espectral da retina de mamíferos baseada em três tipos de detecção para cores. Já a linha do input circadiano indica a sensibilidade para os sistemas circadiano e neuroendócrino, e processos comportamentais. Modificado de Hanifin e Brainard (2007).

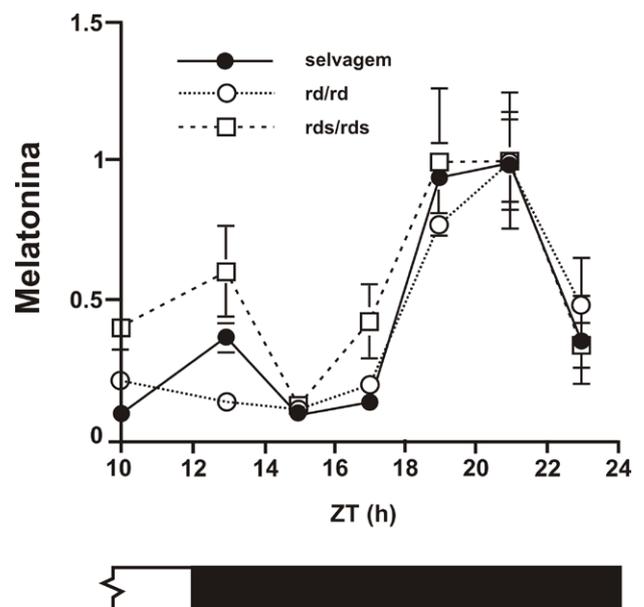


Figura 5. Ritmo de melatonina em camundongos com degeneração retiniana, mostrando que cones e bastonetes não são necessários para a supressão de melatonina por luz. rd/rd – camundongos com degeneração retiniana; rds/rds – camundongos com redução de 50% do segmento externo de cones e bastonetes na retina. Modificado de Lucas e Foster (1999).

2008) e as rodopsinas 1, 5 e 6 por luz verde e amarela (Hanai e Ishida, 2009).

Depois, a hipótese de que um novo fotorreceptor seria crucial para a captação de luz pelo sistema circadiano ganhou força com a descoberta que camundongos que apresentam certos tipos de cegueira e camundongos *rd/rd* que sofrem de degeneração da retina, com a ausência de bastonetes, e progressiva perda de cones, continuam a apresentar um efeito robusto de percepção de luz pelo sistema circadiano (Foster et al., 1991; Lucas et al., 1999; Freedman et al., 1999) (Fig. 5).

Melanopsina (*Opn4*)

Tabela 2. Espectro de ação analítico para respostas circadianas, neuro endócrinas e oculares. Modificado de Hanifin e Brainard (2007).

Espécie	Resposta	Pico (λ_{Max})	Referência
Camundongo <i>rd/rd</i>	Circadiana	480	Yoshimura e Ebihara, 1996
	Deslocamento de fase		
Humano	Supressão de Melatonina	464	Brainard et al, 2001
Humano	Supressão de Melatonina	459	Thapan et al, 2001
Camundongo <i>rd/rd</i>	Constricção pupilar	479	Lucas et al, 2001
	Reflexos luminosos		
Humano	Cones	483	Hankins e Lucas, 2002
Rato	Ondas-ERG	484	Berson et al, 2002
	Células ganglionares		
	Despolarização		
Camundongo <i>rd/rd</i>	Deslocamento de fase	481	Hattar et al, 2003
Macaco	Despolarização de células ganglionares	482	Dacey et al, 2005

rd/rd - camundongos com mutação na subunidade B da fosfodiesterase de GMPc de bastonetes; resulta na total destruição dos bastonetes e também na destruição de 50% dos cones. *rd/rd cl* - camundongos com total destruição de cones e bastonetes.

Foi buscando uma nova opsina em um modelo de percepção luminosa, os melanóforos do anfíbio *Xenopus laevis*, que Ignacio Provencio (Provencio e col., 1998) descobriu a melanopsina, uma nova opsina expressa na retina em todas as classes de vertebrados examinadas até o momento, sendo encontrada desde o cefalocordado anfíoxo *Branchiostoma belcheri*, até mamíferos (Figs. 6 e 7).

O padrão de expressão de melanopsina difere nas classes de vertebrados, no entanto sua presença em células ganglionares da retina é constante. Nos mamíferos, essas são as únicas células que expressam melanopsina (Provencio et al, 2002; Berson et al, 2011).

