



**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**  
**Departamento de Ciências Agrárias**

**O ÁCIDO BUTÍRICO: POSSÍVEL REGULADOR DA EXPRESSÃO  
DOS GENES DO RELÓGIO CIRCADIANO INTESTINAL?**

**TESE DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA**

**Jéssica de Matos Pintado**

**Angra do Heroísmo**

**2010**



**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**  
**Departamento de Ciências Agrárias**

**O ÁCIDO BUTÍRICO: POSSÍVEL REGULADOR DA EXPRESSÃO  
DOS GENES DO RELÓGIO CIRCADIANO INTESTINAL?**

**TESE DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA**

**Orientador: Prof. Doutor Manuel Vicente de Freitas Martins**

**Jéssica de Matos Pintado**

**Angra do Heroísmo**

**2010**



**À minha família**

## Agradecimentos

Ao finalizar este trabalho, gostaria de agradecer algumas pessoas que foram fundamentais e que, de alguma forma, contribuíram para tornar possível a sua realização.

À direcção do centro INRA de Nantes pela oportunidade de realização deste trabalho, e por todos os meios postos à disposição.

Ao Prof. Doutor Bertrand Kaeffer, pela disponibilidade, ajuda, paciência e orientação prestada na realização deste trabalho.

A todo a *Unité des Fonctions Digestives et de Nutrition Humaine* (hoje designada *Physiologie des Adaptations Nutritionnelles*), pelo acolhimento, simpatia e compreensão de todos.

Ao Prof. Doutor Manuel Vicente de Freitas Martins, pela orientação, dedicação e auxílio prestado ao longo de todo o trabalho.

Não podia deixar de agradecer aos meus pais e à minha irmã, por todo o apoio, incentivo, paciência, compreensão e carinho sempre demonstrados.

A todos,

Obrigada.

## Resumo

O presente estudo foi elaborado em células Caco-2, para verificar se a glucose e o ácido butírico regulam a expressão dos genes do relógio circadiano intestinal. O seguimento da expressão de SRF sobre 18h, por imuno-detecção por epifluorescência, confirma que se trata de um *input* do relógio. A imuno-detecção da expressão oscilatória de PERIOD1 sobre 18h e 48h (com intervalos de 6h) comprova que *Period1* é um gene da resposta imediata, fundamental ao funcionamento do relógio. Verificamos ainda que a expressão de PERIOD1 é sincronizada com maior eficácia, utilizando um meio com 1mM de ácido butírico, relativamente a outros meios de cultura (DMEM 10% FCS, 25mM D-glucose, sem glucose nem ácido butírico). A redução significativa da concentração em ácido butírico (0,5, 1 e 2mM) nos sobrenadentes de monocamadas de células Caco-2, comparativamente a sobrenadentes incubados em placas sem células (ANOVA em triplicado; significância: 5%), sugere que o composto será consumido pelas células. Integrando essa observação com o resultado da experiência anterior, deduzimos que o ácido butírico utilizado pelas células servirá de regulador à expressão do gene *Period1*. O uso desse composto poderá assim diminuir a dessincronização dos ritmos de células do relógio, que estará na origem de determinadas patologias.

**Palavras chave:** relógio, *Period1*, Caco-2, sincronização, ácido butírico

## Abstract

This study was realized in Caco-2 cells to determine whether glucose and butyric acid regulate the expression of circadian clock genes in the intestine. The follow-up of the expression of SRF on 18h, by immunodetection by epifluorescence, confirms that it is an input of the clock. Immunodetection of oscillatory PERIOD1 expression on 18h and 48h (with a 6 hours step) shows that *Period1* is an immediate response gene, critical for the correct functioning of the clock. We also note that the expression of PERIOD1 is synchronized more effectively, using a medium with 1 mM butyric acid in relation to other culture media (DMEM 10% FCS, 25mM D-glucose, without glucose nor butyric acid). A significant reduction in the concentration of butyric acid (0.5, 1 and 2mM) in supernatants of monolayers of Caco-2 cells, compared with supernatants incubated on cell-free plastic wells (ANOVA in triplicate; significance: 5%), suggests that the compound can be consumed by the cells. Integrating this observation with the result of previous experience, we deduce that the butyric acid used by cells can serve as regulator of *Period1* gene expression. The use of this compound could help reduce the desynchronization of clock cells rhythms, that can lead to certain diseases.

**Key words:** clock, *Period1*, Caco-2, synchronization, butyric acid

## Lista de Abreviaturas

<b>ADN</b>	: ácido desoxirribonucleico
<b>(c)AMP</b>	: adenosina monofosfato (cíclico)
<b>ARN(m)</b>	: ácido ribonucleico (mensageiro)
<b>bHLH</b>	: <i>basic helix-loop-helix</i>
<b>Bmal1</b>	: <i>Brain-Muscle-Arnt-Like-protein 1</i>
<b>BSA</b>	: albumina de soro bovino
<b>C4</b>	: ácido butírico
<b>CKI<math>\epsilon</math> / <math>\Delta</math></b>	: caseína quinase I epsilon / delta
<b>Clock</b>	: <i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
<b>CRE</b>	: elementos sensíveis ao AMP cíclico
<b>CREB</b>	: proteína que se liga ao nível dos sítios CRE
<b>Ct</b>	: <i>Threshold Cycle</i>
<b>CT</b>	: <i>Circadian Time</i>
<b>CFG</b>	: Cromatografia em fase gasosa
<b>DBP</b>	: <i>albumin site D-Binding protein</i>
<b>DMEM</b>	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>EGF</b>	: factor de crescimento epidermal
<b>FCS</b>	: soro de vitelo fetal
<b>FITC</b>	: <i>Fluoresceine Iso Thio Cyanate</i>
<b>GLUT2 / 5</b>	: transportador de glucose 2 / 5
<b>HLF</b>	: <i>Hepatocyte Leukemia Factor</i>
<b>INRA</b>	: <i>Institut National de la Recherche Agronomique</i>
<b>MCT1</b>	: transportador de ácidos monocarboxílicos
<b>Mesor</b>	: <i>Midline Estimating Statistic Of Rhythms</i>
<b>Npas2</b>	: <i>Neuronal PAS domain protein 2</i>
<b>NSQ</b>	: núcleos supraquiasmáticos
<b>P6 (24)</b>	: placas de cultura celular com 6 (24) poços
<b>PAS</b>	: PERIOD-ARNT-SIM
<b>PBS 0</b>	: <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
<b>(q)PCR</b>	: <i>Polymerase Chain Reaction</i> (quantitativa)
<b>PK1 / 2</b>	: prokineticina 1 / 2
<b>PKR2</b>	: receptores a prokineticina 2

<b>Rev-erb<math>\alpha</math> / <math>\beta</math></b>	: receptor nuclear órfã alpha / beta
<b>Ror-<math>\alpha</math></b>	: <i>Retinoid-related Orphan Receptor alpha</i>
<b>RT- PCR</b>	: <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RGB</b>	: <i>Red Green Blue</i>
<b>s/d</b>	: sem data
<b>SG1</b>	: transportador de glucose dependente do sódio
<b>SRE</b>	: elementos de resposta ao soro
<b>SRF</b>	: factor de resposta ao soro
<b>TEF</b>	: <i>Thyroid Embryonic Factor</i>
<b>TGF <math>\alpha</math></b>	: factor de Crescimento Transformante $\alpha$
<b>TRITC</b>	: <i>Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate</i>
<b>TRH</b>	: tracto retino-hipotalâmico

# Índice Geral

Agradecimentos .....	
Resumo .....	
Abstract.....	
Lista de Abreviaturas.....	
Índice Geral .....	VI
Índice de Figuras.....	IX
Índice de Tabela .....	X
1. Introdução.....	
2. Revisão bibliográfica.....	
2.1 A noção de ritmo biológico.....	
2.1.1 Parâmetros característicos dos ritmos biológicos.....	
2.1.2 Métodos utilizados em laboratório para caracterizar os ritmos biológicos ..	
2.1.3 Componentes dos ritmos biológicos.....	
2.2 As noções de oscilador biológico e relógio .....	
2.3 Características moleculares dos genes que codificam para um componente molecular do relógio.....	
2.3.1 Os membros da família de genes do complexo molecular central: CLOCK:BMAL1 ou NPAS2:BMAL1 .....	
2.3.2 Os genes Period: genes membros da família dos genes codificando para a resposta genica imediata.....	

2.3.3	Os genes Cryptochrome: genes que perderam a actividade fotoliase nos mamíferos .....
2.3.4	Timeless: um gene cuja função foi suplantada por outros genes .....
2.3.5	As caseínas quinase I: componentes críticos do relógio circadiano dos mamíferos .....
2.3.6	Os outros genes.....
2.4	As diferentes classes de relógios circadianos .....
2.5	Os sincronizadores e a noção de desencadeamento.....
2.6	Perspectivas do estudo para a produção animal.....
3.	Material e Métodos.....
3.1	Expressão dos ARN mensageiros que codificam por proteínas do relógio, pelos colonócitos de quatro pacientes saudáveis e por células Caco-2.....
3.2	Choque sérico e formulação dos meios de cultura aplicados a células Caco-2...
3.3	Imuno-deteção por epifluorescência das proteínas SRF e PERIOD1.....
3.4	Semi-quantificação dos sinais emitidos pelas células Caco-2 .....
3.4.1	Semi-quantificação de SRF no tapete celular Caco-2 .....
3.4.2	Semi-quantificação dos sinais (ADN e PERIOD1) emitidos pelos núcleos das células Caco-2 .....
3.5	Dosagens do ácido butírico.....
4.	Resultados e discussão .....
4.1	Expressão dos ARN mensageiros que codificam para proteínas do relógio, por colonócitos de quatro indivíduos saudáveis e por células de carcinoma cólico em cultura.....

4.2	Seguimento da expressão de PERIOD1 e SRF ao longo do tempo.....
4.2.1	Seguimento da expressão de SRF sobre 18h.....
4.2.2	Seguimento da expressão de PERIOD1 ao longo do tempo .....
4.3	Efeitos da formulação do meio de cultura sobre as taxas de expressão de PERIOD1.....
4.3.1	Revelação da expressão de PERIOD1 com diferentes meios de cultura.....
4.3.2	Evolução das taxas de ácido butírico ao longo do tempo.....
5.	Considerações finais.....

## Referências Bibliográficas

## Anexos

## Índice de Figuras

Figura 1: Caracterização gráfica do período de um ritmo .....	
Figura 2: Caracterização gráfica da amplitude de um ritmo .....	
Figura 3: Caracterização gráfica da acrofase de um ritmo .....	
Figura 4: Caracterização gráfica do nível médio ajustado de um ritmo (mesor) .....	
Figura 5: O sistema circadiano: relação entre inputs, relógio e outputs.....	
Figura 6: Regulação bimodal dos genes <i>mPeriod</i> . .....	
Figura 7: Mecanismos moleculares implicados no relógio circadiano dos mamíferos. ....	
Figura 8: Esquema de organização do sistema circadiano dos mamíferos.....	
Figura 9: Disposição das amostras e do <i>master mix</i> de cada gene a testar, em placa de PCR.....	
Figura 10: iCycler iQ Real-Time PCR da BIO-RAD®.....	
Figura 11: Cromatógrafo em fase gasosa <i>HP® – 6890 Series Plus</i> .....	
Figura 12: Evolução das proporções dos genes do relógio em colonócitos .....	
Figura 13: Imuno-deteção de SRF em células Caco-2, sobre 18h.....	
Figura 14: Semi-quantificação de SRF em células Caco-2, sobre 18h .....	
Figura 15: Imuno-deteção de PERIOD1 em células Caco-2 sobre 18h .....	
Figura 16: Imuno-deteção de PERIOD1 em células Caco-2 sobre 48h .....	
Figura 17: Imuno-deteção de PERIOD1 sobre células Caco-2 às 18h, de acordo com o meio de cultura depositado 2h após a realização do choque sérico.....	

Figura 18: Seguimento da evolução da concentração em ácido butírico em poços P24 vazios.....

Figura 19: Seguimento da evolução da concentração em ácido butírico em poços P6 vazios.....

Figura 20: Seguimento da evolução da concentração em ácido butírico em poços P24....

## **Índice de Tabela**

Tabela 1: Percentagem de ácido butírico remanescente após 46h.....

# Introdução

## 1. Introdução

A fisiologia e o comportamento de todos os seres vivos são controlados por ritmos circadianos, conduzidos por osciladores endógenos. O sistema circadiano dos mamíferos é composto por vários osciladores, organizados hierarquicamente: o relógio circadiano central situa-se nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ), enquanto os relógios periféricos encontram-se nos outros tecidos ou órgãos. Esses relógios são controlados por factores genéticos, mas podem igualmente ser modulados por agentes ambientais, chamados agentes sincronizadores. Os relógios periféricos, nomeadamente o relógio que se encontra a nível do intestino, podem ser modulados por agentes sincronizadores distintos dos que modulam o relógio central, tal como a alimentação, em termos de ritmo e composição.

Os indivíduos saudáveis apresentam uma sincronização dos seus ritmos biológicos. Contudo, em condições de dessincronização, podem surgir perturbações dos mesmos (Bogdan e Touitou, 2001; Challamel *et al.*, 2001), que favorecem, a longo prazo, o aparecimento de distúrbios clínicos, tais como cancro, afecções cardiovasculares (Knutsson, 2003; Montagnana *et al.*, 2009), úlceras, obesidade, perturbações do sono e da vigília (Pévet, 2002). Esta dessincronização dos ritmos circadianos afecta um número considerável de pessoas, tais como os operários que trabalham por turnos, os viajantes que efectuam voos trans-meridianos, alguns pacientes que padecem de depressão sazonal, outros distúrbios psiquiátricos, ou insónias, ou ainda os idosos (Acúrcio e Rodrigues, 2009), existindo uma tendência para um aumento regular desse número, devido às condições de vida no mundo moderno e o envelhecimento geral da população. Assim, se a alimentação constitui efectivamente um agente sincronizador,

poderá ser oportuno explorar os efeitos da mesma, na redução desses potenciais distúrbios.

As actividades circadianas do intestino são de conhecimento geral, e dizem respeito à ingestão de alimentos, a digestão, a migração e a proliferação celular. No entanto, a existência de compostos moleculares de um relógio circadiano, a nível do intestino, apenas foi evidenciada pelo Departamento das Funções Digestivas e de Nutrição Humana do centro INRA de Nantes (Pardini *et al.*, 2005).

O presente trabalho será realizado no domínio do relógio circadiano intestinal e da sua modulação pelos nutrientes, nomeadamente pelo ácido butírico, tendo como perspectiva a regulação, através da alimentação, da expressão dos genes do relógio, que possa ser perturbada.

Na revisão bibliográfica, será apresentada a noção de ritmo biológico e o que se entende por relógio, bem como as noções relativas aos genes que codificam para um composto molecular do relógio. Serão depois referenciadas as diferentes classes de relógio que existem no Homem, e a influência dos agentes sincronizadores sobre as mesmas.

Na parte experimental, iremos utilizar uma linhagem celular de carcinoma cólica (Caco-2), após validar a utilização da mesma, como modelo celular, na exploração da regulação da ritmicidade circadiana ao nível de células intestinais. Para tal, iremos

pesquisar, em colonócitos de quatro pacientes saudáveis e em células Caco-2, a presença de ARN mensageiros de um factor de entrada ou *input* (SRF ou Factor de Resposta ao Soro), dos genes do relógio (entre os quais, os de uma proteína reguladora: PERIOD1), e de factores de saída ou *outputs*. Numa segunda etapa, iremos verificar se a manifestação da proteína PERIOD1 é sincronizada por um choque sérico, e se a expressão da mesma oscila com o tempo. Por fim, iremos averiguar se um meio contendo um ácido gordo de cadeia curta, o ácido butírico, favorece a detecção das oscilações de PERIOD1, e se o composto é consumido pelas células Caco-2 na ausência de D-Glucose.

O objectivo geral consiste em verificar o comportamento das células Caco-2 (e caso as mesmas representem um modelo celular aceitável, o comportamento das células intestinais saudáveis) perante o contacto com meios de cultura com composições diferentes da habitual (nomeadamente com um meio contendo 1 mM de ácido butírico), de modo a evidenciar as consequências da alteração de meio de cultura, nas oscilações de PERIOD1, proteína fundamental ao funcionamento do relógio circadiano. Conforme os resultados do estudo de Wood *et al.* (2009), as proteínas PERIOD poderão, de facto, agir na prevenção e controlo de alguns cancros, entre os quais o cancro do cólon.

A experimentação foi realizada na perspectiva humana, como primeira abordagem pelo laboratório, para o estudo da maturação do tracto gastrointestinal e aquisição de relógio biológico funcional pelos recém-nascidos, em particular de prematuros.

A aplicação desse modelo para a produção animal poderá igualmente adquirir alguma relevância, na redução das taxas de mortalidade, nomeadamente de crias, tendo sido demonstrado, em vários estudos, que o ácido butírico (bem como outros ácidos gordos de cadeia curta/média) tem efeitos benéficos sobre a saúde do tracto gastrointestinal, ao reforçar a função de barreira contra organismos patogénicos. O aprofundamento desse tema na produção animal poderá fomentar uma alternativa à utilização de antibióticos na produção animal, já proibidos por Lei, devido ao desenvolvimento de antibioresistências.

**Revisão**  
**Bibliográfica**

## 2. Revisão bibliográfica

O conhecimento dos ritmos biológicos é relativamente recente. De facto, a verdadeira ciência dos ritmos apenas surge pouco antes da Segunda Guerra Mundial, com o estabelecimento de equipas e conceitos (Boissin e Canguilhem, 1998). Em todos os seres vivos, a maioria das actividades biológicas, quer fisiológicas (taxas hormonais, temperatura corporal), quer comportamentais (actividade locomotora, ingestão de alimentos), apresentam actividades rítmicas diárias (Aujard, 2002; Chen *et al.*, 2010). Os ritmos biológicos foram assim evidenciados no Homem, no mundo animal e vegetal, a todos os níveis de organização, da célula ao organismo na sua íntegra (Pardini e Kaeffer, 2006). Foram analisados e quantificados cerca de 170 ritmos biológicos no Homem (ritmo cardíaco, ritmo do sono, ritmo do cortisol plasmático, ritmo de mitoses, entre outros). A cronobiologia representa o estudo desses ritmos (Estruch, 2003), relacionando-os com a saúde e com a doença (Acúrcio e Rodrigues, 2009).

### 2.1 A noção de ritmo biológico

Um ritmo biológico define-se como uma sequência de variações fisiológicas estatisticamente significativas, que determinam oscilações periódicas em função do tempo. Trata-se assim de um fenómeno periódico e previsível, cujos resultados podem ser apresentados mediante curvas (concentrações da variável em função do tempo), designadas cronogramas (Bogdan e Touthou, 2001; Challamel *et al.*, 2001).

Os ritmos circadianos (do latim *circa*, cerca, e *dies*, dia) representam o protótipo dos

ritmos biológicos, tendo em conta que o período de cerca de 24 horas que os caracterizam é o mais expressado pelos organismos vivos (Goldbeter e Leloup, 2003). Tais ritmos reflectem a existência de um oscilador circadiano intrínseco fundamental, também denominado relógio biológico (Harmer *et al.*, 2001; Young e Kay, 2001). Esse oscilador circadiano pode ser benéfico ao organismo, uma vez que pode orquestrar provisoriamente os processos fisiológicos e comportamentais, para uma melhor adaptação às mudanças diárias previsíveis no ambiente (Johnson, 1992; Panda *et al.*, 2002; Wirz-Justice, 2007; Acúrcio e Rodrigues, 2009), como a alternância dia-noite.

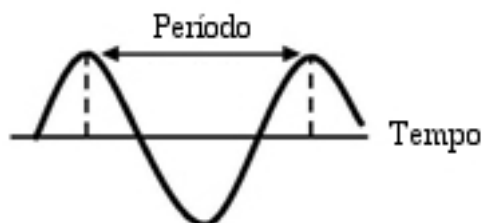
Existem igualmente ritmos com períodos inferiores a 20 horas (de milésimas de segundos a 20 horas), como os batimentos cardíacos, os electroencefalogramas, e os movimentos oculares rápidos, chamados ritmos ultradianos e ritmos cujos períodos são superiores a 28 horas (de 28 horas a um ano ou mais), como a actividade reprodutora de certos animais em determinadas estações do ano, ou as migrações de diversos animais, chamados ritmos infradianos (Bogdan e Touitou, 2001; Challamel *et al.*, 2001; Cermakian, 2002; Estruch, 2003).

### **2.1.1 Parâmetros característicos dos ritmos biológicos**

Quatro parâmetros caracterizam um ritmo biológico: o período, a amplitude, a acrofase e o mesor (Challamel *et al.*, 2001; Estruch, 2003; Acúrcio e Rodrigues, 2009).

O período representa a duração de um ciclo completo da variação rítmica estudada (Bogdan e Touitou, 2001; Challamel *et al.*, 2001; Estruch, 2003; Mauvieux *et al.*, 2004;

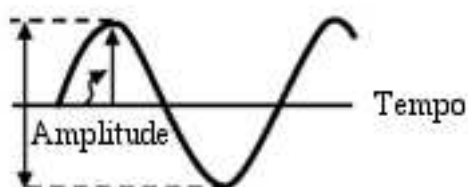
Acúrcio e Rodrigues, 2009) e encontra-se ligado à frequência pela razão inversa (Figura 1).



**Figura : Caracterização gráfica do período de um ritmo**

**Fonte:** Touitou e Haus (1994) citados por Challamel *et al.* (2001).

A amplitude corresponde à metade da variabilidade total (Estruch, 2003; Mauvieux *et al.*, 2004), ou seja, equivale à diferença entre o pico e o mínimo da função estudada (Acúrcio e Rodrigues, 2009) (Figura 2). Um ritmo é, contudo, apenas detectado quando a sua amplitude é diferente de zero, com um nível de significância estatística de 95% (Bogdan e Touitou, 2001; Challamel *et al.*, 2001). A amplitude traduz, por exemplo, a intensidade (força) de um sincronizador.

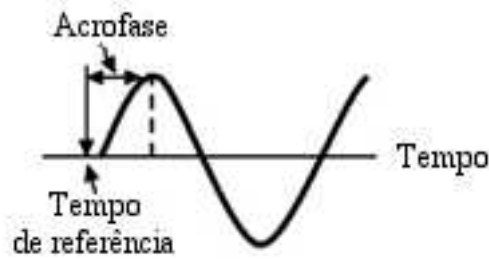


**Figura : Caracterização gráfica da amplitude de um ritmo**

**Fonte:** Touitou e Haus (1994) citados por Challamel *et al.* (2001).

A acrofase refere-se à localização do ponto máximo da função (sinusoidal por exemplo) utilizada para a aproximação do ritmo (Figura 3). Para um ritmo circadiano, a acrofase corresponde à hora do pico numa escala de 24 horas (Bogdan e Touitou,

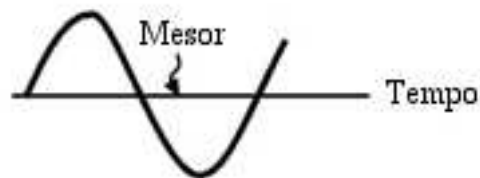
2001; Challamel *et al.*, 2001; Acúrcio e Rodrigues, 2009).



**Figura : Caracterização gráfica da acrofase de um ritmo**

**Fonte:** Touitou e Haus (1994) citados por Challamel *et al.* (2001).

O mesor (acrónimo de *Midline Estimating Statistic Of Rhythms*) é o nível médio ajustado do ritmo (Estruch, 2003), que corresponde à média aritmética quando os dados (recolha de sangue, por exemplo) são equidistantes e cobrem um ciclo completo (Bogdan e Touitou, 2001; Challamel *et al.*, 2001) (Figura 4).



**Figura : Caracterização gráfica do nível médio ajustado de um ritmo (mesor)**

**Fonte:** Touitou e Haus (1994) citados por Challamel *et al.* (2001).

### **2.1.2 Métodos utilizados em laboratório para caracterizar os ritmos biológicos**

Utilizam-se dois métodos para caracterizar os ritmos biológicos:

- a imuno-deteção por epifluorescência de proteínas do relógio;
- e a PCR quantitativa em tempo real de ARNm do relógio (qPCR).

Estes métodos devem ser precisos, reprodutíveis e específicos.

A precisão é avaliada pelo coeficiente de variação. Na qPCR, o coeficiente de variação é de apenas 1%, enquanto pode atingir o valor de 30% no caso da imuno-deteção por epifluorescência. A qPCR é assim a técnica mais sensível de deteção e de quantificação. Contudo, se a imunodeteção é um método qualitativo, a sua vantagem é de permitir verificar oscilações e localizar a proteína num compartimento celular. A qPCR pode ser considerada um método quantitativo, uma vez que permite avaliar o nível de expressão dos genes do relógio, após extração dos ARNm.

Os dois métodos serão assim utilizados em conjunto, de modo a beneficiar das vantagens de cada um.

### **2.1.3 Componentes dos ritmos biológicos**

Os relógios podem funcionar sem sinais exteriores, ou pelo contrário, responder a sinais ambientais (Cermakian, 2002). Os ritmos biológicos resultam assim da influência partilhada de factores exógenos (alternância luz-obscuridade, quente-frio ou variações sazonais) e de elementos endógenos, de origem genética (Challamel *et al.*, 2001).

Os factores ambientais, ou factores exógenos, não criam ritmos, mas modulam-nos. São assim designados sincronizadores, agentes desencadeantes ou ainda agentes indicadores de tempo (*zeitgeber*) (Johnson, 1992; Bogdan e Touitou, 2001; Challamel

*et al.*, 2001; Wirz-Justice, 2007). A alternância entre a luz e a obscuridade durante o ciclo dia-noite é o sincronizador com maior potência (factor fótico), mas outros factores, nomeadamente sociais, comportamentais ou nutricionais (agentes não fóticos) podem igualmente desempenhar um papel relevante na modulação dos ritmos (Pévet, 2002).

Controlando as componentes exógenas dos ritmos biológicos, podemos evidenciar experimentalmente as suas componentes endógenas. De facto, os relógios circadianos continuam a medir o tempo na ausência de sinais temporais ambientais (Dickmeis, 2009). Desse modo, os indivíduos mantidos na obscuridade (ou seja, na ausência de indícios que possam indicar o tempo) mantêm-se rítmicos, mas os seus ritmos circadianos começam a derivar para um período de aproximadamente 25 horas. Por outras palavras, a sincronização do sono é atrasada em cerca de uma hora em cada noite (Moore-Ede, 1986<sup>a</sup>).

Na ausência de sincronizador externo, o relógio biológico interno funciona em livre curso, com um pequeno atraso ou avanço sobre o ritmo de 24 horas (Jouvet, s/d; Cermakian, 2002; Wirz-Justice, 2007), dependendo do indivíduo.

O termo “em livre curso”, referido anteriormente, é utilizado para descrever um ritmo que se mantém indefinidamente quando não existem sinais exógenos, excepto a variação periódica da ingestão alimentar.

Os termos “dia subjectivo” e “noite subjectiva”, utilizados quando nos referimos a condições de livre curso, fazem alusão ao período durante o qual o comportamento evidenciado pelo indivíduo corresponde ao esperado, em condições em que existem sinais durante o dia ou a noite (Johnson, 1992). Essas expressões são um conceito necessário, uma vez que o ritmo circadiano em livre curso não dura exactamente 24 horas.

Por outro lado, os estímulos ambientais que ajustam o sistema circadiano (ou *zeitgebers*) atrasam, avançam ou não têm qualquer efeito na sincronização do estimulador, consoante a fase do ciclo em que foram aplicados. Por exemplo, um animal mantido em total obscuridade, sem quaisquer sinais temporais, mas submetido a uma curta exposição à luz, apresentará um atraso na fase do seu ritmo se a exposição for efectuada cedo, na noite subjectiva. O mesmo impulso, aplicado tarde na noite subjectiva leva a uma fase de avanço no ciclo. No entanto, se o sinal luminoso for administrado ao meio do dia subjectivo, o mesmo não terá qualquer efeito no ajustamento de fase (Moore-Ede, 1986<sup>b</sup>).

Os numerosos dados que mostram uma base genética para a ritmicidade circadiana e os períodos em livre curso para cada espécie e indivíduos podem ser, assim, a melhor prova de que o comportamento rítmico circadiano não é gerado por sinais exógenos (Johnson, 1992).

## 2.2 As noções de oscilador biológico e relógio

As noções de oscilador circadiano e relógio devem ser distinguidas (Earnest *et al.*, 1999):

- um “oscilador” é apenas um aparelho que oscila;
- um “relógio” representa qualquer instrumento que possa medir ou indicar o tempo;
- um “*pacemaker*” define-se como um processo ou substância que regula a cronometragem de outros eventos.

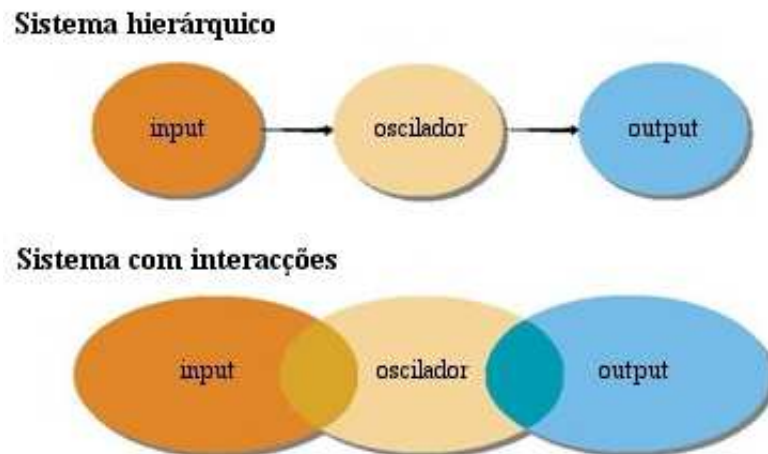
Descreve-se muitas vezes o sistema circadiano como sendo constituído por três partes (Cermakian e Sassone-Corsi, 2000; Harmer *et al.*, 2001):

- um oscilador que gera a ritmicidade;
- vias de entrada, que recebem e reagem os sinais ambientais que originam o arranque do oscilador;
- componentes de saída, que criam os ritmos.

Essa descrição é bastante simplificada, tendo em conta que alguns componentes do *input* do relógio podem igualmente ser *outputs* do mesmo (Emery *et al.*, 1998; Bognár *et al.*, 1999).

Assim, a análise dos papéis desempenhados pelos genes do relógio revelou que os

componentes conceptuais do relógio podem sobrepor-se (Figura 5) (Foster e Lucas, 1999).



**Figura : O sistema circadiano: relação entre inputs, relógio e outputs.**

**Fonte:** Foster e Lucas (1999).

O elemento fundamental do relógio circadiano é composto por um oscilador molecular controlado por um pequeno número de genes, designados genes do relógio. As interações entre esses genes e os seus produtos geram um ciclo de auto-regulação transcricional e traducional auto-entretida, que actua sobre outros genes, chamados genes controlados pelo relógio, que controlam a fisiologia dos organismos (Lacoeche e Delaunay, 2003).

Actualmente existe um esquema aceite para o funcionamento dos genes do relógio, segundo o qual dois tipos de proteínas reguladoras da transcrição (PAS) iniciam o ciclo. Estas proteínas reguladoras podem ter expressão constitutiva ou transitória e, ao dimerizarem-se, vão desencadear a expressão de genes centrais do relógio. São

assim codificadas proteínas funcionais que podem ter três funções (Young e Kay, 2001; Acúrcio e Rodrigues, 2009):

- entrar no núcleo e inibirem a sua expressão génica;
- estimular a síntese de mais proteínas reguladoras;
- e/ou aumentarem os genes a jusante regulados pelo relógio.

O trabalho do relógio molecular consiste então em ciclos de *feedback* de transcrição e de tradução auto-reguladores, com elementos positivos e negativos (Dunlap, 1999).

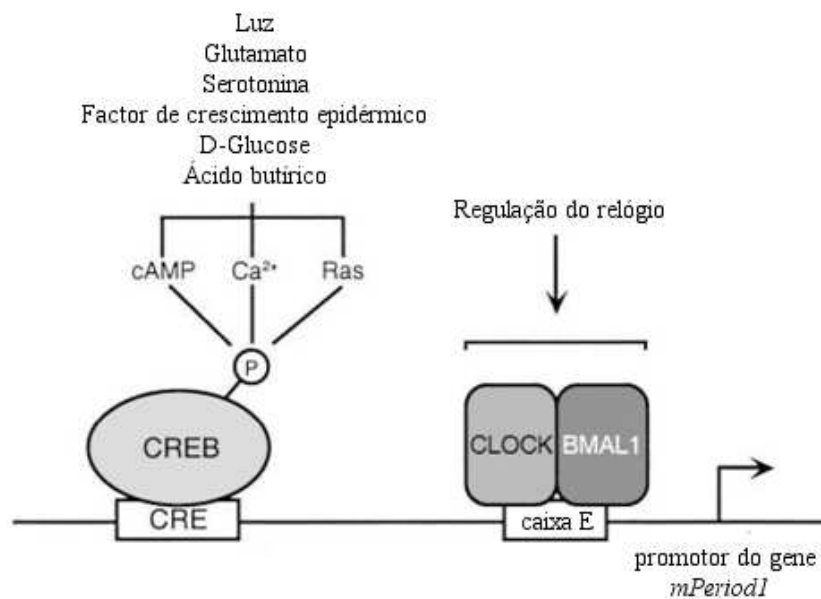
Os compostos positivos correspondem aos dois factores de transcrição CLOCK e BMAL1 (Gekakis *et al.*, 1998; Hogenesch *et al.*, 1998; Takahata *et al.*, 1998), enquanto as proteínas mPERIOD e mCRYPTOCHROME parecem actuar como compostos negativos do ciclo de *feedback* (Shearman *et al.*, 2000<sup>a</sup>).

CLOCK dimeriza-se com BMAL1 (Gekakis *et al.*, 1998), para constituir o complexo molecular central do *pacemaker*. Essas duas proteínas unem-se a uma caixa E, situada na região dos promotores dos genes a serem transcritos (Challamel *et al.*, 2001): os três genes *Period* (designados *mPeriod1*, *mPeriod2* e *mPeriod3* no rato), os 2 genes *Cryptochrome* (*mCryptochrome1* e *mCryptochrome2*) (Gekakis *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 1999; Kume *et al.*, 1999) e os genes controlados pelo relógio (Shearman *et al.*, 2000<sup>a</sup>; Claustrat *et al.*, 2005), como *Rev-erba* (Kamphuis *et al.*, 2005). É ainda provável que os mesmos regulem negativamente a expressão do gene *Bmal1* (Shearman *et al.*, 2000<sup>a</sup>).

A heterodimerização entre CLOCK e BMAL1 é imprescindível, tendo em conta que os heterodímeros CLOCK:BMAL1 geram uma activação substancial da transcrição, enquanto as proteínas CLOCK ou BMAL1 produzem uma actividade mais reduzida, quando funcionam isoladamente (Gekakis *et al.*, 1998). A activação da transcrição por esse heterodímero exige, contudo, e no mínimo, um dos sítios de caixa E, de sequência nucleotídica CACGTG (Hao *et al.*, 1997).

Para além das caixas E, foram identificados vários elementos de resposta ao AMP cíclico (cAMP) e sítios de elementos de resposta ao soro, nas regiões promotoras dos genes do relógio do rato. A activação dos genes *Period* poderá assim ser bimodal (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002), com uma via de integração dos sinais reguladores do relógio pelos complexos CLOCK:BMAL1, que se ligam ao nível de caixas E dos genes *Period* e uma via de integração dos sinais sincronizadores pelo complexo de proteínas, que se ligam ao nível dos sítios *cAMP response elements* (CREB) (Figura 6).

Os elementos sensíveis ao cAMP, designados CRE, encontram-se nos promotores dos genes *Period1* e *Period2* (mas não nos de *Period3*) (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002). Esses sítios integram tanto os sinais provenientes de uma vasta categoria de sincronizadores (tais como a serotonina, o glutamato, os iões  $Ca^{2+}$ , a luz), como a resposta a uma segunda extensa categoria de sincronizadores (tais como os factores de crescimento, as hormonas, as citoquinas).



**Figura : Regulação bimodal dos genes *mPeriod*.**

**Fonte:** adaptado de Travnickova-Bendova *et al.* (2002).

Deve-se, ainda, acrescentar um conjunto de locais de integração, tais como os elementos de resposta à glucose, que podem integrar nutrientes com acção de sincronização, como a D-Glucose (Hirota *et al.*, 2002), os elementos de resposta ao soro, que podem integrar o sinal proveniente de um sincronizador dependente da adição de soro de vitelo fetal por activação de um factor de transcrição: o Factor de Resposta ao Soro (SRF) (Chai e Tarnawski, 2002) e os elementos de resposta ao ácido butírico (Pardini e Kaeffer, 2006).

Os genes do relógio, transcritos anteriormente, são então traduzidos em proteínas, que irão inibir ritmicamente a sua própria transcrição (Lakin-Thomas, 2000), criando modelos oscilantes de expressão de genes (Harmer *et al.*, 2001).

Para tal, as proteínas mCRYPTOCHROME dimerizam-se com as proteínas mPERIOD, através dos domínios PAS respectivos (Challamel *et al.*, 2001), permitindo assim a translocação dessas últimas do citoplasma ao núcleo, onde o complexo tem um efeito inibidor sobre o complexo CLOCK:BMAL1-caixa E, e logo, sobre a transcrição dos seus genes (Kume *et al.*, 1999), através da modificação da interacção de CLOCK:BMAL1 com as caixas E respectivas (Gekakis *et al.*, 1998; Dunlap, 1999; Shearman *et al.*, 2000<sup>a</sup>). As proteínas mCRYPTOCHROME1, mCRYPTOCHROME2, mPERIOD1, mas essencialmente mPERIOD2, poderão igualmente regular, de forma positiva, a transcrição de *Bmal1*, transportando um activante não identificado no núcleo e/ou agindo como um co-activante (Shearman *et al.*, 2000<sup>a</sup>).

A inactivação periódica dos componentes do oscilador é essencial à produção de oscilações pelo mesmo. A mesma pode ser obtida pela degradação de pelo menos um componente do relógio, como PERIOD1 e PERIOD2 nos mamíferos (Harmer *et al.*, 2001), através de fosforilação dessas proteínas pela caseína quinase I epsilon (CKI $\epsilon$ ) antes de serem degradadas (Keesler *et al.*, 2000). Para além de reduzir a estabilidade de PERIOD, CKI $\epsilon$  parece controlar a entrada dessa proteína no núcleo. CKI $\epsilon$  liga-se e fosforila PERIOD1, desmascarando o sítio do sinal de translocação nuclear, impedindo a retenção dessa proteína no citoplasma (Vielhaber *et al.*, 2000).

As proteínas CRYPTOCHROME são igualmente degradadas pela CKI $\epsilon$ , mas, por não possuírem local de fixação da quinase, é necessária a sua interacção com PERIOD. O complexo PERIOD:CRYPTOCHROME permite ainda a entrada de CKI $\epsilon$  no núcleo, para fosforilar as proteínas intra-nucleares do relógio (Eide *et al.*, 2002).



## **2.3 Características moleculares dos genes que codificam para um componente molecular do relógio**

### **2.3.1 Os membros da família de genes do complexo molecular central: CLOCK:BMAL1 ou NPAS2:BMAL1**

Os genes do *pacemaker*, ou seja, *Clock/Npas2* e *Bmal1*, são fundamentais para criar e manter os ritmos sob condições constantes (Cermakian e Sassone-Corsi, 2000).

A análise molecular do mecanismo circadiano dos mamíferos iniciou com a identificação de um rato mutante ao gene *Clock* (Gekakis *et al.*, 1998). *Clock* ou *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (Young e Kay, 2001) foi, de facto, o primeiro gene do relógio a ser identificado (Vitaterna *et al.*, 1994; citados por Kume *et al.*, 1999), e clonado nos mamíferos (King *et al.*, 1997). O gene humano *Clock* foi, no entanto, apenas clonado e caracterizado em 1999 (Steeves *et al.*, 1999). Esse gene localiza-se no cromossoma 5 do rato (Challamel *et al.*, 2001), e no cromossoma 4 dos humanos (Steeves *et al.*, 1999). O homólogo funcional desse gene, designado *Npas2* (*Neuronal PAS domain protein 2*) (Reick *et al.*, 2001) ou *Mop4* (Hogenesch *et al.*, 1998), situa-se no cromossoma 1 do rato e no cromossoma 2 dos humanos (Zhou *et al.*, 1997).

A mutação ao gene *Clock* provoca, no animal, um período em livre curso anormalmente extenso (Vitaterna *et al.*, 1994; citados por Kume *et al.*, 1999; King *et al.*, 1997). Assim, em condições de total obscuridade, o período do ciclo actividade-reposo do rato é de 23,48 horas nos animais normais (*Clock+/+*), 24,18 horas para os

heterozigóticos (*Clock*+/-), e 27,36 horas para os homozigóticos (*Clock*-/-) (Antoch *et al.*, 1997), nos quais o ritmo desaparece após 2 semanas de obscuridade (Vitaterna *et al.*, 1994; citados por Steeves *et al.*, 1999). Ratos deficientes em *Npas2* exibem défices de memória a longo prazo, pelo que se conclui que esse gene poderá ter um papel regulador na aquisição dos tipos específicos de memória (Garcia *et al.*, 2000).

O gene *Clock* é constantemente exprimido (Piggins, 2002), e em vários tecidos (King *et al.*, 1997). Os ARN de *Clock* revelam uma elevada expressão nos NSQ e no cerebelo (Steeves *et al.*, 1999), mas os seus níveis não parecem sofrer oscilações (Tei *et al.*, 1997; Oishi *et al.*, 1998; Shearman *et al.*, 2000<sup>a</sup>), pelo que a síntese da proteína CLOCK não varia durante o ciclo (Pévet, 2002). Quanto à expressão do gene *Npas2*, a mesma inicia-se na primeira semana de desenvolvimento pós-natal (Zhou *et al.*, 1997).

A proteína CLOCK é, como NPAS2 (Garcia *et al.*, 2000), um factor de transcrição basic helix-loop-helix (bHLH) PERIOD-ARNT-SIM (PAS), ou seja, contém um domínio de ligação ao ADN e domínios de dimerização de proteínas. Desse modo, a mesma participa, com outras proteínas, na regulação da maioria dos genes de saída (King *et al.*, 1997). CLOCK (ou NPAS2) dimeriza-se assim com outra proteína bHLH PAS, isolada nos humanos por Ikeda e Nomura (1997), designada BMAL1 (*Brain-Muscle-Arnt-Like-protein 1*) (Gekakis *et al.*, 1998), MOP3 (Hogenesch *et al.*, 1998) ou ARNT3 (Takahata *et al.*, 1998), para activar a transcrição de vários genes. A proteína mutante CLOCK pode ainda constituir, com BMAL1, heterodímeros que se ligam ao ADN, mas esses não podem activar a transcrição (Gekakis *et al.*, 1998).

Os ratos mutantes para o gene *Bmal1* (*Bmal1* *-/-*) são arrítmicos a partir da colocação dos mesmos em condições de obscuridade total. Os níveis de actividade desses animais em ciclos de luz-obscuridade são reduzidos (Bunger *et al.*, 2000), pelo que se comprova que o relógio dos mesmos é totalmente inoperante (Cermakian, 2002).

No rato, os níveis de ARN de *Bmal1* são rítmicos nos NSQ, atingindo um pico aquando a transição obscuridade-luz, ou seja, em oposição de fase com os ritmos descritos para os genes *Period* (Oishi *et al.*, 1998). Manifesta-se também a expressão de ARN de *Bmal1* nos tecidos periféricos, como o cérebro (Ikeda e Nomura, 1997; Oishi *et al.*, 1998; Takahata *et al.*, 1998), o músculo esquelético (Ikeda e Nomura, 1997; Takahata *et al.*, 1998), o coração (Ikeda e Nomura, 1997; Oishi *et al.*, 1998), os olhos, os rins, os pulmões (Oishi *et al.*, 1998) e embriões de ratos (Takahata *et al.*, 1998).

O ritmo dos ARN de *Bmal1* conduz o ritmo das proteínas BMAL1, após um atraso de 4 a 6 horas. A disponibilidade dessas proteínas é limitante para a formação de um heterodímero, e assim, crítica para a re-inicialização dos ciclos (Reppert e Weaver, 2001).

### ***2.3.2 Os genes *Period*: genes membros da família dos genes codificando para a resposta genica imediata***

Três homólogos do gene *Period* da drosófila foram identificados em ratos e nos humanos. *Period1* foi descoberto por Sun *et al.* (1997), que o designaram *m-rigui* (nome de um relógio solar chinês) e por Tei *et al.* (1997), que o designaram *Period*. O

gene *Period2* foi isolado, no mesmo ano, por Albrecht *et al.* (1997) e clonado por Shearman *et al.* (1997). O gene *mPeriod3* apenas foi identificado no ano seguinte, por Zylka *et al.* (1998<sup>a</sup>).

A análise do genoma humano revelou a presença de um quarto membro na família. Contudo, *hPeriod4* aparece como um pseudo-gene, que não terá qualquer função no relógio circadiano endógeno (Gotter e Reppert, 2001).

Os genes *Period* apresentam uma expressão circadiana cíclica nos NSQ (Albrecht *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1997; Shigeyoshi *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1997; Tei *et al.*, 1997; Zylka *et al.*, 1998<sup>a</sup>), em tecidos periféricos como o fígado, o músculo esquelético (Oishi *et al.*, 1998; Zylka *et al.*, 1998<sup>a</sup>) e em linhagens celulares em cultura, estimuladas (Balsalobre *et al.*, 1998; 2000; Yagita e Okamura, 2000; Yagita *et al.*, 2001).

Os ratos mutantes ao gene *Period1* (*Period1* *-/-*) demonstram um período circadiano em livre curso diminuto relativamente ao período normal, com precisão e estabilidade reduzidas (Zheng *et al.*, 2001). Os ratos mutantes ao gene *Period2* exibem igualmente um período circadiano encurtado, seguido de uma perda de ritmicidade circadiana em obscuridade constante (Zheng *et al.*, 1999). Ratos privados dos genes *mPeriod1* e *mPeriod2* não apresentam quaisquer ritmos circadianos. Zheng *et al.* (2001) deduziram assim que mPERIOD1 e mPERIOD2 têm funções distintas, mas complementares, no mecanismo do relógio dos ratos. Foi evidenciado recentemente que esses genes têm propriedades supressoras de tumores, sendo que a expressão

reduzida desses genes foi reportada em vários tipos de cancros (Wood *et al.*, 2009; Xiaoming Yang *et al.*, 2009).

Ratos deficientes em proteína mPERIOD3 mantêm ritmos de actividade locomotora relativamente normais, mas a duração do ciclo circadiano desses animais é significativamente reduzida (na ordem de 0,5 horas) relativamente a animais sem deficiência. Os ritmos de ARN de *mPeriod1*, *mPeriod2*, *mCryptochrome1* e *Bmal1* nos NSQ, bem como a expressão rítmica dos ARN de *mPeriod1* e *mPeriod2* no músculo esquelético não diferem dos de rato de tipo selvagem. *mPeriod3* não é assim necessário aos ritmos circadianos do rato, mas poderá funcionar como uma proteína de saída, que traduz a oscilação do relógio circadiano central a genes efectores (Shearman *et al.*, 2000<sup>b</sup>). Trata-se porém de um gene cuja análise poderá ser relevante, tendo em conta que Ebisawa *et al.* (2001) descobriram a implicação desse gene na síndrome de desfasamento do sono no Homem.

*Period1* e *Period2* são genes de expressão diurna nos NSQ, expressos em condições de livre curso, e que podem ser desencadeados por um sinal luminoso externo (Albrecht *et al.*, 1997). *mPeriod1* é, de facto, rapidamente induzido por uma exposição à luz de curta duração (Shigeyoshi *et al.*, 1997), uma vez que a transcrição de *mPeriod1* inicia-se 7 a 15 minutos após essa exposição (Albrecht *et al.*, 1997). No entanto, e ao contrário dos outros genes da família, o gene *Period3* não responde à luz (Zylka *et al.*, 1998<sup>a</sup>).

Cada gene *Period* terá assim uma função distinta nos NSQ (Zylka *et al.*, 1998<sup>a</sup>), tendo

ainda em conta que os três genes manifestam picos de expressão em diferentes períodos do dia: o pico de *mPeriod1* ocorre primeiro, entre CT 4 e 6, seguido do de *mPeriod3*, entre CT 4 e 8, e finalmente o de *mPeriod2*, por volta de CT 8 (Dunlap, 1999).

As proteínas para as quais esses genes codificam possuem domínios PAS de dimerização de proteínas (Shearman *et al.*, 1997; Zylka *et al.*, 1998<sup>a</sup>), mas a análise de sequência dessas proteínas indica que as mesmas não apresentam domínios bHLH (Hogenesch *et al.*, 1998).

Os níveis de proteínas mPERIOD1 apenas são expressos 4 a 6 horas após a expressão máxima em ARN de *mPeriod1* nos NSQ (Hastings *et al.*, 1999). Em outras palavras, a distribuição dos picos de proteínas mPERIOD é sincronizada com o declínio dos seus ARNm (Shearman *et al.*, 2000<sup>b</sup>), o que ilustra o papel dessa proteína na auto-regulação da sua transcrição (Hastings *et al.*, 1999; Shearman *et al.*, 2000<sup>b</sup>).

Ao contrário das proteínas mPERIOD1 e mPERIOD2, que se localizam no citoplasma e no núcleo, ou apenas no núcleo, as proteínas mPERIOD3 somente surgem no citoplasma (Kume *et al.*, 1999). Field *et al.* (2000) demonstraram que associações de proteínas mPERIOD (nomeadamente entre mPERIOD1 e mPERIOD3) (Kume *et al.*, 1999) ou associações mPERIOD:mCRYPTOCHROME são possíveis, e poderão ter um papel relevante na sua translocação nuclear, e assim completar a parte negativa do ciclo de *feedback* do relógio dos mamíferos (Zylka *et al.*, 1998<sup>a</sup>). Para outros autores, entre os quais Yagita *et al.* (2000), a translocação nuclear de pelo menos

PERIOD1 é possível na ausência de proteínas CRYPTOCHROME.