Como a chegada da luz no sistema circadiano dos mamíferos depende de fotorreceptores oculares, o fato de que uma pequena população de células ganglionares, contendo

melanopsina, ser intrinsecamente fotossensível sugeriu que a melanopsina teria uma função crítica. De fato, utilizando camundongos *knockout* para melanopsina e mutantes *rd/rd*, que têm degeneração retiniana, Panda e colaboradores (2003) demonstraram que as células ganglionares fotossensíveis onde a melanopsina é expressa são essenciais para o ajuste do relógio aos ciclos de claro-escuro e para respostas fóticas não visuais, como constrição pupilar e supressão de melatonina. Nesse estudo foi demonstrado também que o padrão de arrastamento em camundongos *knockout* para a melanopsina (*Opn4^{-/-}*) (Fig. 8B) não é tão preciso quanto em animais selvagens (Fig. 8A) ou em animais com degeneração de cones e bastonetes (*rd/rd*) (Fig. 8C). Já os animais *Opn4^{-/-}; rd/rd* que sofrem de degeneração retiniana e não expressam melanopsina, mostram-se completamente incapazes de perceber o estímulo luminoso e seus ritmos não são arrastados.

Conclusão

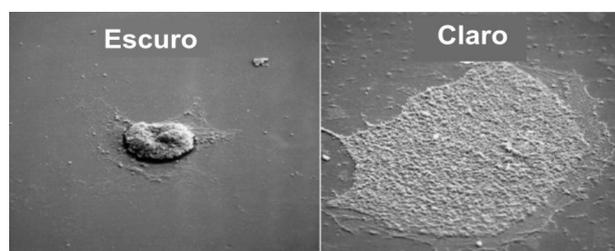


Figura 6. Melanóforos de *Xenopus laevis*. Escuro - grânulos de pigmento agregados na região perinuclear. Claro - grânulos de pigmento dispersos no citoplasma. Modificado de Rollag et al (2000).

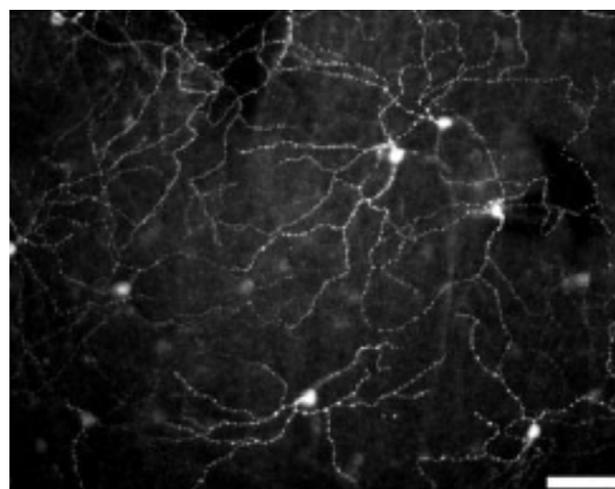


Figura 7. Rede de células ganglionares fotossensíveis, imunopositivas para a melanopsina, na retina de camundongos. Extraído de Provencio et al. (2002).

Embora esta revisão tenha abordado aspectos críticos do conhecimento atual sobre a fotorrecepção ligada ao arrastamento de ritmos circadianos, muitas perguntas continuam sem resposta. Conforme a ciência progride e passa a estudar animais nos mais diversos ambientes, as peças do quebra cabeça chamado sistema circadiano vão se encaixando. Assim, os temas abrangidos aqui começam, por meio de novas palavras, a responder antigas questões como,

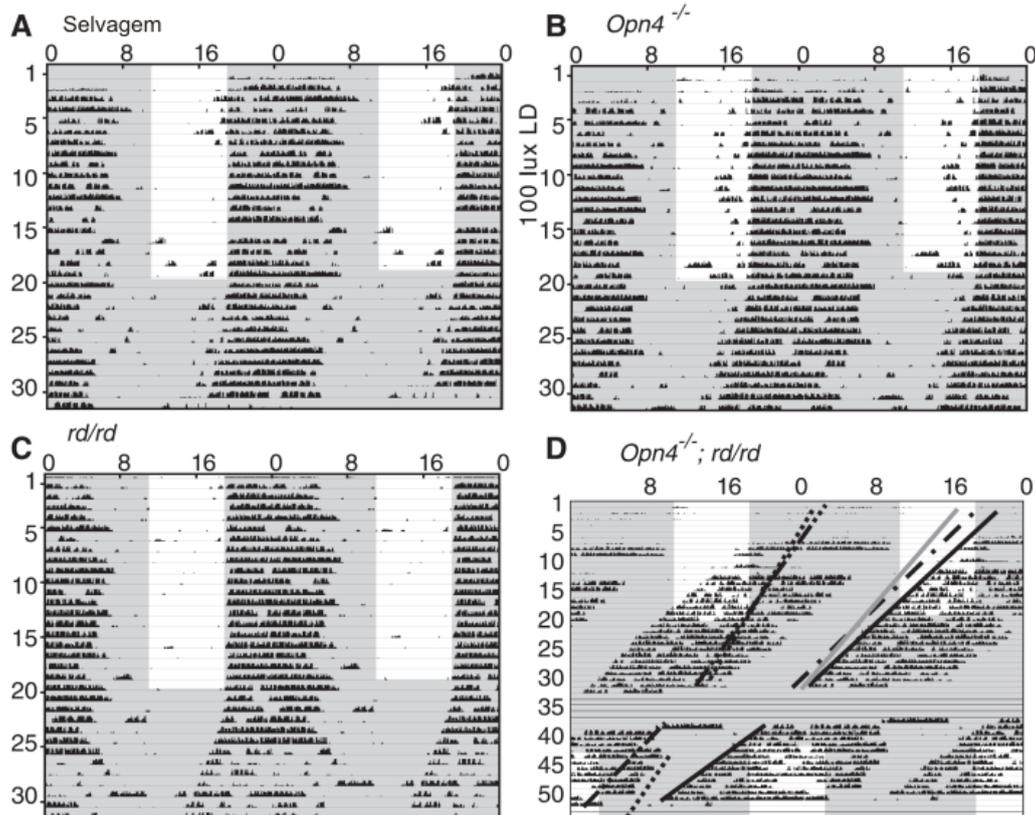


Figura 8. Arrastamento fótico em (A) camundongos selvagens, (B) camundongos knockout para a melanopsina, (C) camundongos com degeneração de cones e bastonetes e (D) camundongos knockout para a melanopsina e com degeneração de cones e bastonetes. As retas de ajuste em preto representam o ângulo do início de atividade. As linhas pontilhadas ou cinza representam o ângulo do início de atividade de outros quatro camundongos knockout para melanopsina e com degeneração de cones e bastonetes. Após duas semanas em escuro constante, três camundongos knockout para melanopsina e com degeneração de cones e bastonetes foram submetidos a ciclo claro/escuro 18:6 (luz branca, com intensidade de 800 lux). A hora local é indicada no topo das figuras e o ciclo claro/escuro é representado no fundo pelas barras brancas e cinza. Extraído de Panda et al. (2003).