### **2.3.3 Os genes *Cryptochrome*: genes que perderam a actividade fotoliase nos mamíferos**

Os humanos e os ratos possuem dois genes *Cryptochrome* (Vitaterna *et al.*, 1999): *Cryptochrome1* e *Cryptochrome2*.

As proteínas mCRYPTOCHROME são componentes do relógio, pois a expressão dos genes *Cryptochrome* é similar a dos genes do relógio (expressam-se na retina, nos NSQ e nos tecidos periféricos) (van der Horst *et al.*, 1999).

Os genes *Cryptochrome1* e *Cryptochrome2* expressam-se a níveis elevados nos NSQ (Kume *et al.*, 1999), células ganglionares e na camada nuclear interna da retina (Miyamoto e Sancar, 1998), tendo lhes sido atribuída uma função na foto-recepção circadiana durante algum tempo (Kobayashi *et al.*, 1998; Miyamoto e Sancar, 1998).

Okamura *et al.* (1999) afirmam contudo que as mesmas são dispensáveis a essa função no rato, uma vez que as respostas de NSQ à luz são mantidas em ratos deficientes em mCRYPTOCHROME.

Em termos de comportamento, os ratos mutantes ao gene *Cryptochrome1* (*Cryptochrome1* *-/-*) apresentam um período circadiano acelerado, ou seja, encurtado

em 1 hora (Vitaterna *et al.*, 1999) a 1 hora e meia em total obscuridade (van der Horst *et al.*, 1999) relativamente a ratos de tipo selvagem. Ratos mutantes ao gene *Cryptochrome2* (*Cryptochrome2* *-/-*) manifestam, pelo contrário, uma periodicidade em livre curso atrasada nessas condições, aproximando as 24,6 horas (van der Horst *et al.*, 1999). Deduzimos assim que a duração do período do relógio é modulada de forma antagonista por *Cryptochrome1* e *Cryptochrome2* (van der Horst *et al.*, 1999).

Em condições de luz-obscuridade, os ratos mutantes a um desses genes mantêm uma ritmicidade circadiana de 24 horas, o que indica que uma deficiência em *Cryptochrome1* ou em *Cryptochrome2* não tem impacto sobre o desencadeamento da actividade pela luz (van der Horst *et al.*, 1999).

Os ratos mutantes aos dois genes *Cryptochrome* são arrítmicos em obscuridade constante (Vitaterna *et al.*, 1999). Essa perda de ritmicidade em livre curso é completa e instantânea (van der Horst *et al.*, 1999), o que sugere que *mCryptochrome1* e *mCryptochrome2* sejam essenciais à função do relógio (Kume *et al.*, 1999).

Ratos heterozigóticos para o gene *Cryptochrome2* (*Cryptochrome2* *+/-*) exibem um ritmo em livre curso mais reduzido relativamente a ratos deficientes em *Cryptochrome1*, que progride em arritmicidade. Esses animais possuem efectivamente um relógio, mas o mesmo apenas funciona, na ausência de luz, durante um número limitado de ciclos, o que indica que *Cryptochrome2* tem uma implicação directa na manutenção do relógio. Contudo, é necessário salientar que essa perda de ritmicidade é reversível, tendo em conta que o relógio desses ratos volta à normalidade, em

condições normais de luz-obscuridade (van der Horst *et al.*, 1999).

Os genes *Cryptochrome1* e *Cryptochrome2* são assim fundamentais à expressão normal dos ritmos comportamentais circadianos e dos ritmos circadianos de *mPeriod1* e *mPeriod2* nos NSQ (Vitaterna *et al.*, 1999).

Para poder interagir com o heterodímero CLOCK:BMAL1, as proteínas CRYPTOCHROME devem tornar-se nucleares. As mesmas dimerizam-se assim com proteínas PERIOD, permitindo a translocação do complexo do citoplasma ao núcleo, onde o mesmo tem um efeito inibidor sobre o complexo CLOCK:BMAL1-caixa E, e assim sobre a sua própria transcrição (Kume *et al.*, 1999). Estudos *in vitro* demonstraram porém que a capacidade das proteínas mCRYPTOCHROME em inibir a transcrição é independente das interações com as proteínas. Na ausência de proteínas CRYPTOCHROME, a expressão dos genes conduzida por CLOCK:BMAL1 é, efectivamente, potenciada (Shearman *et al.*, 2000<sup>a</sup>).

#### **2.3.4 *Timeless: um gene cuja função foi suplantada por outros genes***

Sangoram *et al.* (1998) identificaram e clonaram os genes *Timeless* do rato e do homem, *mTimeless* e *hTimeless*, que codificam por proteínas que partilham uma grande homologia de sequência com a proteína dTIMELESS da drosófila.

No entanto, o papel de *mTimeless* na função do relógio nos NSQ ainda não foi claramente definido (Jin *et al.*, 1999), uma vez que se colocam questões quanto à

efectiva participação da proteína TIMELESS nos ciclos dos mamíferos e ao facto da mesma ser realmente um homólogo funcional da proteína TIMELESS da drosófila (Gotter *et al.*, 2000).

Os dados de Zylka *et al.* (1998<sup>b</sup>) suportam a ideia de que a evolução dos três genes *Period* terá suplantado a função do gene da drosófila nos mamíferos.

### **2.3.5 As caseínas quinase I: componentes críticos do relógio circadiano dos mamíferos**

A família dos genes caseína quinase I (CKI) codifica por um certo número de quinases expressas em larga escala nas membranas, citoplasmas e núcleos (Vielhaber *et al.*, 2000).

Nos mamíferos, sete isoformas diferentes foram identificados (Lowrey *et al.*, 2000), entre as quais a CKI $\epsilon$  e a CKI $\Delta$  (Vielhaber *et al.*, 2000).

Em 1988, Ralph e Menaker (citados por Lowrey *et al.*, 2000) descobriram uma mutação do período circadiano de hamsters sírios, chamada *tau*. O ritmo em livre curso nos animais heterozigóticos *tau* é de 22 horas e de 20 horas nos animais mutantes homozigóticos. Essa redução do período circadiano deve-se à ausência de CKI $\epsilon$ , e advém da repressão do complexo CLOCK:BMAL1, que acontece mais cedo nesses animais relativamente a animais de tipo selvagem (Lowrey *et al.*, 2000).

A CKIε humana pode fosforilar a proteína PERIOD1 humana, provocando uma redução da sua estabilidade, uma vez que a proteína hPERIOD1 fosforilada tem uma semi-vida de cerca de 12 horas, enquanto a proteína hPERIOD1 não fosforilada permanece estável na célula mais de 24 horas (Keesler *et al.*, 2000).

A co-expressão de PERIOD1 e da CKIε leva à dissimulação do sinal de localização nuclear de PERIOD1, e assim à retenção dessas duas proteínas no citoplasma, dependente da fosforilação (Vielhaber *et al.*, 2000).

Se a CKIε mutante nos animais *tau* homozigóticos tem menor actividade, e que PERIOD é um dos principais substrato das células do *pacemaker* circadiano, então a actividade reduzida da CKIε mutante conduzirá a proteínas PERIOD hypo-fosforiladas. Uma vez que a expressão do gene *Period1* é alterada em mutantes *tau*, concluímos que a CKIε tem um papel significativo no atraso do sinal de feedback negativo do ciclo auto-regulador, sendo assim um componente crítico do relógio circadiano dos mamíferos (Lowrey *et al.*, 2000).

Dos nove genes identificados na função circadiana dos mamíferos, a CKIε é a única enzima (Lowrey *et al.*, 2000).

## 2.3.6 Os outros genes

### 2.3.6.1 *Dec1* e *Dec2*

Os genes *Dec1* e *Dec2* são expressos ritmicamente nos NSQ de rato, com picos ao início (no caso de *Dec1*) ou à meio do dia subjectivo (no caso de *Dec2*) (Honma *et al.*, 2002). A expressão de *Dec1* é estimulada pela luz, independentemente do tempo, com cinéticas de um gene da resposta imediata (Butler *et al.*, 2004). Os genes *Dec* são igualmente expressos ritmicamente em vários tecidos periféricos, como o fígado, o que realça a sua significância fisiológica (Honma *et al.*, 2002).

Nos NSQ, uma mutação ao gene *Clock* reduz significativamente a expressão de *Dec1* e de *Dec2*: *Dec1* torna-se arritmico, enquanto *Dec2* mantém uma fraca ritmicidade em ciclo 12 horas luz / 12 horas obscuridade, tornando-se arritmico em total obscuridade. Esta observação demonstra assim que *Dec1* e *Dec2* são regulados por *Clock in vivo* (Butler *et al.*, 2004).

DEC1 e DEC2 são factores de transcrição bHLH PAS, que parecem ser componentes do feedback negativo do relógio circadiano dos mamíferos. DEC1 e DEC2 podem inibir a transcrição do gene *Period1* induzida por CLOCK:BMAL1, através de interacções directas proteína–proteína com BMAL1 e/ou por competição por elementos de caixa E (Honma *et al.*, 2002). Essa análise sugere que esses factores de transcrição podem ajudar a regular o ritmo circadiano (Butler *et al.*, 2004): *Dec1* e *Dec2* são assim reguladores do relógio molecular dos mamíferos, constituindo assim a quinta família dos genes do relógio (Honma *et al.*, 2002).

### 2.3.6.2 *Rev-erb $\alpha$* e *Rev-erb $\beta$*

*Rev-erb $\alpha$*  e *Rev-erb $\beta$*  são receptores nucleares órfãos, ou seja, receptores nucleares para os quais não foi identificado qualquer ligante (Mangelsdorf *et al.*, 1995; citados por Preitner *et al.*, 2002), e que apresentam uma expressão oscilante (Delaunay e Laudet, 1998).

De facto, a expressão de *Rev-erb $\alpha$*  e *Rev-erb $\beta$*  oscila nos NSQ, no fígado, no coração (Akhtar *et al.*, 2002; Storch *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2002; citados por Sato *et al.*, 2004; Panda *et al.*, 2002; Preitner *et al.*, 2002), nos rins e na aorta (Sato *et al.*, 2004).

REV-ERB $\alpha$  é o principal regulador da expressão de *Bmal1* nos NSQ e no fígado. Esse receptor nuclear órfão participa ainda na regulação da transcrição de *Clock*, mas de forma mais reduzida. Como *Rev-erb $\alpha$*  parece ser regulado negativamente pelas proteínas PERIOD, constitui uma ligação molecular através da qual essas proteínas podem conduzir à transcrição circadiana de *Bmal1* e *Clock* (Preitner *et al.*, 2002).

Ratos deficientes em *Rev-erb $\alpha$*  (*Rev-erb $\alpha$*  *-/-*) demonstram uma redução dos ritmos circadianos na transcrição de *Clock* e *Bmal1*, mas essa redução não dá origem a um comportamento arritmico quando os ratos são colocados em ambiente constante. Essa observação indica que a transcrição de *Bmal1* e *Clock* não é fundamental às propriedades básicas do sistema circadiano. No entanto, em condições de obscuridade constante e em condições de luz-obscuridade, a duração média do período é significativamente mais curta nos animais mutante ao gene *Rev-erb $\alpha$* . Esse

gene não será assim necessário à geração de ritmos circadianos (Preitner *et al.*, 2002).

REV-ERB $\alpha$  funciona como um repressor transcricional, que contribui aos níveis mínimos de BMAL1. Ratos mutantes ao gene *Rev-erb $\alpha$*  exprimem níveis elevados de *Bmal1*, que, por sua vez, reduzem os ritmos de actividade locomotora (Sato *et al.*, 2004)

A implicação de *Rev-erb $\beta$*  no estabelecimento do ciclo, porém, ainda não foi demonstrada (Delaunay e Laudet, 1998).

### **2.3.6.3 Ror- $\alpha$**

ROR- $\alpha$  (*Retinoid-related Orphan Receptor alpha*) é um activador da transcrição de *Bmal1* nos NSQ. *Ror- $\alpha$*  é necessário à expressão normal de *Bmal1* e à consolidação da actividade locomotora diária, sendo regulado pelo relógio central dos NSQ. Esses resultados sugerem actividades opostas dos receptores nucleares órfãs *Ror- $\alpha$*  e *Rev-erb $\alpha$*  (uma vez que esse último reprime a expressão de *Bmal1*), que são importantes para a manutenção da função do relógio circadiano (Sato *et al.*, 2004).

### 2.3.6.4 Os input

#### 2.3.6.4.1 O Factor de Resposta ao Soro (SRF)

Em 1984, Greenberg e Ziff (citados por Chai e Tarnawski, 2002) descobriram que uma adição de soro a células em cultura pode rapidamente estimular a transcrição do gene *c-fos*. Em 1986, Treisman descobriu uma pequena sequência, situada no sítio de iniciação da transcrição na região promotora do gene *c-fos*, designada Elemento de Resposta ao Soro (*Serum Response Element*, SRE) (Chai e Tarnawski, 2002). Esse mesmo autor identificou igualmente a proteína que se liga a esse elemento para controlar a expressão de alguns genes, denominando essa proteína como Factor de Resposta ao Soro (*Serum Response Factor*, SRF).

Nos humanos, o gene SRF localiza-se no cromossoma 6. A proteína SRF contém 508 aminoácidos, e 3 principais domínios: um de ligação ao ADN de SRE, outro de transactivação e vários sítios de fosforilação. Esse factor de transcrição pode ser activado por vários agentes, entre os quais o soro (Chai e Tarnawski, 2002).

Os genes sob regulação de SRF são genes da resposta imediata, genes do músculo e genes neuronais. Tendo em conta que os genes referidos encontram-se associados ao crescimento e à diferenciação celular, SRF poderá participar na cicatrização de lesões dos tecidos e úlceras gastrointestinais (Chai e Tarnawski, 2002).

#### 2.3.6.4.2 O Factor de Crescimento Transformante $\alpha$ (TGF- $\alpha$ ) e o Receptor ao Factor de Crescimento Epidermal (EGF)

O Factor de Crescimento Transformante  $\alpha$  (*Transforming Growth Factor  $\alpha$* , TGF- $\alpha$ ) é uma molécula de sinal, que intervém na supressão da locomoção induzida pela luz (Kramer *et al.*, 2001).

Pévet (2002) relata a identificação do TGF- $\alpha$  como um sinal do relógio circadiano nos mamíferos por Kramer *et al.* (2001). Em 32 factores peptídicos sintetizados nos NSQ, testados como “factor locomotor”, apenas o TGF- $\alpha$  bloqueia a actividade locomotora de ratos na roda, sem hiper-sonolência nem inibição geral da actividade motora. No final da administração de TGF- $\alpha$ , o ritmo arranca com a fase e o período calculados, demonstrando assim que o funcionamento do relógio não foi afectado pelo TGF- $\alpha$  (Kramer *et al.*, 2001).

Kramer *et al.* (2001) evidenciaram ainda que a síntese da proteína TGF- $\alpha$  nos NSQ é rítmica, com um pico no início do dia, quando a actividade é reduzida, e uma diminuição no início da noite, quando começa a actividade do rato na roda. Esses resultados correspondem aos esperados para um factor “inibidor da locomoção”.

As acções de TGF- $\alpha$  são induzidas pelos receptores ao Factor de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor*, EGF) nos neurónios da zona sub-para-ventricular do hipotálamo. De facto, ratos com uma mutação ao receptor ao EGF exibem uma actividade locomotora excessiva, não conseguindo suprimir a mesma

quando são expostas à luz (Kramer *et al.*, 2001).

#### 2.3.6.4.3 As prokineticinas

Duas proteínas segregadas nos mamíferos foram identificadas: a prokineticina 1 (PK1) e a prokineticina 2 (PK2), que contraem fortemente o músculo liso gastrointestinal (Li *et al.*, 2001; citados por Cheng *et al.*, 2002).

O gene *PK2* é um gene controlado pelo relógio circadiano (Cheng *et al.*, 2002).

Os ARNm de *PK2* expressam-se ritmicamente nos NSQ de rato, atingindo altos níveis durante o dia, e a fase do ritmo de PK2 reage a um desencadeamento pela luz (Cheng *et al.*, 2002). No rato do Nilo (*Arvicanthis niloticus*), os ARNm de *PK2* expressam-se ritmicamente nos NSQ, atingindo um pico de manhã, anterior aos de *Period1* e de *Period2* (Lambert *et al.*, 2005).

A elevada expressão dos ARNm dos receptores à PK2 (PKR2) nos NSQ e o *feedback* positivo de PK2 sobre a sua própria transcrição, através da activação de PKR2 sugerem que PK2 pode funcionar localmente nos NSQ para sincronizar os *outputs* (Cheng *et al.*, 2002). A PK2, uma proteína segregada rica em cisteína, funciona assim como uma molécula de saída do relógio circadiano dos NSQ (Cheng *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2005).

### 2.3.6.5 Os output

#### 2.3.6.5.1 Os transportadores de glucose (GLUT)

Os transportadores de glucose (GLUT) pertencem às proteínas de transporte de glucose através das membranas plasmáticas (Wood e Trayhurn, 2003). São assim responsáveis pela entrada de glucose nas células, na periferia e no cérebro (Maher *et al.*, 1994; Vannucci *et al.*, 1997<sup>b</sup>; Shepherd e Kahn, 1999; citados por McEwen e Reagan, 2004), da qual é a principal fonte de energia.

GLUT2 é o gene que apresenta maior afinidade com o seu substrato (Bastard e Hainque, 1995). O gene de GLUT2 expressa-se no fígado (hepatócitos), o pâncreas endócrino (células beta), no intestino delgado (enterócitos) e no rim (tubo contornado proximal) (Bell *et al.*, 1993; citados por Bastard e Hainque, 1995). GLUT2 detecta os níveis de glucose plasmático, nomeadamente no pâncreas, onde o transporte de glucose induzido por GLUT2 serve de sinal à libertação de insulina pelas células beta pancreáticas (McEwen e Reagan, 2004). No intestino e no rim, GLUT2 participa à absorção e a reabsorção da glucose (Bastard e Hainque, 1995).

GLUT5 é um transportador da frutose de grande afinidade, e possui uma actividade de transportador mais reduzida para a glucose (Burant *et al.*, 1992; citados por McEwen e Reagan, 2004). O gene de GLUT5 expressa-se fortemente no intestino delgado (membrana apical dos enterócitos), os testículos, o esperma, e, em menor medida, no rim, o músculo estriado esquelético, o tecido adiposo e o cérebro (Shepherd *et al.*, 1992; citados por Bastard e Hainque, 1995).

No fígado, a expressão dos transportadores de glucose foi observada com uma fase máxima de expressão no início da noite, no período de alimentação dos roedores nocturnos (Panda *et al.*, 2002). O controlo circadiano dos compostos que utilizam açúcar (como GLUT2) pode constituir as bases moleculares fundamentais do controlo circadiano na ingestão de glucose e a resposta da insulina nos roedores (la Fleur *et al.*, 2001). Mesmo se as proteínas GLUT não entram no mecanismo do relógio, a sua expressão pode ser modulada por ele no tempo. Serão assim factores de saída do relógio.

#### 2.3.6.5.2 DBP, TEF e HLF

A expressão do gene *Dbp* (*albumin site D-Binding Protein*) oscila com uma elevada amplitude no fígado, rins, pâncreas, músculo cardíaco e pulmões (Wuarin e Schibler, 1990; Wuarin *et al.*, 1992; Lavery e Schibler, 1993; Fonjallaz *et al.*, 1996; citados por Lopez-Molina *et al.*, 1997), e uma amplitude mais moderada no cérebro (Lopez-Molina *et al.*, 1997).

O pico e a expressão mínima de ARNm de *Dbp* são atingidos cerca de 4 horas mais cedo nos NSQ relativamente ao fígado, o que sugere que a expressão circadiana de DBP é controlada por diferentes mecanismos nos NSQ e tecidos periféricos (Lopez-Molina *et al.*, 1997).

Ratos homozigóticos mutantes ao gene *Dbp* (*Dbp* *-/-*) exibem um período circadiano reduzido (23,26 horas nesses animais vs 23,76 horas em ratos de tipo selvagem), e

menos activos. A actividade locomotora alterada nesses animais e a forte expressão rítmica do gene *Dbp* nos neurónios de NSQ indicam que DBP encontra-se implicado no controlo do comportamento circadiano. No entanto, uma vez que os ratos mutantes ao gene *Dbp* permanecem rítmicos, e que a proteína DBP não é necessária à expressão circadiana do seu próprio gene, *Dbp* será assim mais um componente de saída do que um gene do relógio (Lopez-Molina *et al.*, 1997).

A proteína CLOCK é fundamental à transcrição circadiana de *Dbp*, tendo em conta que, em ratos mutantes ao gene *Clock*, a expressão circadiana de *Dbp* é aniquilada no fígado e travada nos NSQ. CLOCK regula assim a expressão de *Dbp*, através da sua ligação a caixas E (Ripperger *et al.*, 2000).

O factor de transcrição PAR leucine zipper DBP regula certos processos a jusante, tais como a consolidação do sono circadiano e a actividade electro-encefalográfica rítmica (Franken *et al.*, 2000), ou ainda a transcrição rítmica de enzimas chave nos hepatócitos, directamente implicados no metabolismo do colesterol, aminoácidos, xenobióticos e androgéneos (Lavery *et al.*, 1999).

Duas outras proteínas, TEF (*Thyroid Embryonic Factor*) e HLF (*Hepatocyte Leukemia Factor*), partilham uma grande similaridade de sequência com DBP na região *basic leucine zipper* e um segmento adjacente rico em prolinas e em aminoácidos ácidos (Drolet *et al.*, 1991; Hunger *et al.*, 1992; Inaba *et al.*, 1992; citados por Lopez-Molina *et al.*, 1997). Os ARN de *Tef* e de *Hlf* oscilem igualmente em vários tecidos (Falvey *et al.*, 1995; Fonjallaz *et al.*, 1996; citados por Lopez-Molina *et al.*, 1997). Contudo, DBP é o

factor de transcrição com maior abundância e maiores flutuações circadianas dessas três proteínas PAR (Lopez-Molina *et al.*, 1997).

## **2.4 As diferentes classes de relógios circadianos**

O sítio anatómico do estimulador circadiano apenas foi identificado em 1972 por dois grupos independentes, Moore e Eichler e Stephan e Zucker (citados por Moore-Ede, 1986<sup>a</sup>), que mostraram que lesões a nível dos NSQ, pequenas estruturas pares do hipotálamo anterior, situadas acima do quiasma óptico (Acúrcio e Rodrigues, 2009), provocam a interrupção dos ritmos circadianos em determinadas variáveis fisiológicas (Moore-Ede, 1986<sup>a</sup>), como os ritmos do sono, ou da temperatura interna no rato ou no macaco esquilo (Boulos *et al.*, 1980; Füller *et al.*, 1985).

Por outras palavras, a destruição dos NSQ de um roedor torna o animal comportamental e fisiologicamente arritmico.

O enxerto de NSQ permite contudo restabelecer um ritmo circadiano normal de actividade locomotora (Pévet, 2002). A ritmicidade restabelecida nos animais que apresentam as lesões possui as características do dador, e não do hospedeiro (Cermakian e Sassone-Corsi, 2000).

O estudo das propriedades dos NSQ tinha levado ao conceito de relógio único ou *masterclock* (Challamel *et al.*, 2001). No entanto, seria prematuro concluir que os NSQ são a única fonte de ritmicidade circadiana, uma vez que certas funções permanecem

rítmicas após a destruição desses núcleos (Füller *et al.*, 1985). Boulos *et al.* (1980) evidenciaram de facto uma persistência do comportamento antecipado de alimentação em ratos cujos NSQ sofreram lesões.

A partir de 1996, Tosini e Menaker (citados por Sun *et al.*, 1997) identificam relógios circadianos periféricos na retina dos mamíferos. Em 1997, investigadores do *National Science Foundation* dos Estados Unidos refutam a ideia segundo a qual o relógio biológico situa-se exclusivamente a nível do cérebro. Segundo eles, diferentes tecidos do corpo poderiam ter o seu próprio relógio.

A hipótese é assim colocada por Shearman *et al.* (1997) que descobriram uma ampla distribuição de certos genes do relógio no corpo, e não apenas nos NSQ e na retina. A suposição avançada por esses autores é confirmada por várias equipas, entre as quais a de Zylka *et al.* (1998<sup>a</sup>), que evidenciaram um atraso de 3 a 9 horas entre as oscilações de ARN de cada gene *mPeriod*, no fígado e músculo esquelético, e as dos NSQ. Esses investigadores concluíram que as oscilações periféricas são conduzidas ou sincronizadas pelos NSQ.

Existem igualmente osciladores periféricos em outros órgãos, como o coração (Young *et al.*, 2001), o fígado (Stokkan *et al.*, 2001; Storch *et al.*, 2002), os rins (Oishi *et al.*, 2000), a pars tuberalis hipofisária (von Gall *et al.*, 2002), o pâncreas (Mühlbauer *et al.*, 2004), o tecido adiposo (Ando *et al.*, 2005), os pulmões (Burioka *et al.*, 2005; Takata *et al.*, 2005), o intestino (Pardini *et al.*, 2005), a glândula adrenal (Oster *et al.*, 2006), o músculo esquelético (Miller *et al.*, 2007), a hipófise (Hughes *et al.*, 2007), ou ainda a

epífise (Fukuhara e Tosini., 2008). Existe também a possibilidade de osciladores circadianos funcionarem a nível celular, em células imortais tais como fibroblastos ou hepatomas (Balsalobre *et al.*, 1998; 2000; Yagita *et al.*, 2000; Hirota *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos recentemente através da cronobiologia molecular evidenciaram a existência de relógios celulares em tecidos periféricos (Challamel *et al.*, 2001; Antoch e Chernov, 2009). Assim todas as células somáticas dos mamíferos expressam a família dos genes ditos relógio que pilota as ritmicidades circadianas central e periféricas (Kaeffer e Pardini, 2005). Os NSQ não geram assim todos os ritmos circadianos, mas têm um papel fundamental na sua coordenação (Antoch e Chernov, 2009).