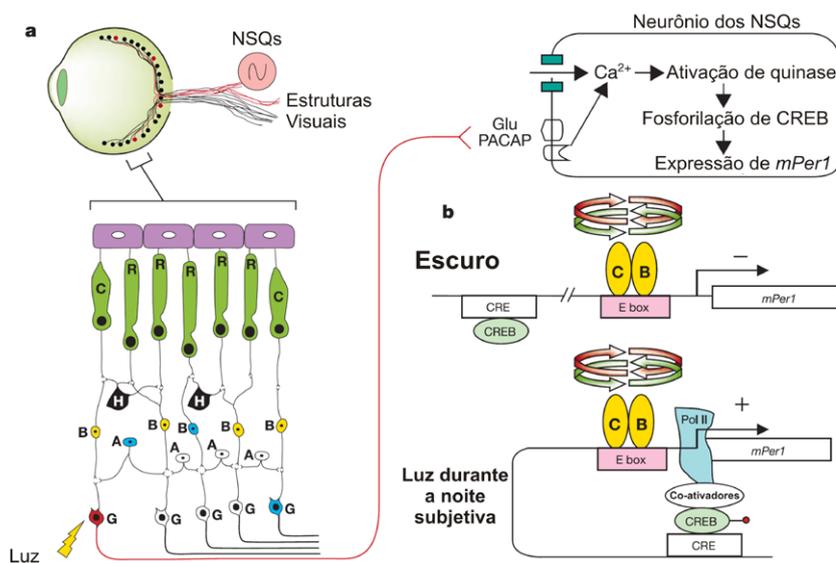


Figura 9. Via neural da retina para os núcleos supraquiasmáticos (NSQs). (a) Uma pequena população de células ganglionares imunopositivas para a melanopsina (vermelho) forma o trato retino-hipotalâmico que se projeta para os NSQs. Estas células ganglionares (G) respondem diretamente à luz. Elas também recebem informação luminosa dos bastonetes (R) e cones (C) através das células bipolares (B) e amácrinas (A), algumas das quais podem conter criptocromos (azul). (b) Pulso luminoso aplicado durante a noite subjetiva ativando a expressão de *Per* nos NSQs através de uma via de sinalização dos terminais pós-sinápticos das células ganglionares nas células dos NSQs. Modificado de Reppert e Weaver (2002).

por exemplo, o mecanismo molecular do arrastamento fótico em mamíferos. Neste sentido, o modelo proposto por de Reppert e Weaver em 2002, em que a luz excita a melanopsina nas células ganglionares da retina e estas por sua vez liberam glutamato nas células dos NSQs, cujos receptores ativam uma via de sinalização que induz a expressão dos genes *Per* e com isto ajusta a fase e o período dos ge-

nes de relógio (Fig. 9), pode ser entendido como o modelo mais bem estudado de fotorrecepção e arrastamento fótico da atualidade.