## **2.5 Os sincronizadores e a noção de desencadeamento**

Os relógios circadianos funcionam de forma autónoma, sem sinais de entrada externos ou de sinais temporais (Cermakian e Sassone-Corsi, 2000). O relógio sustenta assim ritmos periódicos em diversos processos fisiológicos e psicológicos, tais como a temperatura corporal central, o consumo alimentar, a performance cognitiva e o humor (Piggins, 2002).

Porém, os ritmos biológicos podem igualmente ser desencadeados pelas condições ambientais, por factores exógenos designados sincronizadores (Bogdan e Touitou, 2001; Acúrcio e Rodrigues, 2009). Um sincronizador é um factor ou agente que varia de modo cíclico, capaz de impor o seu período aos ritmos biológicos de um organismo

sensível. O termo pode ser substituído por outras palavras, tais como *zeitgeber*, indicador de tempo ou agente desencadeante. O papel dos sincronizadores é de transmitir informação ao relógio biológico para ajustar o meio interno ao meio ambiente (Acúrcio e Rodrigues, 2009).

Os intervalos de resposta do relógio são influenciados pela força do *zeitgeber* (Moore-Ede, 1986<sup>b</sup>), ou seja, pela amplitude do sincronizador. O período desse último corresponde à duração que o mesmo é susceptível de induzir por desencadeamento sobre o relógio circadiano do tecido alvo.

Na maioria dos organismos, entre os quais os mamíferos, pensa-se que o fotoperiodismo é o principal sinal ambiental envolvido no desencadeamento circadiano (Antoch e Chernov, 2009). De facto, os relógios circadianos podem ser reiniciados pela luz, e esse desfasamento provocado pela luz é acompanhado por uma indução de certos genes da resposta imediata nos NSQ (Balsalobre *et al.*, 1998).

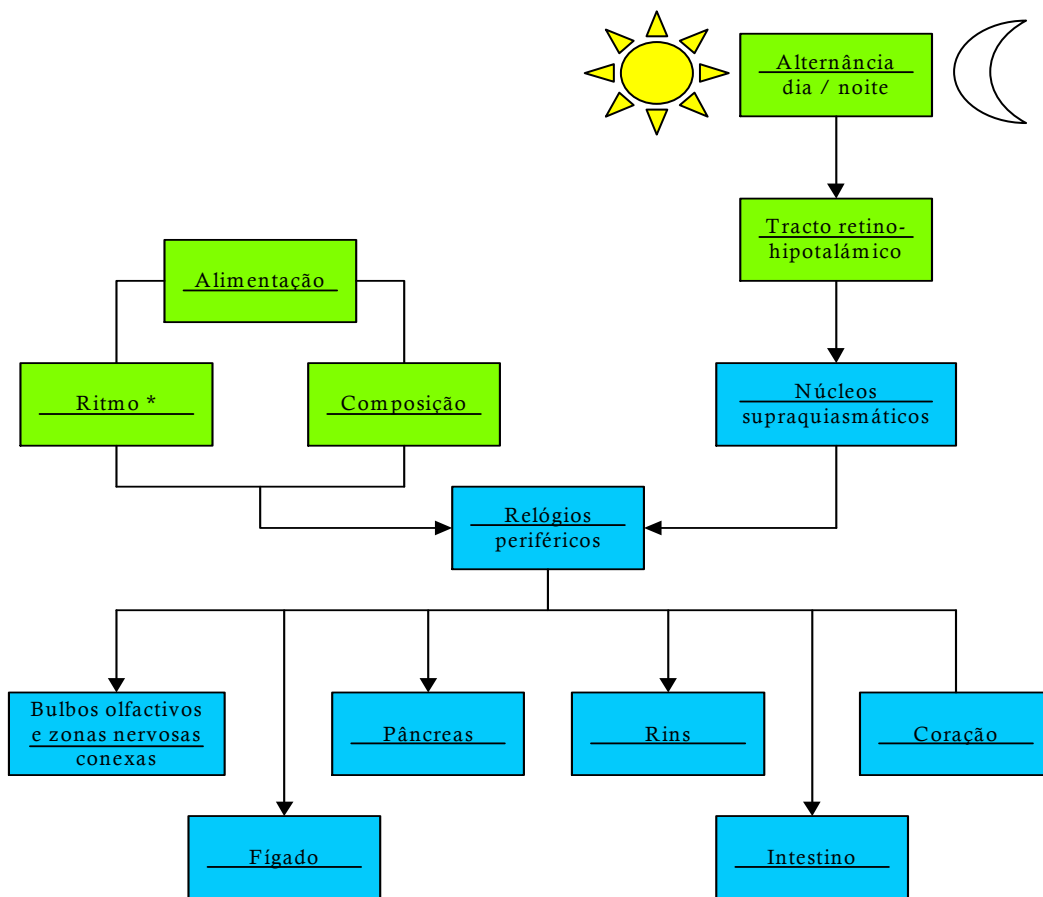
A alternância luz–obscuridade ao longo do ciclo dia–noite é assim o mais potente dos sincronizadores (factor fótico), mas outros factores, nomeadamente sociais, comportamentais ou nutricionais (factores não fóticos) também desempenham um papel importante (Pévet, 2002). Entradas cíclicas, como a temperatura, o ruído, os sinais sociais ou o acesso rítmico à alimentação podem igualmente actuar como agentes desencadeantes, mas o efeito dos mesmos sobre o comportamento é, muitas vezes, fraco (Stokkan *et al.*, 2001).

A informação luz-obscuridade atinge os neurónios dos NSQ através do tracto retino-hipotalâmico (TRH) (Reppert e Weaver, 2001). Esse tracto monosináptico tem como origem principal um determinado número de células ganglionares da retina que expressam o foto-pigmento melanopsina (Gooley *et al.*, 2003; citados por Richter *et al.*, 2004). Contudo, os bastonetes e cones (células receptoras da retina) (Freedman *et al.*, 1999) e os *Cryptochrome* (Okamura *et al.*, 1999) não são necessários à percepção da luz circadiana, que é detectada pela melanopsina (Hankins *et al.*, 2008).

A luz restabelece o tempo do *pacemaker* central nos NSQ através de mecanismos oculares, e o relógio dos NSQ sincroniza então os osciladores periféricos dependentes, através de conexões neuronais e/ou sinais químicos (Yamazaki *et al.*, 2000).

Contudo, foi sugerido que, em vez da luz, a alimentação daria um sinal temporal a certos relógios periféricos (Richter *et al.*, 2004; Acúrcio e Rodrigues, 2009), o alimento constituindo assim o *zeitgeber* dominante desses relógios (Figura 8) (Damiola *et al.*, 2000).

Os osciladores periféricos, como o fígado, serão assim mais afectados pelo momento em que ocorre a ingestão alimentar, do que pelos NSQ, cujo relógio molecular nem será afectado por esse agente desencadeante (Damiola *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001).



\* Sincronizador com 3 rupturas temporais ?  
 - Pequeno almoço  
 - Almoço  
 - Jantar

**Figura : Esquema de organização do sistema circadiano dos mamíferos.**

O sinal de restabelecimento, pela alimentação *in vivo*, do oscilador que pode ser desencadeado pela alimentação, ainda não foi identificado, mas é possível que um determinado número de factores veiculados no sangue possam agir como *zeitgebers* endógenos integrados a esse oscilador (Richter *et al.*, 2004).

Os glucocorticóides, um sinal conduzido pelos NSQ, modificam a fase de expressão

dos genes relógio no fígado, pâncreas, pulmão e coração de animais sujeitos a uma alimentação restrita (Balsalobre *et al.*, 2000), e em fibroblastos de rato (Balsalobre *et al.*, 2000; Le Minh *et al.*, 2001). De facto, foi demonstrado que a glucose, e, a nível geral, o estado de óxido-redução das células, regula a expressão dos genes relógio (Rutter *et al.*, 2001; Pardini e Kaeffer, 2006).

A possibilidade da melatonina desempenhar um papel de tradutor neuro-endócrino entre os NSQ e certos osciladores periféricos encontra-se, quanto a ela, em investigação (Richter *et al.*, 2004).

## **2.6 Perspectivas do estudo para a produção animal**

A maioria dos estudos sobre o relógio biológico e os seus constituintes foi realizada em ratos, sendo que poucos trataram esse tema no Homem ou animais de interesse zootécnico.

Por serem animais nocturnos, os ratos poderão não ser considerados como o modelo mais adequado para o estudo do relógio biológico do Homem ou de animais diurnos.

Tendo em conta que células sãs dificilmente podem ser cultivadas, e que, conforme os estudos de You *et al.* (2005) e Wood *et al.* (2006), as células cancerosas apresentam relógios circadianos regulados pelos mesmos genes que células de qualquer tecido são, realizamos o estudo sobre linhagens celulares de carcinoma cólico humano (células Caco-2), como primeira abordagem para o estudo da maturação do tracto

gastrointestinal e aquisição de relógio biológico funcional pelos recém-nascidos.

No que diz respeito à produção animal, a literatura tem evidenciado benefícios na utilização de ácido butírico (e outros ácidos gordos de cadeia curta/média) na saúde do tracto gastrointestinal, ao reforçar a função de barreira contra organismos patogénicos (Lankaputhra e Shah, 1998; Van Immerseel *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 2007; Hedemann e Knudsen, 2007; Lallès *et al.*, 2007; Paul *et al.*, 2007; Boyen *et al.*, 2008; Defoirdt *et al.*, 2009). Desse modo, considera-se que o aprofundamento desse tema, no âmbito da produção animal, poderá ser um desafio na investigação de alternativas à utilização massiva de antibióticos, largamente contestada nos últimos anos.

# **Material e Métodos**

### 3. Material e Métodos

O estudo foi realizado em células provenientes de um adenocarcinoma colorectal de um homem de 72 anos, recolhido em 1974, denominadas células Caco-2.

Essas células são células cancerosas de tipo epitelial aderentes (células de tipo enterócito fetal), de cariótipo instável ( $133 \pm 50$  cromossomas em média). A cultura das mesmas é efectuada em caixas de 25cm<sup>2</sup>, contendo um meio a base de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro de Vitelo Fetal (FCS).

O estado de proliferação / diferenciação dessas células é definido empiricamente em plástico simples, por tapetes de 3, 5-6, 10 e 23 dias. A sua polarização em enterócitos é obtida em cultura sobre *inserts* (câmaras de cultivo bicompartimentadas), para efectuar medidas de resistência trans-epiteliais.

No presente trabalho, estas células foram utilizadas em condições de confluência de células de 5 a 7 dias, de modo a permitir uma comparação com linhagens fibroblásticas, a níveis das quais foi comprovado, pela equipa de Balsalobre *et al.* (1998), o funcionamento de osciladores circadianos.

### 3.1 Expressão dos ARN mensageiros que codificam por proteínas do relógio, pelos colonócitos de quatro pacientes saudáveis e por células Caco-2

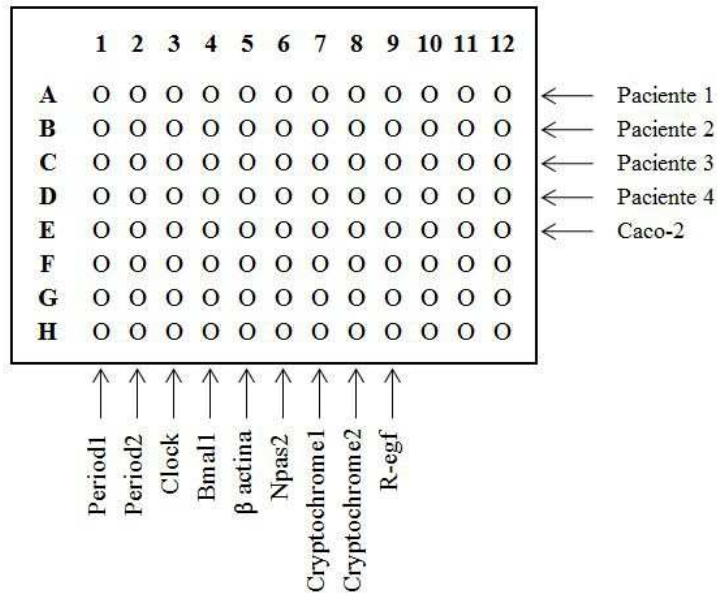
Essa etapa consiste na pesquisa, através de uma RT-PCR, da presença de ARNm de diferentes genes, em colonócitos de quatro pacientes saudáveis e células Caco-2:

- SRF (factor de entrada ou *input*);
- *Clock*, *Npas2*; *Bmal1*, *Period1*, *Period2*, *Cryptochrome1* *Rev-erba*, *Ror-α* entre outros (genes do relógio);
- *Tef-1-Δ*, *Dbp*, *SG1*, *Glut1*, *Glut5* e *MCT1* (factores de saída ou *outputs*);
- *β-actina* (gene de referência).

A experiência referida tem como objectivo determinar se as células Caco-2 expressam os genes do relógio de igual modo que indivíduos saudáveis, e assim confirmar que as mesmas representam um modelo aceitável para explorar a regulação da ritmicidade circadiana no Homem.

Salienta-se que os ARNm dos genes *SRF*, *Ror-α*, *Tef-1-Δ*, *Dbp* e *MCT1* apenas foram pesquisados nas células Caco-2, e que os ARNm de *Rev-erba* nas células Caco-2 e nos colonócitos de dois pacientes saudáveis.

Numa microplaca, depositam-se 4,5µl de amostra (de cada paciente ou de Caco-2) em cada linha, e 10µl de *master mix* de cada gene a testar por coluna (Figura 9).



**Figura :** Disposição das amostras e do *master mix* de cada gene a testar, em placa de PCR

O *master mix* referido é composto por 7µl de SYBR® Green I; 1,5µl de *primer Forward* do gene a testar; e 1,5µl de *primer Reverse* desse mesmo gene.

A microplaca é selada com adesivo próprio, agitada e colocada no sistema de detecção iCycler iQ Real-Time PCR da BIO-RAD® (Figura 10), que gera as etapas de amplificação de genes.



**Figura :** iCycler iQ Real-Time PCR da BIO-RAD®  
**Fonte:** BIO-RAD® Laboratories (s/d)

### **3.2 Choque sérico e formulação dos meios de cultura aplicados a células Caco-2**

Um choque sérico consiste em tratar células com elevadas concentrações de soro, de modo a re-induzir a expressão circadiana das mesmas (Balsalobre *et al.*, 1998).

No presente caso, tratam-se células Caco-2 (previamente inoculadas em lamelas, colocadas em oito placas, com um meio composto, em iguais proporções, por FCS e DMEM.

Uma das placas é directamente fixada com formaldeído a 4%, designando-se a mesma de placa 0h, que servirá de padrão. Nas restantes sete placas, é depositada a solução acima referida, que se pretende sincronizadora das células Caco-2. As placas são depois incubadas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 30 minutos, uma das placas é retirada para ser fixada pelo formaldeído (placa 30min). O mesmo acontece após 60 minutos, com uma nova placa (placa 60min). Após duas horas (prazo que corresponde ao tempo de incubação estimado para obter uma efectiva sincronização das células pelo meio), uma das placas é fixada (placa 2h).

Findo esse prazo, o meio contido nas restantes quatro placas é removido, e substituído por um dos meios com a seguinte composição:

- DMEM 10% FCS;

- sem glucose nem ácido butírico;
- 25mM de D-Glucose;
- 1mM de ácido butírico.

Essas placas são novamente incubadas, nas mesmas condições, durante 16 horas, antes de se proceder à fixação das mesmas (placas 18h).

Todas as placas são fixadas durante a noite por uma solução tampão PBS 0 (*Phosphate-Buffered Saline*) com 4% de formaldeído, que será depois substituída por etanol a 70%, para permeabilizar a membrana das células, e assim permitir o armazenamento das placas em câmara fria a 4°C.

A esquematização do procedimento referido é apresentada no anexo 1.

### ***3.3 Imuno-deteção por epifluorescência das proteínas SRF e PERIOD1***

Para revelar a presença de proteínas SRF e PERIOD1 nas células Caco-2, utiliza-se o princípio da imuno-deteção por epifluorescência, baseado em duas reacções antígeno-anticorpo (uma primária e uma secundária), reveladas por um conjugado fluorescente.

O procedimento descrito apenas pode ser realizado mediante re-hidratação das placas

(armazenadas alguns dias antes em câmara fria) durante 24 horas, com PBS 0.

Após esse período, as lamelas são removidas com uma agulha e uma pinça, e são depositadas numa nova placa P24, com as devidas identificações. As mesmas são saturadas com uma solução de PBS 0 e BSA (albumina de soro bovino) Fração V a 0,2% durante 15 minutos, para prevenir uma eventual fixação dos anticorpos de maneira não específica.

O conteúdo dos poços é removido e é colocado, em cada um (excepto no padrão), 300µl de solução de anticorpo primário, específico da proteína em estudo (anti-SRF de coelho, para detectar a presença de proteínas SRF, ou anti-PERIOD1 de cabra, para detectar a presença de proteínas PERIOD1). A placa é incubada a 37°C durante duas horas, de modo a permitir a fixação dos anticorpos primários às proteínas presentes nas células, tanto a nível nuclear, como a nível citoplásmico.

O conteúdo dos poços é removido, e enxaguado três vezes com PBS 0, antes de ser adicionado 300µl de solução contendo *Hoechst*® 33258 e anticorpos secundários, aos quais se encontra fixado um fluorocromo (fluoresceína no anti-coelho FITC ou rodamina no anti-cabra TRITC). A placa é novamente incubada durante duas horas a 37°C, para possibilitar a fixação dos anticorpos secundários aos anticorpos primários. O conteúdo dos poços é removido, e enxaguado quatro vezes com PBS 0.

Para visualizar os resultados ao microscópio, coloca-se uma gota de glicerol por

lâmina (correctamente identificadas), sobre a qual se deposita uma lamela (do lado das células).

Cada lâmina pode assim ser observada ao microscópio a epifluorescência, com a objectiva 100x, e com uma micro-gota de óleo: a rodamina é excitada pela luz verde e restitui uma luz vermelha, enquanto a fluoresceína é activada pela luz azul e emite uma luz verde.

A esquematização do procedimento referido é apresentada no anexo 2.

As observações efectuadas através da câmara numérica DMX1200 da *Nikon*®, ligada ao computador, são salvaguardadas com um programa informático denominado *LUCIA*®, sob a forma de imagens no formato tif:

- uma imagem, que representa o ADN marcado pelo *Hoechst*® (azul);
- uma imagem que representa as proteínas SRF ou PERIOD1 marcadas respectivamente pela fluoresceína (verde) e pela rodamina (vermelho), tirada no mesmo campo.

Essas fotos serão utilizadas ulteriormente na semi-quantificação dos sinais emitidos pelas células Caco-2.

### **3.4 Semi-quantificação dos sinais emitidos pelas células Caco-2**

#### **3.4.1 Semi-quantificação de SRF no tapete celular Caco-2**

Cada imagem obtida na etapa de imuno-deteção por epifluorescência é codificada no computador em vermelho, verde e azul (RGB).

Através do programa *The Gimp*®, extrai-se o canal azul da imagem que representa os núcleos de ADN, e o canal verde da imagem correspondente às das proteínas SRF marcadas pela fluoresceína.

As imagens são convertidas ao formato raw data pelo programa *Image J*®, antes dos seus canais serem sobrepostos pelo software *Quant3D*®. Cada canal é depois quantificado por esse programa.

#### **3.4.2 Semi-quantificação dos sinais (ADN e PERIOD1) emitidos pelos núcleos das células Caco-2**

Cada imagem obtida na etapa de imuno-deteção por epifluorescência é codificada no computador em vermelho, verde e azul (RGB).

Através do programa *The Gimp*®, extrai-se o canal azul da imagem que representa os núcleos de ADN, e o canal vermelho da imagem correspondente às das proteínas SRF marcadas pela rodamina.

De seguida, cria-se um ficheiro com 3 canais no programa *Image J*®:

- no primeiro canal (canal vermelho), cola-se a imagem decomposta em vermelho, das proteínas PERIOD1 marcadas pela rodamina;
- no segundo canal (canal verde), cola-se a imagem dissociada em verde, do ADN marcado pelo *Hoechst*®;
- o terceiro canal fica apagado.

Executa-se a função “*stacks to RGB*” para obter uma imagem onde os sinais emitidos pelo *Hoechst*® e pela rodamina se sobrepõem a nível dos núcleos, emitindo um sinal amarelo.

Seleccionam-se os núcleos amarelos, dispondo os mesmos numa imagem de fundo preto, no programa *The Gimp*®.

A imagem é decomposta em vermelho e em verde nesse mesmo programa, permitindo depois que os níveis de cinzento no verde, e depois no vermelho, sejam quantificados pelo programa *Image J*®.

A esquematização do procedimento referido é apresentada no anexo 3.

### **3.5 Dosagens do ácido butírico**

O objectivo da experiência consiste em determinar a evolução, ao longo do tempo, da

concentração em ácido butírico, depositado em tapetes celulares Caco-2 de 5 e 12 dias, e tapetes celulares HT29 clone 16E de 1 dia.

Para verificar uma eventual volatilização do composto, procede-se a uma experiência paralela, baseada na colocação de um meio com 1mM de ácido butírico em poços P24 e P6 de placas vazias.

O ácido butírico é separado e quantificado através de cromatografia em fase gasosa (CFG), realizada por um aparelho denominado *HP® – 6890 Series Plus* (Figura 11).



**Figura :** Cromatógrafo em fase gasosa *HP® – 6890 Series Plus*

**Fonte:** Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas da Universidade Federal de Santa Maria (s/d)

A análise demora cerca de 8,5 minutos por cada amostra.

A CFG é um método de separação dos constituintes de uma mistura, que utiliza uma fase fixa (ou estacionária) e uma fase móvel (um gás designado “vector”),

que migram ao longo da fase fixa.

A mistura a analisar é injectada ou depositada numa parte da fase fixa, onde os seus constituintes, arrastados pelo gás vector, migram, a velocidades diferentes, no estado de vapor, “separando-se” (Lemarchal, 1995). O gás vector chega sob pressão controlada na coluna, ao nível do injectador (a 250°C). No presente caso, o gás utilizado é o azoto, que é debitado a cerca de 17ml/min.

Tendo em conta que a CFG deve ocorrer em meio ácido, a mistura a analisar é diluída à metade com ácido oxálico a 0,5M, sendo depois injectada no injectador com a ajuda de uma micro-seringa. A mesma é volatilizada e arrastada na coluna pelo gás vector. A coluna utilizada é uma coluna capilar *SGE BP 21®*, com um comprimento de 25m, diâmetro interno de 0,53mm e espessura de filme – polietileno glicol – de 0,5µm.

A coluna é inserida num forno a 90°C, onde o gás vector varre a coluna continuamente.

Os constituintes da mistura, que saem separados da coluna, atravessam o detector a ionização de chama (a 200°C), que emite um sinal eléctrico, cada vez que é atravessado por um dos constituintes.

Esse sinal é amplificado e registado pelo aparelho, que proporciona um registo designado cromatograma.

A interpretação desse registo fornece uma análise qualitativa e quantitativa da mistura em estudo (Lemarchal, 1995).

Os resultados do presente ensaio são obtidos a partir de uma gama (concentração em  $C_4$  de 0,2mM/l, 0,4mM/l, 0,6mM/l e 0,8mM/l), o que nos permite realizar uma análise de variância (ANOVA) a partir dos mesmos.

# **Resultados e Discussão**

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Expressão dos ARN mensageiros que codificam para proteínas do relógio, por colonócitos de quatro indivíduos saudáveis e por células de carcinoma cólico em cultura

Os resultados relativos à expressão dos ARNm de cada gene do relógio obtidos na PCR são expressos com base na diferença entre o Ct do gene e o Ct da  $\beta$ -actina (Figura 12).