Referências bibliográficas

Ahmad M, Cashmore AR. (1993) Hy4 gene of *A. thaliana*

- encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366:162–66
- Arendt D. (2003). Evolution of eyes and photoreceptor cell types. *Int J Dev Biol* 47(7-8): 563–71.
- Arendt D, Tessmar-Raible K, Snyman H, Dorresteijn AW, Wittbrodt J. (2004) Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. *Science* 306(5697): 869–71.
- Aschoff J. (1960) Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 25:11–28.
- Aschoff J. (1999) Masking and parametric effects of high-frequency light dark cycles. *Japan J Physiol.* 49: 11–18.
- Berson DM, Castrucci AM, Provencio I. (2012) Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in mice. *J Comp Neurol.* 518: 2405–2422.
- Björn LO. (2010) *Photobiology: The science of life and light.* Springer Science+Business Media 2 ed. New York.
- Brainard GC, Hanifin JP. (2005) Photons, clocks, and consciousness. *J Biol Rhythms.* 20: 314–325.
- Bruce VG, Pittendrigh CS. (1957) Endogenous rhythms in insects and microorganisms. *Am. Nat.* 91:179–195.
- Brunelle SA, Hazard ES, Sotka EE, Van Dolah FM. (2007) Characterization of a dinoflagellate cryptochrome blue-light receptor with a possible role in circadian control of the cell cycle. *J. Phycol.* 43:509–18
- Chaves I., Pokorny R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Esse O, Van der Horst GTJ, Batschauer A, Ahmad A. (2011) The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62: 335–64.
- Coochill TP. (1991) Action spectra again? *Photochem Photobiol* 54: 859–870.
- Coochill TP. (1999) Photobiological action spectra—what do they mean? In R Matthes, D Sliney, S Didomenico, P Murray, R Phillips, S Wengraitis, eds. *Measurements of Optical Radiation Hazards.* ICNIRP, Munchen, Germany, 27–39
- Daan S. (1977) Tonic and phasic effects of light in the entrainment of circadian rhythms. *Ann. New York Acad. Sci.* 290: 51–59.
- Daan S. (1982) Circadian rhythms in animal and plants. *Biological Time Keeping* ed. Brady J. Cambridge University Press, Cambridge pp. 11–32.
- Devlin PF, Kay SA. (2000) Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell.* 12:2499–510.
- Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M. (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95: 669–679.
- Fernald RD. (2006) Casting a genetic light on the evolution of eyes. *Science* 313:1914–1918.
- Ferraro JS, McCormack CH. (1984) Nature of light stimulus producing Aschoff intensity effect and anovulation. *Am. J. Physiol.* 247: 139–144.
- Ferraro JS, McCormack CH. (1986) Minimum duration of light signals capable of producing Aschoff effect. *Physiol. Behav.* 38: 139–144.
- Foster RG, Provencio I, Hudson D, Fiske S, DeGrip W, Menaker M. (1991) Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol [A]* 169:39–50.
- Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Munoz M, David-Gray Z, Foster RG. (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284: 502–504
- Grossweiner LL. (1989) Photophysics. In KC Smith, ed. *The Science of Photobiology.* Plenum Press, New York, 1–45
- Hanai S, Hamasaka Y, Ishida N. (2008) Circadian entrainment to red light in *Drosophila*: requirement of Rhodopsin 1 and Rhodopsin 6. *NeuroReport* 19:1441–1444.
- Hanai S, Ishida N. (2009) Entrainment of *Drosophila* circadian clock to green and yellow light by Rh1, Rh5, Rh6 and CRY. *NeuroReport* 20:755–758
- Hanifin JP, Brainard GC. (2007) Photoreception for circadian, neuroendocrine, and neurobehavioral regulation. *J Physiol Anthropol* 26(2): 87–94.
- Helfrich-Förster C, Winter C, Hofbauer A, Hall JC, Stanewsky R. (2001) The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron* 30:249–61.
- Horspool WM, Song PS. (1994) *Organic photochemistry and photobiology.* CRC Press, New York, 1–1636.
- Johnson CH. (1992) Phase-response curves: what they can tell us about circadian clock? *Circadian Clocks from Cell to Human.* Ed Hiroshige T and Honma K, Hokkaido University Press, Sapporo, pp 209–246.
- Kobayashi Y, Ishikawa T, Hirayama J, Daiyasu H, Kanai S, Toh H, Fukuda I, Tsujimura T, Terada N, Kamei Y, Yuba S, Iwai S, Todo T. (2000) Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells.* 5:725–38.
- Lucas RJ, Freedman MS, Munoz M, Garcia-Fernandez JM, Foster RG. (1999) Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science.* 284: 505–507
- Lucas RJ, Foster RG. (1999) Neither functional rod photoreceptors nor rod or cone outer segments are required for the photic inhibition of pineal melatonin. *Endocrinology.* 140(4):1520–1524
- Okamura H, Miyake S, Sumi Y, Yamaguchi S, Yasui A, Muijtjens M, Hoeijmakers JH, van der Horst GT. (1999) Photic induction of *mPer1* and *mPer2* in *Cry*-deficient mice lacking a biological clock. *Science* 286: 2531–2534
- Panda S, Provencio I, Tu DC, Pires SS, Rollag MD, Castrucci AM, Pletcher MT, Sato TK, Wiltshire T, Andahazy M, Kay SA, Van Gelder RN, Hogenesh JB. (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301: 525–527.
- Pittendrigh CS, Daan S. (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. IV. Entrainment: Pacemakers as clock. *J. Comp. Physiol.* 106: 291–331.
- Pittendrigh CS. (1981) Circadian systems: entrainment. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology*, vol. 4, *Biological Rhythms*, ed Aschoff J, Plenum, New York, pp 95–124.
- Pittendrigh CS. (1993) Temporal organization: Reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 17–54.
- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD. (1998) An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 340–5.
- Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. (2002) Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 415(6871): 493.
- Rollag MD, Provencio I, Sugden D, Green CB. 2000. Cultured amphibian melanophores: a model system to study melanopsin photobiology. *Methods Enzymol.* 316: 291–309.
- Reppert SM, Weaver DR. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935–941.
- Stanewsky R. (2002) Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell Tissue Res.* 309:11–26
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M, Hall JC. (1998) The *cry^b* mutation identifies cryptochrome as circadian photoreceptor in

- Drosophila*. Cell 95: 681-692.
- Spudich JL. (2006) The multitaled microbial sensory rhodopsins. Trends Microbiol 14(11): 480-487.
- Sharma AK, Spudich JL, Doolittle WF. (2006) Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. Trends in Microbiology 14, 463-9.
- Somers DE, Devlin PE, Kay SA. (1998) Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 282: 1488-1490.
- Terakita A. (2005) The opsins. Genome Biol 6(3): 213.
- Van Der Horst GTJ, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. (1999) Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398: 627-30.
- Van der Horst MA, Hellingwerf KJ. (2004) Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc Chem Res* 37(1): 13-20.
- Yanovsky MJ, Mazzella MA, Casal JJ. (2000) A quadruple photoreceptor mutant still keeps track of time. *Curr. Biol.* 10:1013-15