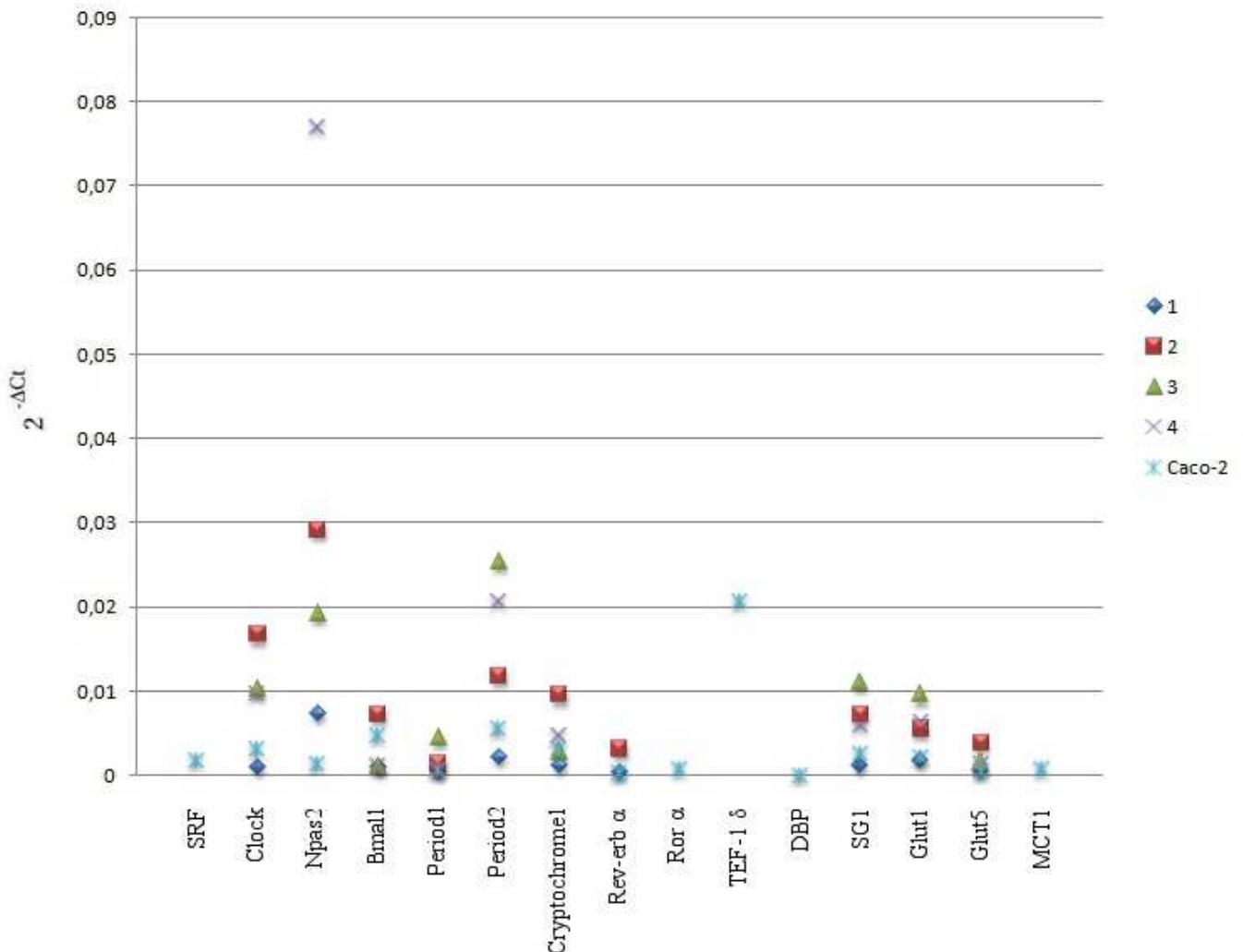


Figura : Evolução das proporções dos genes do relógio em colonócitos de quatro indivíduos saudáveis e em células Caco-2

Comprova-se a expressão dos ARNm de todos os genes testados (15), tanto pelos indivíduos saudáveis, como pelas células Caco-2. Os níveis de expressão desses genes diferem, contudo, entre pacientes, e entre pacientes e Caco-2.

Destaca-se assim uma grande heterogeneidade na expressão dos ARNm nos colonócitos dos pacientes e nas células Caco-2, nomeadamente os referentes aos genes *Clock*, *Npas2* e *Period2*.

Como tal, e uma vez que os ARN dos genes pesquisados foram todos expressos pelas células Caco-2, podemos admitir que as mesmas representam um modelo celular satisfatório para a realização do presente estudo, que consiste em explorar de maneira qualitativa a regulação da ritmicidade circadiana.

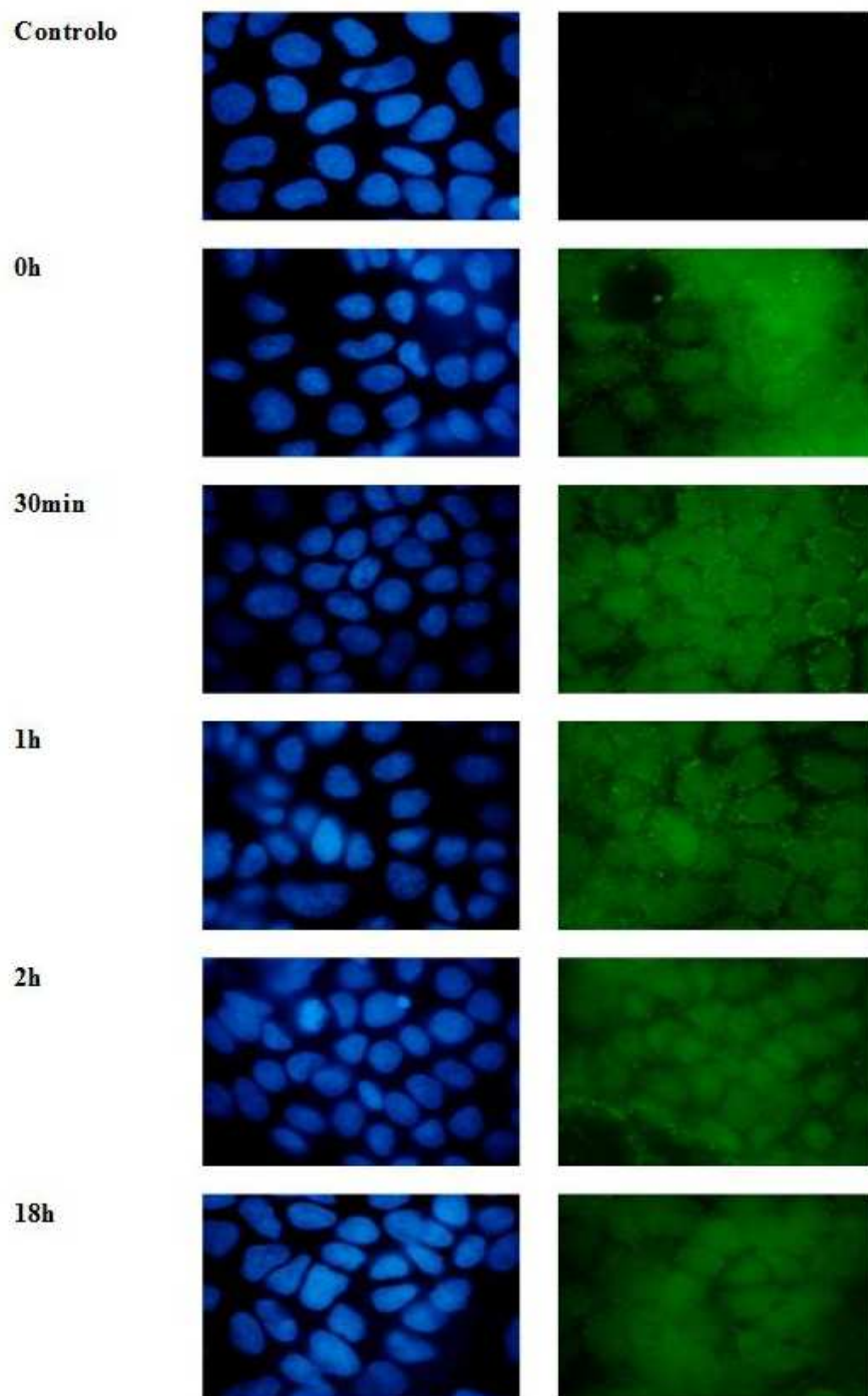
Por outro lado, evidencia-se ainda a expressão dos ARNm dos transportadores de glucose (*SG1*, *Glut1* e *Glut5*) e de *MCT1* (transportador do ácido láctico e ácido butírico), facto interessante, na medida em que a literatura indica que as células Caco-2 consumiriam essencialmente glucose.

## **4.2 Seguimento da expressão de PERIOD1 e SRF ao longo do tempo**

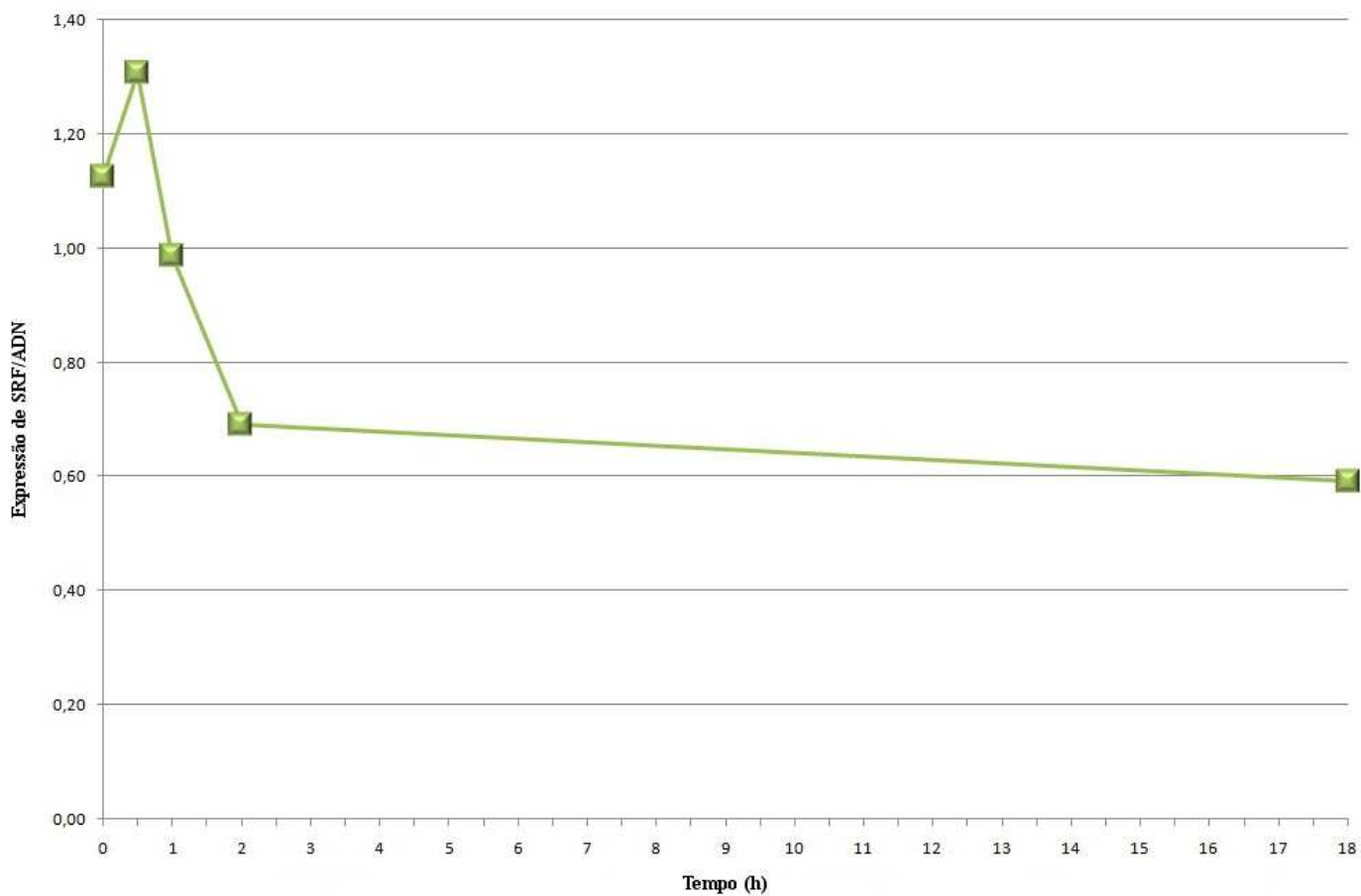
### **4.2.1 Seguimento da expressão de SRF sobre 18h**

Procedemos ao seguimento em cinética da expressão da proteína SRF ao longo do

tempo, através de imuno-deteccão por epifluorescência sobre 18h (experiência realizada em duplicado) (Figura 13), e à quantificação da intensidade dos sinais emitidos pela fluoresceína (Figura 14).



**Figura : Imuno-deteccão de SRF em células Caco-2, sobre 18h**



**Figura : Semi-quantificação de SRF em células Caco-2, sobre 18h**

Os “barulhos de fundo” obtidos na imuno-deteccção são aceitáveis e indicam que a fluorescência observada nas tiragens deve-se de facto a uma marcação, pela fluoresceína, do anticorpo secundário fixado na proteína SRF. As diferenças de fluorescência observadas devem-se então a uma diferença de expressão da proteína ao longo do tempo.

O pico de expressão de SRF detectado aos 30 minutos indica-nos uma mobilização desse factor a partir desse instante. Presencia-se a seguir uma diminuição na deteccção de SRF, revelando o esgotamento do factor pelo soro.

Essas observações confirmam que SRF é efectivamente um *input* do relógio, tendo em conta que é rapidamente mobilizado, face ao stress que representa o choque sérico.

## **4.2.2 Seguimento da expressão de *PERIOD1* ao longo do tempo**

### **4.2.2.1 Experiência realizada sobre 18h**

Procedemos ao seguimento em cinética da expressão das proteínas *PERIOD1*, através de imuno-deteccção por epifluorescência sobre 18h (experiência realizada em duplicado) (Figura 15).

Os “barulhos de fundo” obtidos na imuno-deteccção são aceitáveis e indicam que a fluorescência observada nas tiragens deve-se de facto a uma marcação, pela rodamina, do anticorpo secundário fixado na proteína *PERIOD1*. As diferenças de fluorescência observadas devem-se então a uma diferença de expressão da proteína ao longo do tempo.

Detectamos uma depressão no nível de expressão das proteínas *PERIOD1* às 2h, seguida da sua retoma às 18h. *Period1* é um gene de resposta imediata, pelo que responde rapidamente ao choque sérico, activando a sua transcrição, e conseqüente tradução em proteínas. O declínio do nível de expressão das suas proteínas às 2h é assim normal, uma vez que atingiram um pico anteriormente. De facto, Balsalobre *et al.* (1998) descobriram uma expressão máxima de *Period1* em fibroblastos de rato aos 60min.

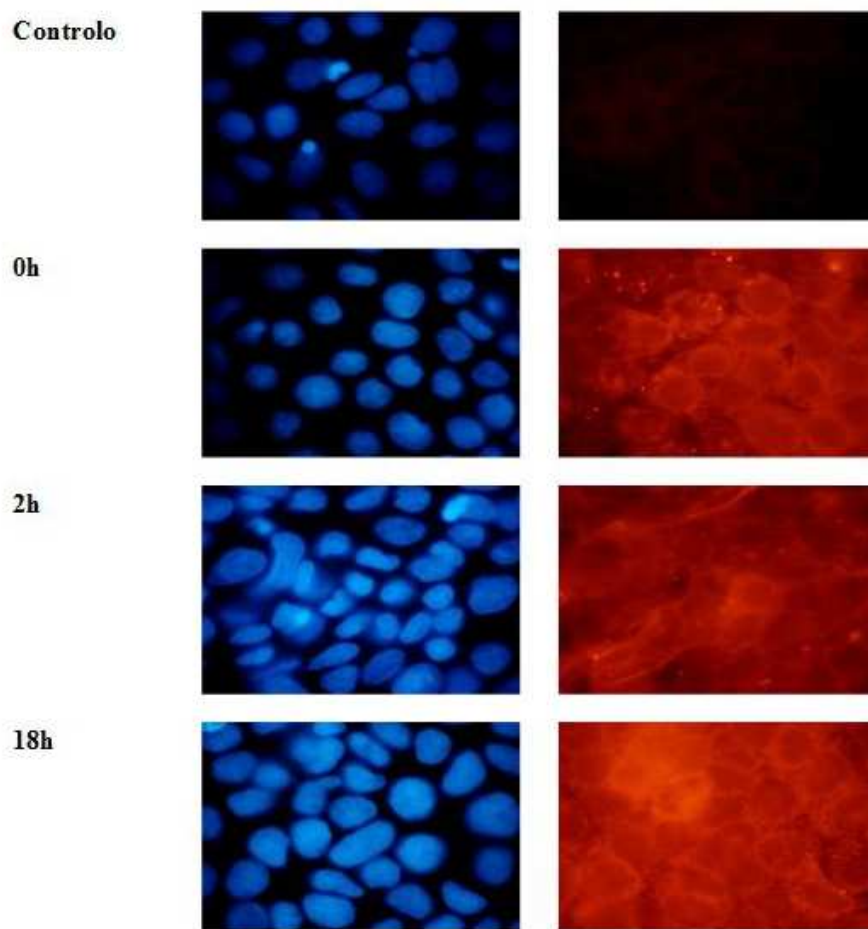


Figura : Imuno-deteccão de PERIOD1 em células Caco-2 sobre 18h

#### 4.2.2.2 Experiência realizada sobre 48h

Procedemos ao seguimento em cinética da expressão das proteínas PERIOD1, igualmente através de imuno-deteccção por epifluorescência sobre 48h (experiência realizada com 5 lamelas) (Figura 16), para determinar:

- o que acontece entre 2 e 18h;
- se existe uma oscilação das proteínas PERIOD1 após as 18h.

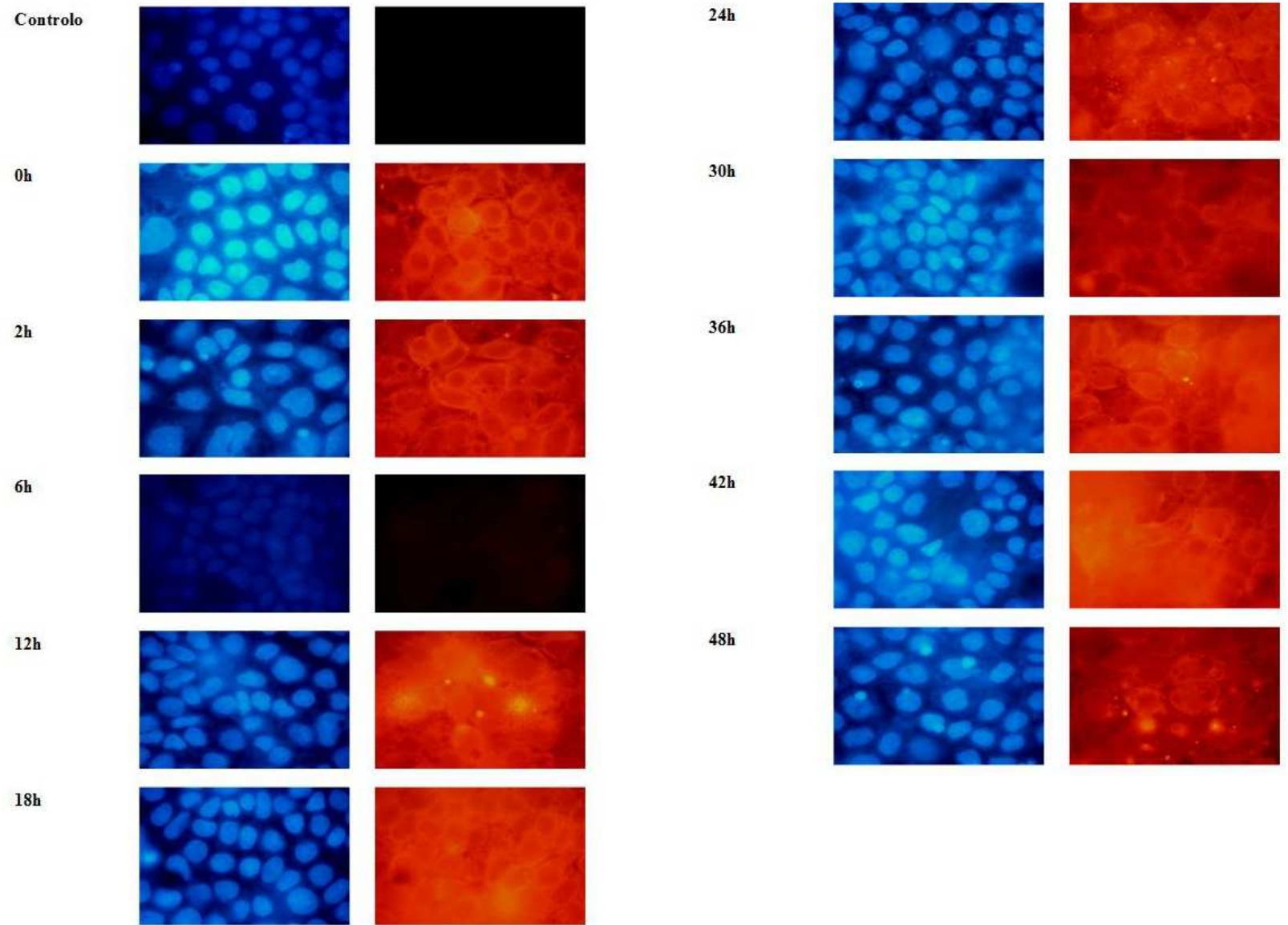


Figura : Imuno-deteccção de PERIOD1 em células Caco-2 sobre 48h

Os “barulhos de fundo” obtidos nessa imuno-deteccção são igualmente aceitáveis. A fluorescência observada nas tiragens deve-se de facto a uma marcação, pela rodamina, do anticorpo secundário fixado na proteína PERIOD1. As diferenças de fluorescência observadas devem-se então a uma diferença de expressão da proteína ao longo do tempo.

Evidenciamos que a expressão de PERIOD1 oscila ao longo das 48h. Assim, as mesmas:

- são expressas às 0h;
- são fortemente reprimidas às 2h e às 6h (a depressão no nível de expressão das proteínas às 6h poderá contudo resultar de um erro experimental, tendo em conta a reduzida qualidade das fotografias das lamelas nesse momento);
- são novamente induzidas às 12h, e até às 24h;
- o seu nível de expressão desmorona-se às 30h;
- são de novo fortemente exprimidas às 36h e 42h;
- são pouco exprimidas às 48h.

Esse estudo confirma os resultados obtidos sobre 18h, nomeadamente o declínio no nível de expressão da proteína PERIOD1 às 2h, e a sua forte expressão às 18h.

Por outro lado, a imuno-deteccção em análise permite-nos deduzir que a prossecução da expressão de PERIOD1 acontece a partir das 12h, e não às 18h, corroborando um dos resultados do estudo de Balsalobre *et al.* (1998).

A forte expressão de proteínas PERIOD1 às 36h e 42h comprova tratarem-se de produtos de genes de relativa importância no funcionamento do relógio.

Para determinar a efectiva sincronização das células e o modo como as mesmas expressam as proteínas PERIOD1, procedemos à quantificação dos sinais emitidos pelos seus núcleos (Anexo 4).

No que diz respeito à sincronização das células, podemos afirmar que o choque sérico é efectivamente um choque sincronizador, uma vez que as células, sem qualquer sincronia às 0h, encontram-se em fase a partir das 2h, e até às 30h, onde se observa uma nova dessincronização das mesmas. Contudo, não dispomos de núcleos suficientes para realizar um teste estatístico.

Os gráficos apresentados anteriormente confirmam, por outro lado, as oscilações observadas nas fotografias.

De facto, os sinais vermelhos emitidos às 2h, e sobretudo às 6h, são, em comparação com os sinais verde, relativamente reduzidos. Essa análise indica que as proteínas PERIOD1 são, assim, bastante pouco expressas nos momentos referidos. Pelo contrário, a partir das 12h, e até às 24h, quantificam-se elevados níveis de vermelho, o que também acontece às 36h e 42h. Observa-se contudo uma redução dos níveis de vermelho às 30h, e assim uma diminuição da expressão de proteínas PERIOD1.

### 4.3 Efeitos da formulação do meio de cultura sobre as taxas de expressão de PERIOD1

#### 4.3.1 Revelação da expressão de PERIOD1 com diferentes meios de cultura.

Seguimos, por imuno-deteccção por epifluorescência, a expressão de proteínas PERIOD1 às 18h sobre tapetes de células Caco-2 que receberam diferentes meios de cultura 2h após o choque sérico (Figura 17):

- um meio composto por DMEM e 10% de soro de vitelo fetal;
- um meio composto por 25 mM de D-glucose;
- um meio composto por 1mM de ácido butírico;
- um meio sem glucose nem ácido butírico.

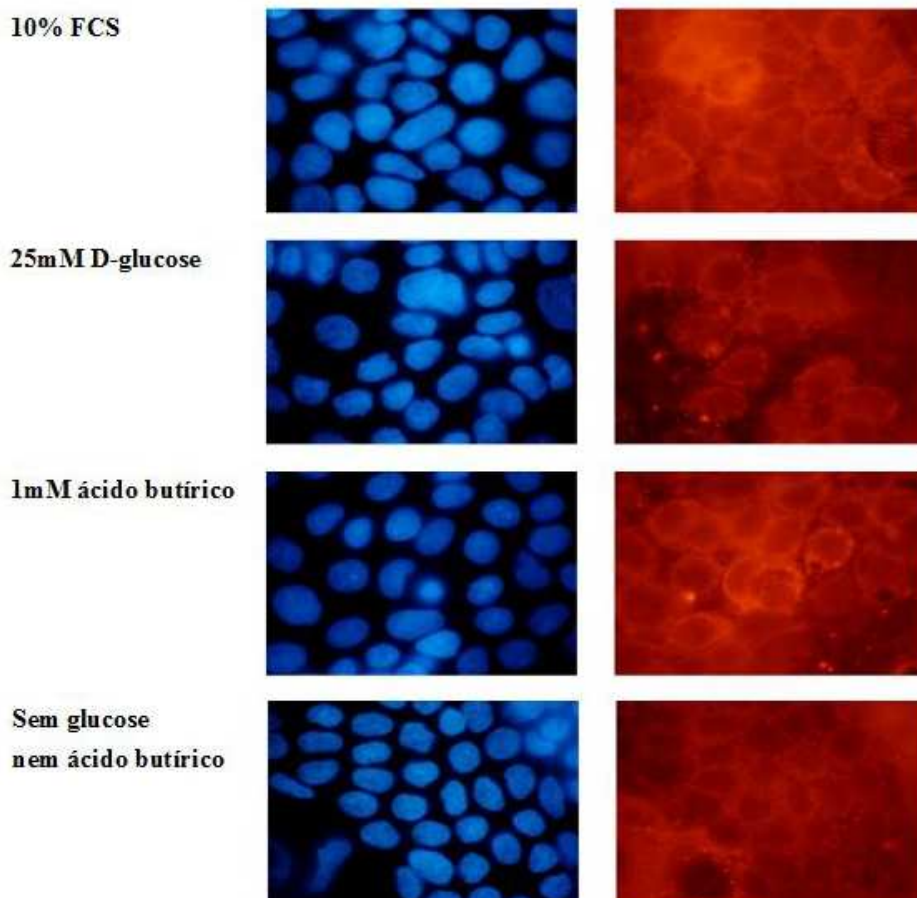


Figura : Imuno-deteccção de PERIOD1 sobre células Caco-2 às 18h, de acordo com o meio de cultura depositado 2h após a realização do choque sérico.

A observação das fotografias revela que as diferentes formulações de meio têm efeito sobre a expressão de PERIOD1.

As proteínas PERIOD1 são efectivamente relativamente exprimidas pelas células cultivadas nos meios contendo 10% de FCS ou ácido butírico.

O nível de expressão das proteínas é porém mais reduzido para as células que receberam a fórmula com 25mM de D-glucose ou a fórmula sem glucose nem ácido butírico.

Realizamos igualmente uma semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos das células Caco-2 para determinar se a formulação do meio de cultura tem algum impacto na sincronização das células e sobre a expressão das proteínas PERIOD1 (Anexo 5).

Verificamos, às 18h, uma menor sincronização das células que receberam os meios compostos por DMEM 10% FCS ou 25mM de D-glucose às 2h, em relação a células que receberam os meios contendo 1mM de ácido butírico ou sem glucose nem ácido butírico.

Desse modo, as células, acostumadas a serem nutridas com meio a base de glucose, estariam menos sincronizadas relativamente à células que tiveram de se adaptar a um novo meio de cultura.

Podemos ainda afirmar que as diferentes formulações de meio de cultura têm de facto um efeito sobre a expressão de PERIOD1. Observamos realmente uma expressão maximal de PERIOD1 para as fórmulas contendo 10% de FCS ou ácido butírico (uma vez que os níveis de vermelho que foram quantificados são maiores), enquanto se afere uma expressão mais reduzida para a fórmula com 25mM de D-glucose, ou mesmo minimal no caso da fórmula sem glucose nem ácido butírico.

Essas observações confirmam assim a análise realizada anteriormente às fotografias.

Por outro lado, os rácios médios entre os níveis de cinzento no vermelho (PERIOD1) e os níveis de cinzento no verde (*Hoechst*®), calculados para cada situação, confortam a nossa conclusão, tendo em conta que se obtêm valores mais reduzidos nos casos em que se utilizaram os meios com 25mM de glucose ou sem glucose nem ácido butírico.

Porém, também não nos foi possível realizar um teste estatístico devido ao facto de dispormos de um número insuficiente de núcleos.

A presente experiência permite-nos contudo evidenciar interesse na utilização de ácido butírico a título de sincronizador. De facto, o ácido butírico pode agir como um factor de entrada (*input*): em resposta ao stress, activa os genes da resposta imediata, entre os quais *Period1*, e conseqüentemente a sua transcrição e tradução em proteínas PERIOD1.

A literatura indica que as células Caco-2 consumiriam apenas glucose, mas apenas uma revela que poderá igualmente consumir ácido butírico. Será assim relevante seguir a evolução da concentração em ácido butírico ao longo da experiência, além de que a RT-PCR realizada no início do estudo revelou a expressão do transportador do ácido láctico e do ácido butírico pelas células Caco-2.

#### ***4.3.2 Evolução das taxas de ácido butírico ao longo do tempo***

Realizamos experimentações sobre a evolução da concentração em ácido butírico de um meio contendo esse componente, em tapetes celulares de diferentes idades, e em placas P6 e P24.

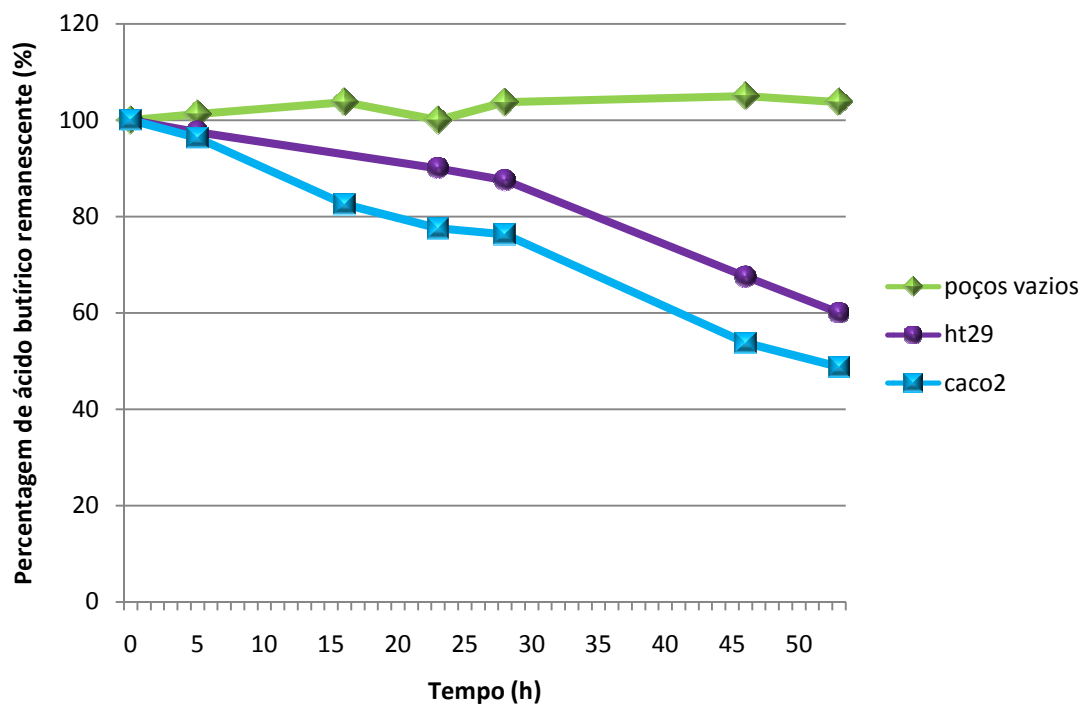
Apresentamos os resultados de acordo com o tamanho dos poços utilizados, de modo a permitir uma comparação.

Nos poços P24, realizamos 3 experiências:

- a primeira baseou-se na determinação da concentração em ácido butírico de um meio depositado em tapetes de células Caco-2 confluentes aos 5 dias, 2h (quando foi depositado o meio com 1mM de ácido butírico) e 18h após a realização do choque sérico;
- a segunda experiência foi realizada em paralelo em tapetes de células Caco-2 e HT29 clone 16E (consumidoras de ácido butírico de acordo com a literatura), confluentes após 1 dia.
- a última experiência consistiu em afastar a hipótese de desaparecimento de

ácido butírico por volatilização do composto, utilizando uma placa sem cultura celular.

De modo a permitir uma comparação entre os ensaios referidos, exprimimos os resultados em termos de percentagem de desaparecimento de ácido butírico (Figura 18).



**Figura : Seguimento da evolução da concentração em ácido butírico em poços P24 vazios e em poços P24 contendo tapetes de células Caco-2 ou HT29 clone 16E**

No que diz respeito ao ensaio realizado sobre tapetes de células Caco-2 confluentes após 5 dias, determinamos que o meio depositado 2h após a realização do choque sérico contém 1,37mM de ácido butírico, quando apenas deveria conter, teoricamente, 1mM.

O desfasamento entre as concentrações esperadas e as reveladas na dosagem do ácido butírico devem-se provavelmente a erros de pipetagem durante a preparação dos meios e/ou durante a diluição da amostra pelo ácido oxálico. No entanto, tendo em conta que a coluna detectou 0,28mM de C<sub>4</sub> num meio de cultura que não deveria conter esse constituinte (meio DMEM 10% FCS), poderemos igualmente pôr em causa um possível efeito do plástico, do filtro ou da coluna. Detectamos ainda vestígios de iso C<sub>4</sub> após 3,2min de retenção, mas, de acordo com o tempo de retenção observada, não se tratará de iso C<sub>4</sub>.

Entre 2h e 18h após a realização do choque sérico (ou seja, no gráfico, nos pontos 0h e 16h respectivamente), verificamos o desaparecimento de 0,28mM de ácido butírico, o que se traduz, em termos percentuais, em 20,67% em 16h.

Existem 2 hipóteses quanto ao que terá acontecido: o ácido butírico poderá ter sido:

- consumido, ou retido pelas células Caco-2;
- ou volatilizado.

Essa última hipótese é refutável uma vez que a dosagem do ácido butírico depositado em poços vazios não revelou redução na concentração desse composto ao longo do tempo.

A experiência realizada sobre 53h, sobre células Caco-2 e HT29 clone 16E revela que as células Caco-2 terão globalmente um comportamento semelhante ao de células

HT29 clone 16E.

No entanto, se de facto as células Caco-2 consomem ácido butírico, esse consumo será superior ao de células HT29 clone 16E.

Essa experimentação confirma os resultados da anterior, uma vez que a percentagem de ácido butírico consumido durante o mesmo intervalo de tempo é muito semelhante.

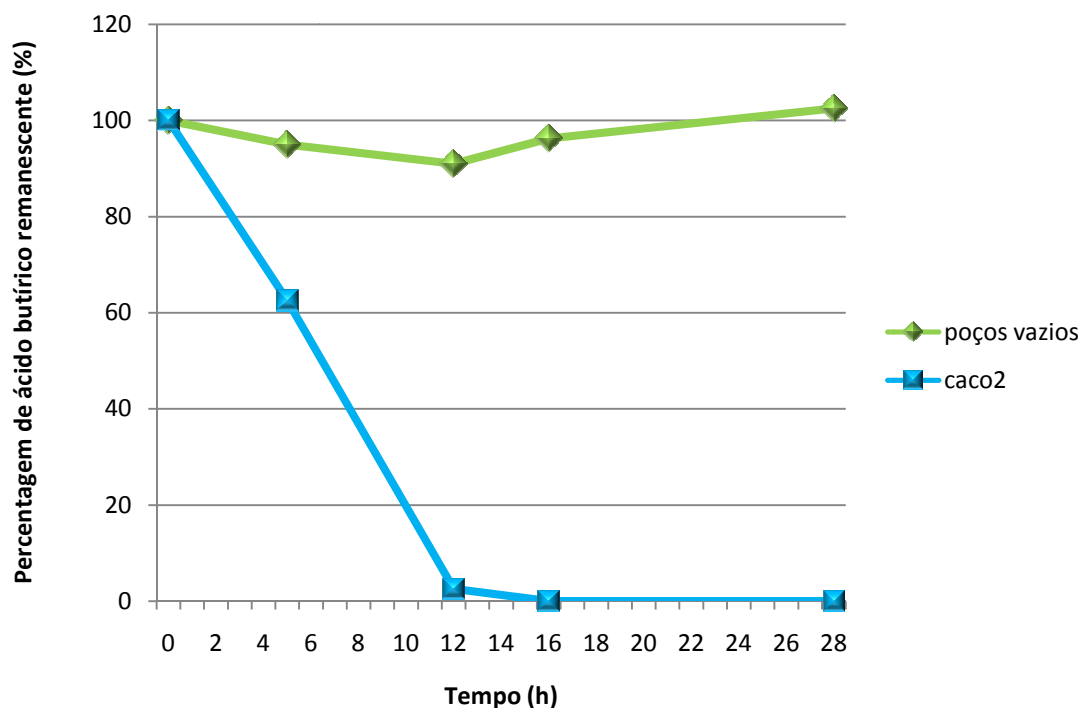
Deve-se notar que o tapete de células confluentes após 1 dia (utilizado nesse último ensaio) não foi submetido a qualquer choque sérico, ao contrário do tapete de células confluentes após 5 dias. Tal facto poderá indicar que a re-indução do relógio pelo choque sérico é desnecessário para que as células Caco-2 consumam (eventualmente) ácido butírico.

Na experiência, não detectamos iso C<sub>4</sub>, pelo que podemos suspeitar de um efeito da coluna utilizada na CFG, do plástico, do filtro ou da preparação dos meios.

Procedemos ainda a duas experiências em poços P6: seguimos assim a evolução da concentração de ácido butírico em tapetes de células Caco-2 confluentes após 3 dias, bem como uma experiência de volatilização.

Apresentamos igualmente os resultados em percentagem de desaparecimento de

ácido butírico, pelas mesmas razões indicadas anteriormente (Figura 19).



**Figura : Seguimento da evolução da concentração em ácido butírico em poços P6 vazios e em poços P6 contendo tapetes de células Caco-2**

Procedemos a um doseamento da glucose, para demonstrar que o meio com ácido butírico não continha de facto glucose.

A dosagem do ácido butírico confirma a ausência do composto nos meios que não deveriam apresentar vestígios do mesmo, mas que a solução mãe, a 1mM de ácido butírico, afinal apresentaria apenas 0,716mM. A diferença obtida dever-se-á provavelmente a um erro na preparação do meio e/ou durante a diluição da amostra pelo ácido oxálico.

Nessa dosagem, não se detectou qualquer vestígio de  $C_4$  nas soluções DMEM 10% FCS e DMEM 50% FCS, ao contrário do que aconteceu numa dosagem anterior. Podemos assim presumir um efeito da coluna do aparelho que realiza a CFG ou o soro de vitelo fetal, que foi diferente relativamente ao utilizado anteriormente.

Encontramos ainda iso  $C_4$  em dois dos três poços com células Caco-2 que receberam o meio DMEM 10% de FCS e em dois dos três poços com células que receberam DMEM 50% de FCS.

O mesmo foi retido após 3,76min, ao contrário dos vestígios de iso  $C_4$  detectado nos poços contendo ácido butírico após 30min, retido após 3,18min.

Esses dados também não nos permitem determinar a causa de aparição de iso  $C_4$ .

Relativamente à evolução da concentração em ácido butírico, observamos uma mobilização de ácido butírico pelas células Caco-2.

De facto, 7h após a realização do choque sérico, apenas permanecem 0,449mM de ácido butírico (ou seja, um desaparecimento do composto em 37,29% num intervalo de 5h).

14h após o choque, resta uma quantidade relativamente reduzida de ácido butírico

(apenas 0,022mM, ou seja, verifica-se uma mobilização de 96,94% em relação a 2h), inexistente a partir de 23h.

Em comparação com a dosagem realizada anteriormente, as células terão consumido todo o ácido butírico, e num intervalo de tempo mais restrito.

Os resultados obtidos nessa dosagem podem ser explicados por 2 factores:

- um poço P6 apresenta uma superfície cinco vezes superior em relação a um poço P24 (9cm<sup>2</sup> vs 1,84cm<sup>2</sup> respectivamente), pelo que a quantidade de células Caco-2 utilizadas nesse último ensaio é relativamente superior;
- poderá ter ocorrido uma volatilização do ácido butírico ao longo do ensaio (daí efectuarmos uma experiência de volatilização).

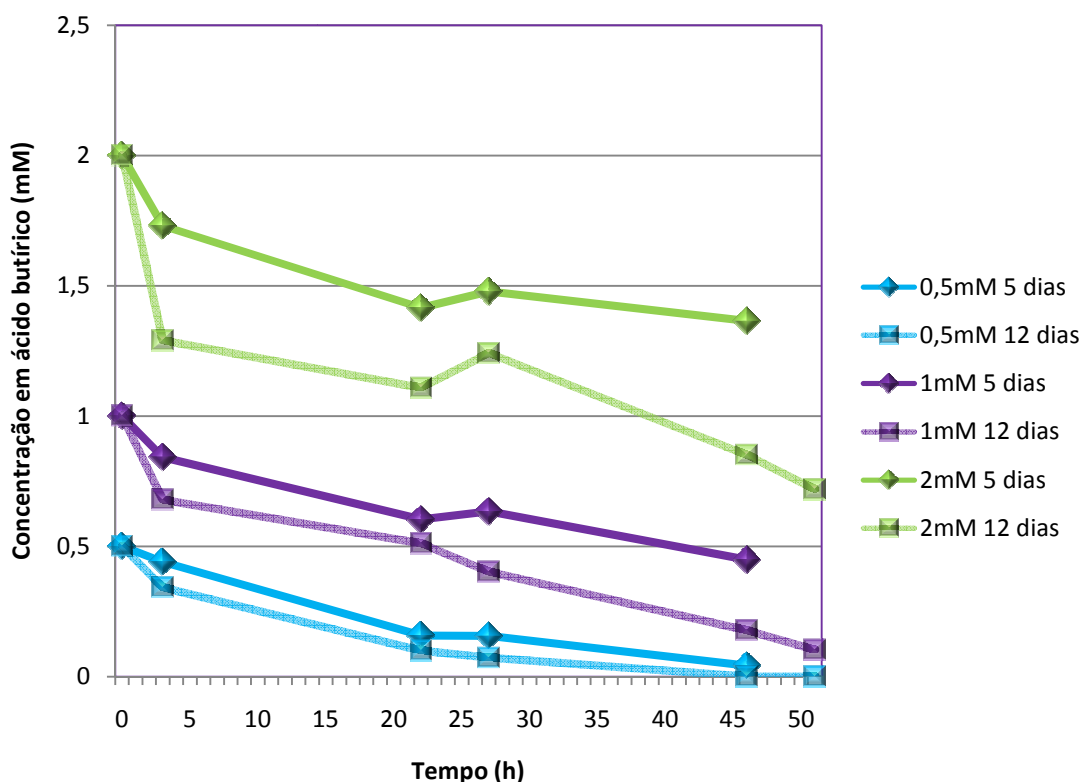
A experiência de volatilização revela erros de pipetagem (níveis determinados no final do ensaio superiores ao nível inicialmente depositado), mas permite-nos afastar a hipótese de uma eventual volatilização do composto (níveis finais próximos dos iniciais).

Desse modo, o tapete de células Caco-2 confluyente após 3 dias terá de facto utilizado o ácido butírico depositado.

No presente ensaio, não detectamos vestígios de iso C<sub>4</sub>. Podemos assim por em

causa a coluna utilizada na CFG, tendo ainda em conta que a amostra de solução a 1mM de ácido butírico, doseada a 0,926mM aquando a dosagem das amostras, foi doseada no dia seguinte, a 1,002mM (coeficiente de variação de 7% entre duas CFG realizadas num intervalo de um dia). Essa observação não nos permite, contudo, excluir um eventual efeito do plástico, do filtro ou da preparação dos meios.

Concluimos o estudo com a realização de uma última experiência sobre 51h, com tapetes celulares de idades diferentes (5 ou 12 dias), e diferentes concentrações em ácido butírico (2mM, 1mM e 0,5mM), de modo a determinar se os factores tempo, idade e dose têm algum efeito sobre o desaparecimento de ácido butírico observado até agora, nas experiências anteriores (Figura 20)



**Figura : Seguimento da evolução da concentração em ácido butírico em poços P24 contendo tapetes de células Caco-2 a confluência após 5 ou 12 dias.**

A dosagem dos sobre-nadentes removidos dos tapetes de 5 dias foi efectuada até 46h, devido a uma contaminação dos poços às 51h.

Detectamos um desaparecimento do ácido butírico, variável em cada caso. Assim, o presumido consumo de ácido butírico pelas células de 12 dias é superior em relação ao de células de 5 dias (Tabela 1).

**Tabela : Percentagem de ácido butírico remanescente após 46h em tapetes de células Caco-2 confluentes após 5 ou 12 dias**

Dose inicial	Ácido butírico remanescente às 46h	
	Em tapetes de 5 dias	Em tapetes de 12 dias
<b>2 mM</b>	69,60%	43,40%
<b>1 mM</b>	5,20%	17,90%
<b>0,5 mM</b>	7,60%	0,00%

Podemos assim presumir que a idade do tapete poderá constituir um factor que influenciará a quantidade de ácido butírico.

Para tal, procedemos à uma análise de variância a 2 vias, de modo a determinar se os factores tempo e idade do tapete terão efectivamente uma influência sobre a quantidade de ácido butírico desaparecida (Anexo 6).

Em cada caso (factores tempo e idade do tapete celular), o F calculado é superior ao F crítico, e o valor de P é inferior a 0,05, para cada dose em estudo. Podemos assim

concluir, com um nível de significância de 95%, que os factores tempo e idade do tapete terão de facto um efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece ao longo do ensaio.

Utilizamos igualmente uma análise de variância de 2 vias para determinar se a dose de ácido butírico terá também um efeito sobre a quantidade de ácido butírico consumido (Anexo 7).

Para os factores tempo e dose de ácido butírico, o F calculado é superior ao F crítico, e o valor de P é inferior a 0,05, para cada tapete celular em estudo. Podemos assim concluir, com um nível de significância de 95%, que os factores tempo e dose de ácido butírico terão de facto um efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece ao longo do ensaio.

**Considerações**

**Finais**

## 5. Considerações finais

O funcionamento do relógio circadiano tem sido relativamente estudado e documentado em ratos, ao contrário do Homem e animais de interesse zootécnico.

O meio mais eficaz de explorar a regulação da ritmicidade circadiana no Homem permanece contudo a utilização de um modelo humano. Tendo em conta que células sãs dificilmente podem ser cultivadas, escolhemos um modelo de carcinoma cólico: células Caco-2.

Porém, todos os modelos celulares não exprimem todos os genes do relógio circadiano. Assim, tivemos que determinar, através de RT PCR, se os ARNm de um factor de entrada (SRF), de genes do relógio (entre os quais *Period1*) e de factores de saída eram exprimidos, tanto por colonócitos de indivíduos saudáveis, como por células Caco-2.

Em termos quantitativos, observamos diferenças a nível da expressão dos ARNm desses genes, tanto entre pacientes, como entre pacientes e células Caco-2. No entanto, todos os ARNm dos genes pesquisados são expressos pelos pacientes e pelas células Caco-2. Deduzimos então que as células Caco-2 podem ser utilizadas para explorar a regulação da ritmicidade circadiana, de modo qualitativo.

O seguimento em cinética de SRF sobre 18h confirma que se trata de um *input* do

relógio. De facto, apenas observamos um único pico de expressão desse factor 30min após o choque sérico, e uma diminuição progressiva dessa expressão a seguir. Um estudo anteriormente realizado no laboratório também tinha demonstrado que a expressão de SRF não oscila sobre 48h.

A expressão da proteína PERIOD1, pelo contrário, oscila sobre 48h. Essa proteína, reprimida após 2h, atinge um novo pico de expressão entre as 12 e as 24h, às 36h e às 42h. Tendo em conta que PERIOD1 oscila nesse modelo celular, deduzimos que a mesma detém igualmente um lugar de destaque no relógio circadiano intestinal.

A semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos das células Caco-2 sobre 48h revela que o choque sérico sincroniza as células, mas apenas durante um prazo limitado, uma vez que as mesmas manifestam uma dessincronização a partir de 30h. No entanto, não dispomos de núcleos suficientes para realizar um teste estatístico. Por outro lado, esta semi-quantificação confirma as oscilações de PERIOD1 sobre 48h.

No que diz respeito às diferentes fórmulas de meio utilizadas, podemos afirmar que as mesmas têm de facto um efeito sobre a expressão de PERIOD1. Observamos assim uma forte expressão de PERIOD1 com um meio composto por 1mM de ácido butírico, relativamente ao meio habitual, enquanto a mesma é mais reduzida para um meio com 25mM de D-Glucose. Parece assim interessante utilizar o ácido butírico como agente sincronizador.

As células Caco-2 são reconhecidas por consumir glucose, mas não existe qualquer afirmação quanto ao possível consumo de ácido butírico. Porém, a RT-PCR realizada inicialmente revela a expressão, pelas células Caco-2, dos ARNm de MCT1, transportador do ácido láctico e do ácido butírico. Interrogamo-nos então quanto a um eventual consumo de ácido butírico por essas células. A dosagem do ácido butírico a partir dos sobre-nadentes recolhidos a diferentes períodos, dos poços que continham lamelas com células Caco-2, permitiu-nos evidenciar o desaparecimento desse composto ao longo do tempo. Tendo afastado a hipótese de volatilização do ácido butírico, apenas remanesce a hipótese de consumo do ácido butírico pelas células, independentemente da realização de choque sérico. As análises de variância realizadas a partir dos resultados obtidos na última experiência mostraram um efeito do tempo, assim como da dose de ácido butírico depositada e da idade do tapete celular, na evolução da quantidade de ácido butírico remanescente.

Podemos assim concluir que as células Caco-2 utilizam o ácido butírico. Recordando a expressão mais significativa de PERIOD1 quando se utiliza ácido butírico como meio de cultura, deduzimos que o ácido butírico utilizado por essas células pode servir de regulador da expressão de pelo menos um dos genes do relógio circadiano intestinal: *Period1*.

A devida identificação dos agentes reguladores dos genes e conseqüentemente do relógio circadiano intestinal, e a aplicação dos mesmos de forma a garantir o correcto funcionamento do relógio, poderá fomentar a função de defesa do tracto gastrointestinal do Homem e de qualquer animal em geral, contra agentes

patogénicos.

Em termos de produção animal, a promoção das defesas imunitárias referidas anteriormente poderá constituir uma alternativa à utilização de antibióticos. O aprofundamento desse tema poderá assim adquirir uma relevância particular, pois poderá reflectir-se numa maior satisfação, tanto pelos produtores (menores encargos no controlo de agentes patogénicos e garantia de segurança dos produtos) como pelos consumidores (garantia de segurança dos alimentos adquiridos e bem estar animal).

**Referências**  
**Bibliográficas**

## Referências Bibliográficas

**Acúrcio, A.; Rodrigues, L.** 2009. Os Ritmos da Vida - Uma Visão Atualizada da Cronobiologia Aplicada. *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde*. **6(2)**: 216-234.

**Albrecht, U.; Sun, Z. S.; Eichele, G.; Lee, C. C.** 1997. A Differential Response of Two Putative Mammalian Circadian Regulators, *mper1* and *mper2*, to Light. *Cell*. **91(7)**: 1055-1064.

**Ando, H.; Yanagihara, H.; Hayashi, Y.; Obi, Y.; Tsuruoka, S.; Takamura, T.; Kaneko, S.; Fujimura, A.** 2005. Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology* **146**: 5631–5636.

**Antoch, M. P.; Song, E. J.; Chang, A. M.; Vitaterna, M. H.; Zhao, Y.; Wilsbacher, L. D.; Sangoram, A. M.; King, D. P.; Pinto, L. H.; Takahashi, J. S.** 1997. Functional Identification of the Mouse Circadian Clock Gene by Transgenic BAC Rescue. *Cell*. **89 (4)**: 655-667.

**Antoch, M. P.; Chernov, M.V.** 2009. Pharmacological modulators of the circadian clock as potential therapeutic drugs. *Mutation Research*. **680**: 109-115.

**Aujard, F.** 2002. Quand l'horloge du cerveau perd son tempo. *CNRS Info*. **399**: 9-10.

**Bae, K., Jin, X.; Maywood, E. S.; Hastings, M. H.; Reppert, S. M.; Weaver, D. R.** 2001. Differential Functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN Circadian Clock. *Neuron*. **30 (2)**: 525-536.

**Balsalobre, A.; Damiola, F.; Schibler, U.** 1998. A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. *Cell*. **93 (6)**: 929-937.

**Balsalobre, A.; Brown, S. A.; Marcacci, L.; Tronche, F.; Kellendonk, C.; Reichardt, H. M.; Schütz, G.; Schibler, U.** 2000. Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. *Science*. **289 (5488)**: 2344-2347.

**Bastard, J. P.; Hainque, B.** 1995. Mécanismes d'action cellulaire de l'insuline et insulino-résistance périphérique. *Sang Thrombose Vaisseaux*. **7 (6)**: 365-374.

**Bio-Rad® Laboratories.** s/d. *Real-Time PCR Detection Systems* ([http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/product/br\\_category.jsp?BV\\_SessionID=@@@@0662321769.1269796787@@@&BV\\_EngineID=cccfadejmikligmcfngcfkmdhkkdfm.0&divName=Lif+Science+Research&categoryPath=Catalogs%2fLife+Science+Research%2fAmplification+%7c+PCR%2fReal-Time+PCR+Detection+Systems&loggedIn=false&lang=English&country=PT&catLevel=4&catOID=-32437&isPA=false&serviceLevel=Lit+Request](http://www3.bio-rad.com/B2B/BioRad/product/br_category.jsp?BV_SessionID=@@@@0662321769.1269796787@@@&BV_EngineID=cccfadejmikligmcfngcfkmdhkkdfm.0&divName=Lif+Science+Research&categoryPath=Catalogs%2fLife+Science+Research%2fAmplification+%7c+PCR%2fReal-Time+PCR+Detection+Systems&loggedIn=false&lang=English&country=PT&catLevel=4&catOID=-32437&isPA=false&serviceLevel=Lit+Request) – 27/01/10).

**Bogdan, A.; Toutou, Y.** 2001. Rythmes biologiques, nutrition et métabolisme. *Revue Française des Laboratoires*. **334**: 59-63.

**Bognár, L. K.; Hall, A.; Ádám, 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*. **96 (25)**: 14652-14657.

**Boissin, J.; Canguilhem, B.** 1998. Introduction in: *Les rythmes du vivant. Origine et contrôle des rythmes biologiques*. (Ed J. Boissin et B. Canguilhem), pp 14-24. Éditions Nathan et CNRS éditions, Paris.

**Boulos, Z.; Rosenwasser, A. M.; Terman, M.** 1980. Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat. *Behav Brain Res*. **1 (1)**: 39-56.

**Boyen, F.; Haesebrouck, F.; Vanparrys, A.; Volf, J.; Mahu, M.; Van Immerseel, F.; Rychlik, I.; Dewulf, J.; Ducatelle, R.; Pasmans, F.** 2008. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella Typhimurium* and decrease intestinal colonization of pigs. *Veterinary Microbiology*. **132(3-4)**: 319-327.

**Bunger, M. K.; Wilsbacher, L. D.; Moran, S. M.; Clendenin, C.; Radcliffe, L. A.; Hogenesch, J. B.; Simon, M. C.; Takahashi, J. S.; Bradfield, C. A.** 2000. *Mop3* Is an Essential Component of the Master Circadian Pacemaker in Mammals. *Cell*. **103 (7)**: 1009-1017.

**Burioka, N.; Takata, M.; Okano, Y.; Ohdo, S.; Fukuoka, Y.; Miyata, M.; Takane, H.; Endo, M.; Suyama, H.; Shimizu, E.** 2005. Dexamethasone influences human clock gene expression in bronchial epithelium and peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Chronobiol. Int.* **22**: 585–590.

**Butler, M. P.; Honma, S.; Fukumoto, T.; Kawamoto, T.; Fujimoto, K.; Noshiro, M.; Kato, Y.; Honma, K. I.** 2004. Dec1 and Dec2 Expression is Disrupted in the Suprachiasmatic Nuclei of Clock Mutant Mice. *J Biol Rhythms.* **19 (2)**: 126-134.

**Cermakian, N.** 2002. *Cours d'introduction aux rythmes biologiques et horloges circadiennes.*

**Cermakian, N.; Sassone-Corsi, P.** 2000. Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **1 (1)**: 59-67.

**Chai, J.; Tarnawski, A. S.** 2002. Serum Response Factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol.* **53 (2)**: 147-157.

**Challamel, M. J.; Clarisse, R.; Lévi, F.; Laumon, B.; Testu, F.; Touitou, Y.** 2001. *Rythmes de l'enfant. De l'horloge biologique aux rythmes scolaires.* Editions INSERM, Paris.

**Chen, P.; Kakan, X.; Zhang, J.** 2010. Altered circadian rhythm of the clock genes in fibrotic livers induced by carbon tetrachloride. *FEBS Letters.* Article In Press.

**Cheng, M. Y.; Bullock, C. M.; Li, C.; Lee, A. G.; Bermak, J. C.; Belluzzi, J.; Weaver, D. R.** 2002. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature.* **417 (6887)**: 405-410.

**Claustrat, F.; Fournier, I.; Geelen, G.; Brun, J.; Corman, B.; Claustrat, B.** 2005. Vieillesse et expression des gènes de l'horloge circadienne dans les tissus périphériques chez le rat. *Pathologie Biologie.* **53(5)**: 257-260.

**Damiola, F.; Le Minh, N.; Preitner, N.; Kornmann, B.; Fleury-Olela, F.; Schibler, U.**

2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* **14 (23)**: 2950-2961.

**Defoirdt, T.; Boon, N.; Sorgeloos, P.; Verstraete, W.; Bossier, P.** 2009. Short-chain fatty acids and poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnology Advances.* **27(6)**: 680-685.

**Delaunay, F.; Laudet, V.** 1998. Rythme circadien: des horloges dans les organes périphériques et dans des fibroblastes en culture. *Médecine/Sciences.* **10 (14)**: 1114-1117.

**Dickmeis, T.** 2009. Glucocorticoids and the circadian clock. *Journal of Endocrinology.* **200**: 3-22.

**Dunlap, J.C.** 1999. Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell.* **96 (2)**: 271-290.

**Earnest, D. J.; Liang, F. Q.; Ratcliff, M.; Cassone, V. M.** 1999. Immortal time: circadian clock properties of rat suprachiasmatic cell lines. *Science.* **283 (5402)**: 693-695.

**Ebisawa, T.; Uchiyama, M.; Kajimura, N.; Mishima, K.; Kamei, Y.; Katoh, M.; Watanabe, T.; Sekimoto, M.; Shibui, K.; Kim, K.; Kudo, Y.; Ozeki, Y.; Sugishita, M.; Toyoshima, R.; Inoue, Y.; Yamada, N.; Nagase, T.; Ozaki, N.; Ohara, O.; Ishida, N.; Okawa, M.; Takahashi, K.; Yamauchi, T.** 2001. Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep.* **2 (4)**:342-346.

**Eide, E. J.; Vielhaber, E. L.; Hinz, W. A.; Virshup, D. M.** 2002. The Circadian Regulatory Proteins BMAL1 and Cryptochromes Are Substrates of Casein Kinase I epsilon. *J Biol Chem.* **277 (19)**: 17248-17254.

**Emery, P.; So, W. V.; Kaneko, M.; Hall, J.C.; Rosbash, M.** 1998. CRY, a Drosophila Clock and Light-Regulated Cryptochrome, Is a Major Contributor to Circadian Rhythm Resetting and Photosensitivity. *Cell.* **95 (5)**: 669-679.

**Estruch, X.** 2003. Applications de la chronobiologie à la planification des cours et aux rythmes scolaires. Revue de la littérature in: *Cours de maîtrise STAPS*.

**Field, M. D.; Maywood, E. S.; O'Brien, J. A.; Weaver, D. R.; Reppert, S. M.; Hastings, M. H.** 2000. Analysis of Clock Proteins in Mouse SCN Demonstrates Phylogenetic Divergence of the Circadian Clockwork and Resetting Mechanisms. *Neuron*. **25 (2)**: 437-447.

**Foster, R. G.; Lucas, R. J.** 1999. Clocks, criteria and critical genes. *Nat Genet*. **22 (3)**: 217-219.

**Franken, P.; Lopez-Molina, L.; Marcacci, L.; Schibler, U.; Tafti, M.** 2000. The Transcription Factor DBP Affects Circadian Sleep Consolidation and Rhythmic EEG Activity. *J Neurosci*. **20 (2)**: 617-625.

**Freedman, M. S.; Lucas, R. J.; Soni, B.; von Schantz, M.; Muñoz, M.; David-Gray, Z.; Foster, R.** 1999. Regulation of Mammalian Circadian Behavior by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors. *Science*. **284 (5413)**: 502-504.

**Fukuhara, C.; Tosini, G.** 2008. Analysis of daily and circadian gene expression in the rat pineal gland. *Neurosci. Res*. **60**: 192–198.

**Füller, C. A.; Sulzman, F. M.; Moore-Ede, M. C.** 1985. Role of heat loss and heat production in generation of the circadian temperature rhythm of the squirrel monkey. *Physiol Behav*. **34 (4)**: 543-546.

**Garcia, J. A.; Zhang, D.; Estill, S. J.; Mich2226noff, C.; Rutter, J.; Reick, M.; Scott, K.; Diaz-Arrastia, R.; McKnight, S. L.** 2000. Impaired Cued and Contextual Memory in NPAS2-Deficient Mice. *Science*. **288 (5474)**: 2226-2230.

**Gekakis, N.; Staknis, D.; Nguyen, H. B.; Davis, F. C.; Wilsbacher, L. D.; King, D. P.; Takahashi, J. S.; Weitz, C. J.** 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*. **280 (5369)**: 1564-1569.

**Goldbeter, A.; Leloup, J. C.** 2003. La modélisation des rythmes du vivant. *Pour la*

*Science*. **314**: 70-76.

**Gotter, A. L.; Manganaro, T.; Weaver, D. R.; Kolakowski, L. F.; Possidente, B.; Sriram, S.; MacLaughlin, D. T.; Reppert, S. M.** 2000. A time-less function for mouse Timeless. *Nat Neurosci*. **3 (8)**: 755-756.

**Gotter, A. L.; Reppert, S. M.** 2001. Analysis of human *Per4*. *Mol Brain Res*. **92 (1-2)**: 19-26.

**Hankins, M. W.; Peirson, S. N.; Foster, R. G.** 2008. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends in Neurosciences*. **31**: 27-36.

**Hansen, C. F.; Riis, A. L.; Bresson, S.; Højbjerg, O.; Jensen, B. B.** 2007. Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of the piglet stomach. *Livestock Science*. **108(1-3)**: 206-209.

**Hao, H.; Allen, D. L.; Hardin, P. E.** 1997. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol*. **17 (7)**: 3687-3693.

**Harmer, S. L.; Panda, S.; Kay, S. A.** 2001. Molecular Bases of Circadian Rhythms. *Annu Rev Cell Biol*. **17**: 215-253.

**Hastings, M. H.; Field, M. D.; Maywood, E. S.; Weaver, D. R.; Reppert, S. M.** 1999. Differential Regulation of mPER1 and mTIM Proteins in the Mouse Suprachiasmatic Nuclei: New Insights into a Core Clock Mechanism. *J Neurosci*. **19 (12)**: RC11 (1-7).

**Hedemann; M. S.; Knudsen, K. E. B.** 2007. Resistant starch for weaning pigs — Effect on concentration of short chain fatty acids in digesta and intestinal morphology. *Livestock Science*. **108(1-3)**: 175-177

**Hirota, T.; Okano, T.; Kokame, K.; Shirotani-Ikejima, H.; Miyata, T.; Fukada, Y.** 2002. Glucose Down-regulates *Per1* and *Per2* mRNA Levels and Induces Circadian Gene Expression in Cultured Rat-1 Fibroblasts. *J Biol Chem*. **277 (46)**: 44244-44251.

**Hogenesch, J. B.; Gu, Y. Z.; Jain, S.; Bradfield, C. A.** 1998. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci.* **95 (10)**: 5474-5479.

**Honma, S.; Kawamoto, T.; Takagi, Y.; Fujimoto, K.; Sato, F.; Noshiro, M.; Kato, Y.; Honma, K. I.** 2002. *Dec1* and *Dec2* are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature.* **419 (6909)**: 841: 844.

**Hughes, M.; Deharo, L.; Pulivarthy, S.R.; Gu, J.; Hayes, K.; Panda, S.; Hogenesch, J. B.** 2007. High-resolution time course analysis of gene expression from pituitary, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **72**: 381–386.

**Ikeda, M.; Nomura, M.** 1997. cDNA Cloning and Tissue-Specific Expression of a Novel Basic Helix–Loop–Helix/PAS Protein (BMAL1) and Identification of Alternatively Spliced Variants with Alternative Translation Initiation Site Usage. *Biochem Biophys Res Commun.* **233 (1)**: 258-264.

**Jin, X.; Shearman, L. P.; Weaver, D. R.; Zylka, M. J.; De Vries, G. J.; Reppert, S. M.** 1999. A Molecular Mechanism Regulating Rhythmic Output from the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Cell.* **96 (1)**: 57-68.

**Johnson, B. C.** 1992. Nutrient Intake as a Time Signal for Circadian Rhythm. *J. Nutr.* **122 (9)**: 1753-1759.

**Jouvet, M.** s/d. *Horloge biologique et cycle éveil-sommeil-rêve*. Le courrier du CNRS. (<http://sommeil.univ-lyon1.fr/articles/jouvet/jcnrs/horloge.php> – 15/01/10).

**Kaeffer, B.; Pardini, L.** 2005. Clock genes of mammalian cells: practical implications in tissue culture. *In Vitro Cell Dev Biol Animal.* **41**: 311-320.

**Kamphuis, W.; Cailoto, C.; Dijk, F.; Bergen, A.; Buijs, R. M.** 2005. Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochem Biophys Res Commun.* **330 (1)**: 18-26.

**Keesler, G. A.; Camacho, F.; Guo, Y.; Virshup, D.; Mondadori, C.; Yao, Z.** 2000.

Phosphorylation and destabilization of human period 1 clock protein by human casein kinase I epsilon. *NeuroReport*. **11 (5)**: 951-955.

**King, D. P.; Zhao, Y.; Sangoram, A. M.; Wilsbacher, L. D.; Tanaka, M.; Antoch, M. P.; Steeves, T. D. L.; Vitaterna, M. H.; Kornhauser, J. M.; Lowrey, P. L.; Turek, F. W.; Takahashi, J. S.** 1997. Positional Cloning of the Mouse Circadian *Clock* Gene. *Cell*. **89 (4)**: 641-653.

**Knutsson, A.** 2003. Health disorders of shift workers. *Occup. Med. (Lond.)* **53**: 103–108.

**Kobayashi, K.; Kanno, S.; Smit, B.; van der Horst, G. T.; Takao, M.; Yasui, A.** 1998. Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res.* **26 (22)**: 50086-5092.

**Kramer, A.; Yang, F. C.; Snodgrass, P.; Li, X.; Scammell, T. E.; Davis, F. C.; Weitz, C. J.** 2001. Regulation of Daily Locomotor Activity and Sleep by Hypothalamic EGF Receptor Signaling. *Science*. **294 (5551)**: 2511-2515.

**Kume, K.; Zylka, M. J.; Sriram, S.; Shearman, L. P.; Weaver, D. R.; Jin, X.; Maywood, E. S.; Hastings, M. H.; Reppert, S. M.** 1999. mCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop. *Cell*. **98 (2)**: 193-205.

**Lacoche, S.; Delaunay, F.** 2003. L'analyse globale de l'expression circadienne des gènes. *Pathologie Biologie*. **51**: 208-209.

**la Fleur, S. E., Kalsbeek, A.; Wortel, J.; Fekkes, M. L.; Buijs, R. M.** 2001. A Daily Rhythm in Glucose Tolerance: A Role for the Suprachiasmatic Nucleus. *Diabetes*. **50 (6)**: 1237-1243.

**Lakin-Thomas, P. L.** 2000. Circadian rhythms: new functions for old clock genes. *Trends Genet.* **16 (3)**: 135-142.

**Lallès, J. P.; Bosi, P.; Smidt, H.; Stokes, C. R.** 2007. Weaning — A challenge to gut

physiologists. *Livestock Science*. **108(1-3)**: 82-93.

**Lambert, C. M.; Machida, K. K.; Smale, L.; Nunez, A. A.; Weaver, D. R.** 2005. Analysis of the Prokineticin 2 system in a Diurnal Rodent, the Unstriped Nile Grass Rat (*Arvicanthis niloticus*). *J Biol Rhythms*. **20 (3)**: 206-218.

**Lankaputhra, W. E. V.; Shah, N. P.** 1998. Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acids. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **397(2)**: 169-182.

**Lavery, D. J.; Molina, L. L.; Margueron, R.; Fleury-Olela, F.; Conquet, F.; Schibler, U.; Bonfils, C.** 1999. Circadian Expression of the Steroid 15 alpha-Hydroxylase (Cyp2a4) and Coumarin 7-Hydroxylase (Cyp2a5) Genes in Mouse Liver Is Regulated by the PAR Leucine Zipper Transcription Factor DBP. *Mol. Cell. Biol.* **19 (10)**: 6488-6499.

**Lee, C.; Etchegaray, J. P.; Cagampang, F. R. A.; Loudon, A. S. I.; Reppert, S. M.** 2001. Posttranslational Mechanisms Regulate the mammalian Circadian Clock. *Cell*. **107 (7)**: 855-867.

**Lemarchal, P.** 1995. La chromatographie en phase gazeuse. Méthodes physico-chimiques d'analyse. École Nationale Supérieure Agronomique. CNAM, Rennes.

**Le Minh, N.; Damiola, F.; Tronche, F.; Schütz, G.; Schibler, U.** 2001. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J.* **20 (24)**: 7128-7136.

**Lopez-Molina, L.; Conquet, F.; Dubois-Dauphin, M.; Schibler, U.** 1997. The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J.* **16 (22)**: 6762-6771.

**Lowrey, P. L.; Shimomura, K.; Antoch, M. P.; Yamazaki, S.; Zemenides, P. D.; Ralph, M. R.; Menaker, M.; Takahashi, J. S.** 2000. Positional Syntenic Cloning and Functional Characterization of the Mammalian Circadian Mutation *tau*. *Science*. **288**

(5465): 483-491.

**Mauvieux, B.; LaRue, J.; Gouthière, L.; Sesboué, B.; Davenne, D.** 2004. Influence du niveau d'entraînement physique et sportif sur la capacité à produire une tâche attentionnelle chez des techniciens en poste de nuit. *Journées d'étude SFPS, Grenoble, 1<sup>er</sup> et 2 avril 2004.*

**McEwen, B. S.; Reagan, L. P.** 2004. Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol.* **490**: 13-24.

**Miller, B.H.; McDearmon, E.L.; Panda, S.; Hayes, K. R.; Zhang, J; Andrews, J. L.; Antoch, M. P; Walker, J. R.; Esser, K. A.; Hogenesch, J.B.; Takahashi, J. S.** 2007. Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 3342–3347.

**Miyamoto, Y.; Sancar, A.** 1998. Vitamin B<sub>2</sub>-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci.* **95 (11)**: 6097-6102.

**Montagnana, M.; Salvagno, G. L.; Lippi, G.** 2009. Circadian variation within hemostasis: an underrecognized link between biology and disease? *Semin. Thromb. Hemost.* **35**: 23–33.

**Moore-Ede, M. C.** 1986<sup>a</sup>. Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am. J. Physiol.* **250**: R735-R752.

**Moore-Ede, M. C.** 1986<sup>b</sup>. Jet Lag, Shift Work, and Maladaptation. *NIPS.* **1**: 156-160.

**Mühlbauer, E.; Wolgast, S.; Finckh, U.; Peschke, D.; Peschke, E.** 2004. Indication of circadian oscillations in the rat pancreas. *FEBS Lett.* **564 (1-2)**: 91-96.

**Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas da Universidade Federal de Santa Maria.** s/d. *NAPO – Equipamentos* (<http://www.ufsm.br/napo/> – 27/01/10).

**Oishi, K.; Sakamoto, K.; Okada, T.; Nagase, T.; Ishida, N.** 1998. Antiphase

Circadian Expression between BMAL1 and period Homologue mRNA in the Suprachiasmatic Nucleus and Peripheral Tissues of Rats. *Biochem Biophys Res Commun.* **253 (2)**: 199-203.

**Oishi, K.; Fukui, H.; Ishida, N.** 2000. Rhythmic Expression of *BMAL1* mRNA Is Altered in *Clock* Mutant Mice: Differential Regulation in the Suprachiasmatic Nucleus and Peripheral Tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* **268 (1)**: 164-171.

**Okamura, H.; Miyake, S.; Sumi, Y.; Yamaguchi, S.; Yasui, A.; Muijtjens, M.; Hoeijmakers, J. H. J.; van der Horst, G. T. J.** 1999. Photic Induction of *mPer1* and *mPer2* in *Cry*-Deficient Mice Lacking a Biological Clock. *Science.* **286 (5449)**: 2531-2534.

**Oster, H.; Damerow, S.; Hut, R.A.; Eichele, G.** 2006. Transcriptional profiling in the adrenal gland reveals circadian regulation of hormone biosynthesis genes and nucleosome assembly genes. *J. Biol. Rhythms* **21**: 350–361.

**Panda, S.; Antoch, M. P.; Miller, B. H.; Su, A. I.; Schook, A. B.; Straume, M.; Schultz, P. G.; Kay, S. A.; Takahashi, J. S.; Hogenesch, J. B.** 2002. Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell.* **109 (3)**: 307-320.

**Pardini, L.; Kaeffer, B.; Trubuil, A.; Boureille, A.; Galmiche, J. P.** 2005. Human intestinal circadian clock: expression of clock genes in colonocytes lining the crypt. *Chronobiol Int.* **22(6)**:951-61

**Pardini, L.; Kaeffer, B.** 2006. Feeding and circadian clocks. *Reprod Nutr Dev.* **5**: 1-18.

**Paul, S.K.; Samanta, G.; Halder, G; Biswas, P.** 2007. Effect of a combination of organic acid salts as antibiotic replacer on the performance and gut health of broiler chickens. *Livestock Research for Rural Development.* **19(11)**.

**Pévet, P.** 2002. Identification d'un nouveau signal de l'horloge circadienne chez les mammifères: le TGF- $\alpha$ . *Medecine/Sciences.* **11 (18)**: 1103-1106.

**Piggins, H. D.** 2002. Human clock genes. *Ann. Med.* **34 (5)**: 394-400.

**Preitner, N.; Damiola, F.; Lopez-Molina, L.; Zakany, J.; Duboule, D.; Albrecht, U.; Schibler, U.** 2002. The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB alpha Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell.* **110 (2)**: 251-260.

**Reick, M.; Garcia, J. A.; Dudley, C.; McKnight, S. L.** 2001. NPAS2: An Analog of Clock Operative in the Mammalian Forebrain. *Science.* **293 (5529)**: 506-509.

**Reppert, S. M.; Weaver, D. R.** 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol.* **63**: 647-676.

**Richter, H. G.; Torres-Farfán, C.; Rojas-García, P. P.; Campino, C.; Torrealba, F.; Serón-Ferré, M.** 2004. The Circadian Timing System: Making Sense of day/night gene expression. *Biol Res.* **37 (1)**: 11-28.

**Ripperger, J. A.; Shearman, L. P.; Reppert, S. M.; Schibler, U.** 2000. CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev.* **14 (6)**: 679-689.

**Rutter, J.; Reick, M.; Wu, L. C.; McKnight, S. L.** 2001. Regulation of Clock and NPAS2 DNA Binding by the Redox State of NAD Cofactors. *Science.* **293 (5529)**: 510-514.

**Sangoram, A. M.; Saez, L.; Antoch, M. P.; Gekakis, N.; Staknis, D.; Whiteley, A.; Fruechte, E. M.; Vitaterna, M. H.; Shimomura, K.; King, D. P.; Young, M. W.; Weitz, C. J.; Takahashi, J. S.** 1998. Mammalian Circadian Autoregulatory Loop: A *Timeless* Ortholog and *mPer1* Interact and Negatively Regulate CLOCK-BMAL1-Induced Transcription. *Neuron.* **21 (5)**: 1101-1113.

**Sato, T. K.; Panda, S.; Miraglia, L. J.; Reyes, T. M.; Rudic, R. D.; McNamara, P.; Naik, K. A.; FitzGerald, G. A.; Kay, S. A.; Hogenesch, J. B.** 2004. A Functional Genomics Strategy Reveals Rora as a Component of the Mammalian Circadian Clock. *Neuron.* **43 (4)**: 527-537.

**Shearman, L. P.; Zylka, M. J.; Weaver, D. R.; Kolakowski, Jr. L. F. ; Reppert, S. M.** 1997. Two *period* Homologs: Circadian Expression and Photic Regulation in the Suprachiasmatic Nuclei. *Neuron*. **19 (6)**: 1261-1269.

**Shearman, L. P.; Sriram, S.; Weaver, D. R.; Maywood, E. S.; Chaves, I.; Zheng, B.; Kume, K.; Lee, C. C.; van der Horst, G. T. J.; Hastings, M. H.; Reppert, S. M.** 2000<sup>a</sup>. Interacting Molecular Loops in the Mammalian Circadian Clock. *Science*. **288 (5468)**: 1013-1019.

**Shearman, L. P.; Jin, X.; Lee, C.; Reppert, S. M.; Weaver, D. R.** 2000<sup>b</sup>. Targeted Disruption of the *mPer3* Gene: Subtle Effects on Circadian Clock Function. *Mol. Cell. Biol.* **20 (17)**: 6269-6275.

**Shigeyoshi, Y.; Taguchi, K.; Yamamoto, S.; Takekida, S.; Yan, L.; Tei, H.; Moriya, T.; Shibata, S.; Loros, J. J.; Dunlap, J. C.; Okamura, H.** 1997. Light-Induced Resetting of a Mammalian Circadian Clock Is Associated with Rapid Induction of the *mPer1* Transcript. *Cell*. **91 (7)**: 1043-1053.

**Steeves, T. D. L.; King, D. P.; Zhao, Y.; Sangoram, A. M.; Du, F.; Bowcock, A. M.; Moore, R. Y.; Takahashi, J. S.** 1999. Molecular Cloning and Characterization of the Human *CLOCK* Gene: Expression in the Suprachiasmatic Nuclei. *Genomics*. **57 (2)**: 189-200.

**Stokkan, K. A.; Yamazaki, S.; Tei, H.; Sakaki, Y.; Menaker, M.** 2001 Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding. *Science*. **291 (5503)**: 490-493.

**Storch, K. F.; Lipan, O.; Leykin, I.; Viswanathan, N.; Davis, F. C.; Wong, W. H.; Weitz, C. J.** 2002. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*. **417 (6884)**: 78-83.

**Sun, Z. S.; Albrecht, U.; Zhuchenko, O.; Bailey, J.; Eichele, G.; Lee, C.C.** 1997. *RIGUI*, a Putative Mammalian Ortholog of the *Drosophila period* Gene. *Cell*. **90 (6)**: 1003-1011.

**Takahata, S.; Sogawa, K.; Kobayashi, A.; Ema, M.; Mimura, J.; Ozaki, N.; Fujii-**

**Kuriyama, Y.** 1998. Transcriptionally Active Heterodimer Formation of an Arnt-like PAS Protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and Clock. *Biochem Biophys Res Commun.* **248** (3): 789-794.

**Takata, M.; Burioka, N.; Ohdo, S.; Fukuoka, Y.; Miyata, M.; Endo, M.; Suyama, H.; Shimizu, E.** 2005. Beta2-adrenoceptor agonists induce the mammalian clock gene, hPer1, mRNA in cultured human bronchial epithelium cells in vitro. *Chronobiol. Int.* **22**: 777-783.

**Tei, H.; Okamura, H.; Shigeyoshi, Y.; Fukuhara, C.; Ozawa, R.; Hirose, M.; Sakaki, Y.** 1997. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. *Nature.* **389** (6650): 512-516.

**Travnickova-Bendova, Z.; Cermakian, N.; Reppert, S. M.; Sassone-Corsi, P.** 2002. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** (11): 7728-7733.

**van der Horst, G. T. J.; Muijtjens, M.; Kobayashi, K.; Takano, R.; Kanno, S. I.; Takao, M.; Wit, J.; Verkerk, A.; Eker, A. P. M.; van Leenen, D.; Buijs, R.; Bootsma, D.; Hoeijmakers, J. H. J.; Yasui, A.** 1999. Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature.* **398** (6728): 627-630.

**Van Immerseel, F.; Boyen, F.; Gantois, I.; Timbermont, L.; Bohez, L.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R.** 2005. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of salmonella in poultry. *Poult. Sci.* **84**: 1851-1856.

**Vielhaber, E.; Eide, E.; Rivers, A.; Gao, Z. H.; Virshup, D. M.** 2000. Nuclear Entry of the Circadian Regulator mPER1 Is Controlled by Mammalian Casein Kinase I. *Mol Cell Biol.* **20** (13): 4888-4899.

**Vitaterna, M. H.; Selby, C. P.; Todo, T.; Niwa, H.; Thompson, C.; Fruechte, E. M.; Hitomi, K.; Thresher, R. J.; Ishikawa, T.; Miyazaki, J.; Takahashi, J. S.; Sancar, A.** 1999. Differential regulation of mammalian Period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci.* **96** (21): 12114-12119.

**von Gall, C.; Garabette, M. L.; Kell, C. A.; Frenzel, S.; Dehghani, F.; Schumm-Draeger, P. M.; Weaver, D. R.; Korf, H. W.; Hastings, M. H.; Stehle, J. H.** 2002. Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci.* **5 (3)**: 234-238.

**Wirz-Justice, A.** 2007. How to measure circadian rhythms in humans. *Medicographia.* **29(1)**: 84-90.

**Wood, I. S.; Trayhurn, P.** 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr.* **89 (1)**: 3-9.

**Wood, P. A.; Du-Quiton, J.; You, S.; Hrushesky, W. J. M.** 2006. Circadian clock coordinates cancer cell cycle progression, thymidylate synthase, and 5-fluorouracil therapeutic index. *Mol Cancer Ther.* **5**: 2023-2033.

**Wood, P. A.; Xiaoming Yang; Hrushesky, W. J. M.** 2009. Clock Genes and Cancer. *Integr Cancer Ther.* **8(4)**: 303-308.

**Xiaoming Yang, Wood, P. A.; Ansell, C.; Hrushesky, W. J. M.** 2009. Circadian Time-Dependent Tumor Suppressor Function of Period Genes. *Integr Cancer Ther.* **8(4)**: 309-316.

**Yagita, K.; Okamura, H.** 2000. Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett.* **465 (1)**: 79-82.

**Yagita, K.; Yamaguchi, S.; Tamanini, F.; van der Horst, G. T. J.; Hoeijmakers, J. H. J.; Yasui, A.; Loros, J. J.; Dunlap, J. C.; Okamura, H.** 2000. Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells. *Genes Dev.* **14 (11)**: 1353-1363.

**Yagita, K.; Tamanini, F.; van der Horst, G. T. J.; Okamura, H.** 2001. Molecular Mechanisms of the Biological Clock in Cultured Fibroblasts. *Science.* **292 (5515)**: 278-281.

**Yamazaki, S.; Numano, R.; Abe, M.; Hida, A.; Takahashi, R.; Ueda, M.; Block, G.**

**D.; Sakaki, Y.; Menaker, M.; Tei, H.** 2000. Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science*. **288 (5466)**: 682-685.

**You, S.; Wood, P. A.; Xiong, Y.; Kobayashi, M.; Du-Quiton, J.; Hrushesky, W. J.** 2005. Daily coordination of cancer growth and circadian clock gene expression. *Breast Cancer Res Treat*. **91**: 47-60.

**Young, M. W.; Kay, S. A.** 2001. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet*. **2 (9)**: 702-715.

**Young, M. E.; Razeghi, P.; Taegtmeier, H.** 2001. Clock Genes in the Heart. Characterization and Attenuation With Hypertrophy. *Circ Res*. **88 (11)**: 1142-1150.

**Zheng, B.; Larkin, D. W.; Albrecht, U.; Sun, Z. S.; Sage, M.; Eichele, G.; Lee, C. C.; Bradley, A.** 1999. The *mPer2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature*. **400 (6740)**: 169-173.

**Zheng, B.; Albrecht, U.; Kaasik, K.; Sage, M.; Lu, W.; Vaishnav, S.; Li, Q.; Sun, Z. S.; Eichele, G.; Bradley, A.; Lee, C. C.** 2001. Nonredundant Roles of the *mPer1* and *mPer2* Genes in the Mammalian Circadian Clock. *Cell*. **105 (5)**: 683-694.

**Zhou, Y. D.; Barnard, M.; Tian, H.; Li, X.; Ring, H. Z.; Francke, U.; Shelton, J.; Richardson, J.; Russell, D. W.; McKnight, S. L.** 1997. Molecular characterization of two mammalian bHLH-PAS domain proteins selectively expressed in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci*. **94 (2)**: 713-718.

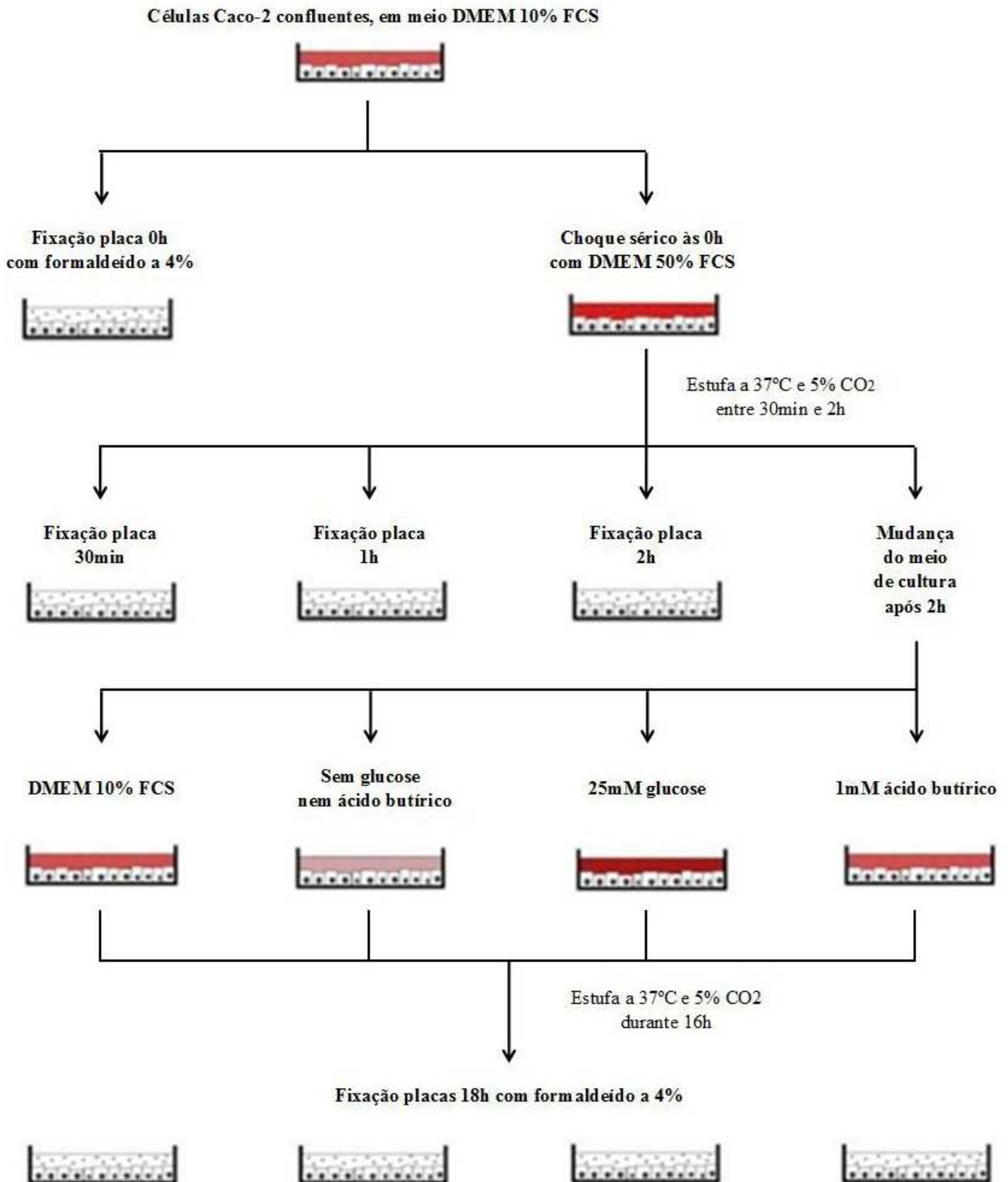
**Zylka, M. J.; Shearman, L. P.; Weaver, D. R.; Reppert, S. M.** 1998<sup>a</sup>. Three *period* Homologs in Mammals: Differential Light Responses in the Suprachiasmatic Circadian Clock and Oscillating Transcripts Outside of Brain. *Neuron*. **20 (6)**: 1103-1110.

**Zylka, M. J.; Shearman, L. P.; Levine, J. D.; Jin, X.; Weaver, D. R.; Reppert, S. M.** 1998<sup>b</sup>. Molecular Analysis of Mammalian *Timeless*. *Neuron*. **21 (5)**: 1115-1122.

# **Anexos**

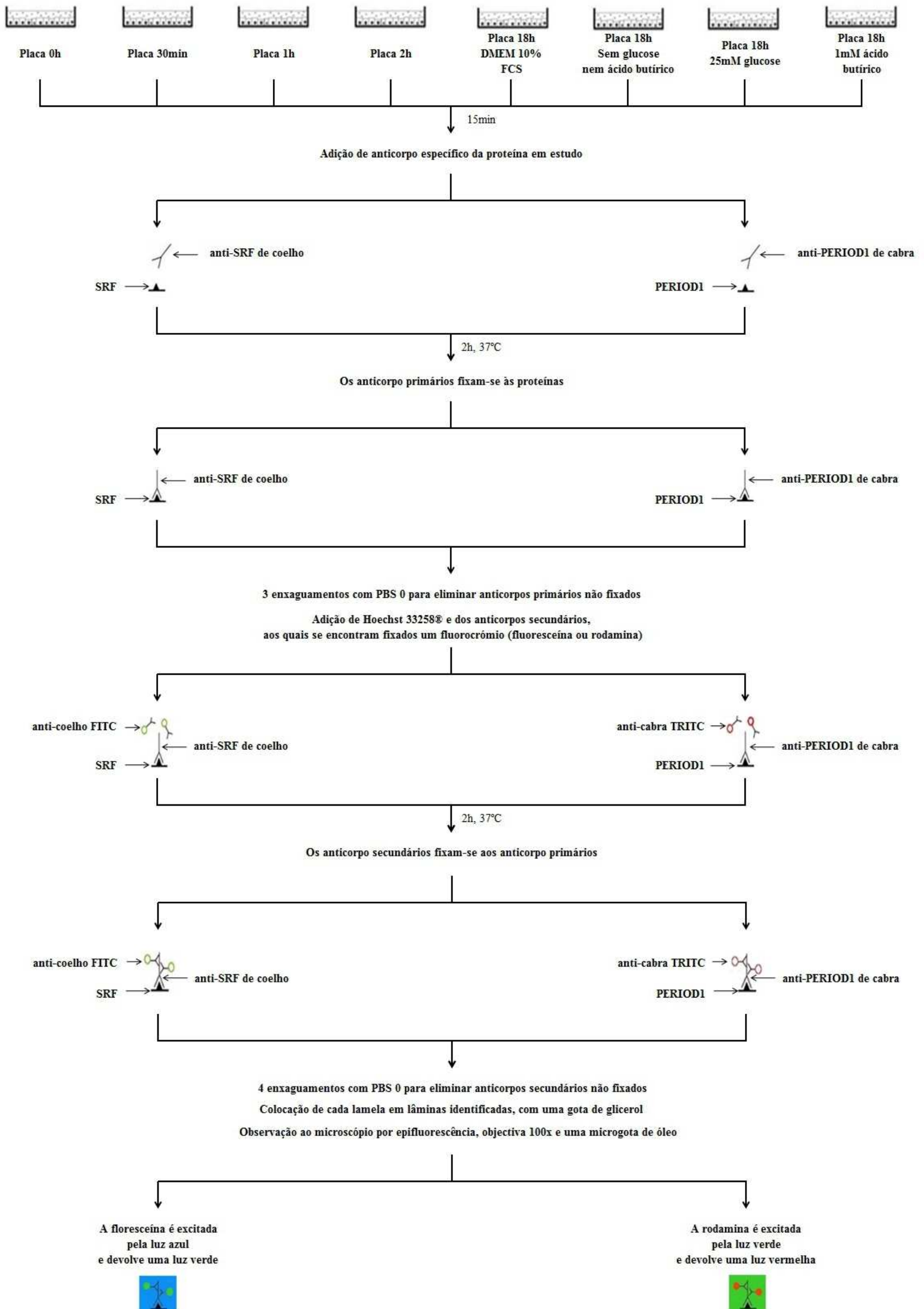
# **Anexo 1**

## Realização de choque sérico



## **Anexo 2**

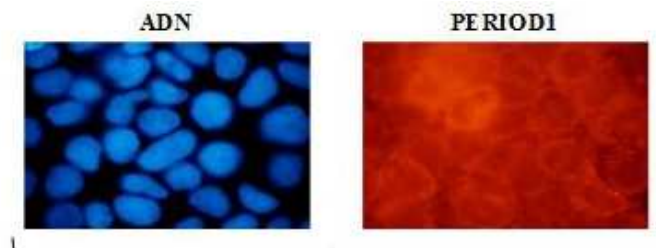
## Realização de imuno-deteccção



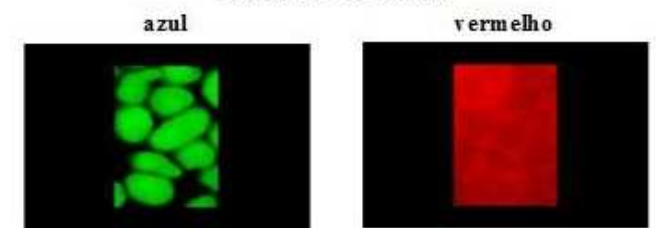
## **Anexo 3**

## Semi-quantificação dos sinais (ADN e PERIOD1)

emitidos pelos núcleos das células Caco-2



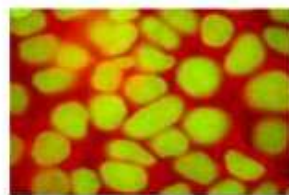
Extração dos canais:



Criação ficheiro em 3 canais no programa *Image J*®:

- 1º canal (vermelho): imagem das proteínas PERIOD1 marcadas pela rodamina, decomposta em vermelho
- 2º canal (verde): imagem do ADN marcado pelo Hoechst® decomposta em azul
- 3º canal (azul): fica "apagado"

Execução da função "Stacks to RGB", com obtenção de uma imagem onde os sinais emitidos pelo *Hoechst*® e pela rodamina sobrepõem-se ao nível dos núcleos, emitindo um sinal amarelo



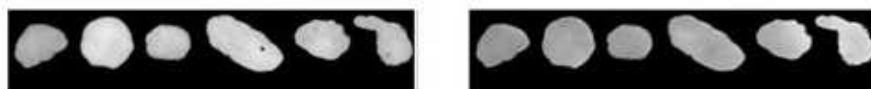
Seleção dos núcleos amarelos e colagem dos mesmos numa imagem de fundo preto



Decomposição da imagem em:

verde

vermelho

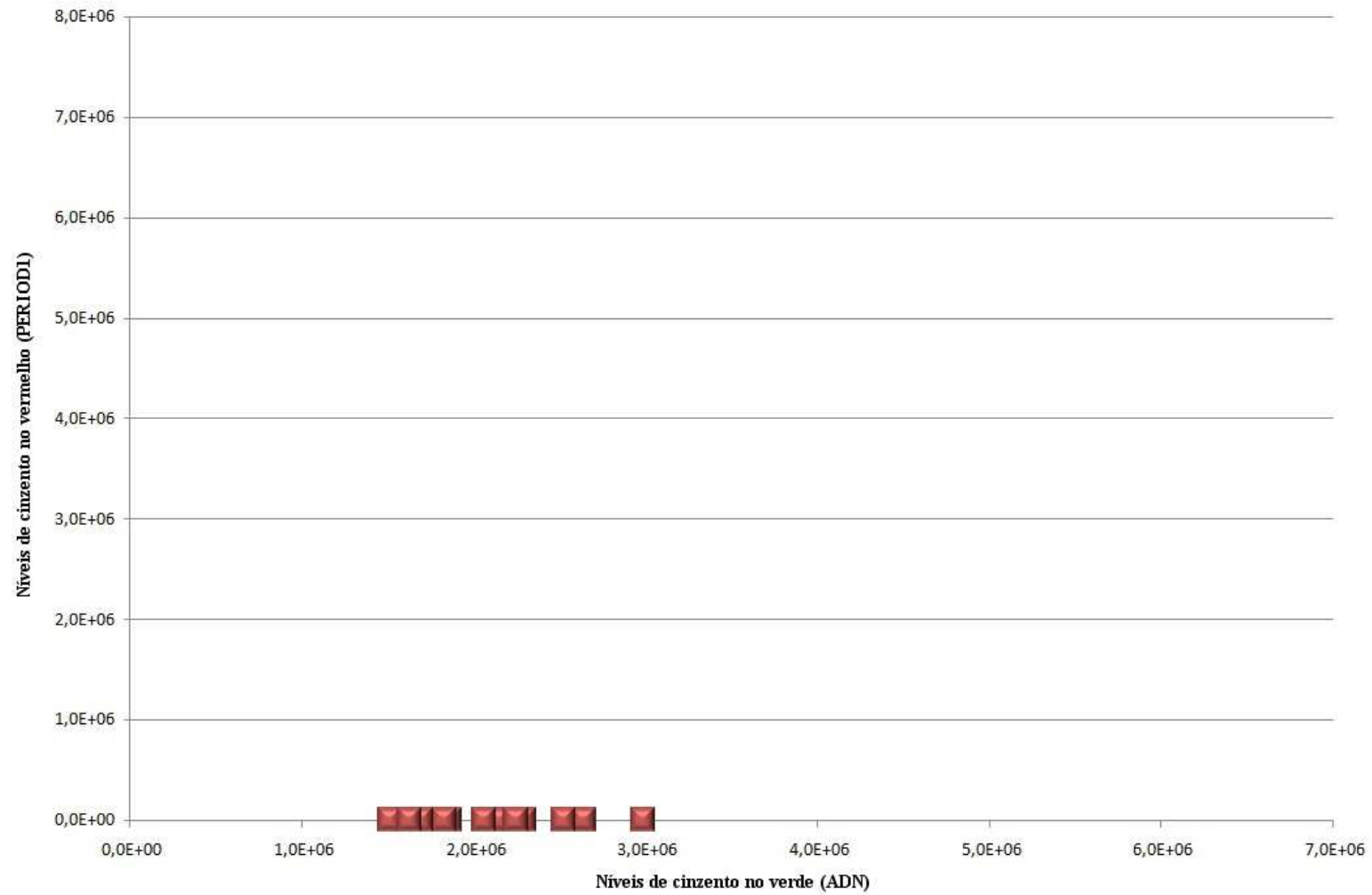


Quantificação dos níveis de cinzento com o programa *Quant3D*®

## **Anexo 4**

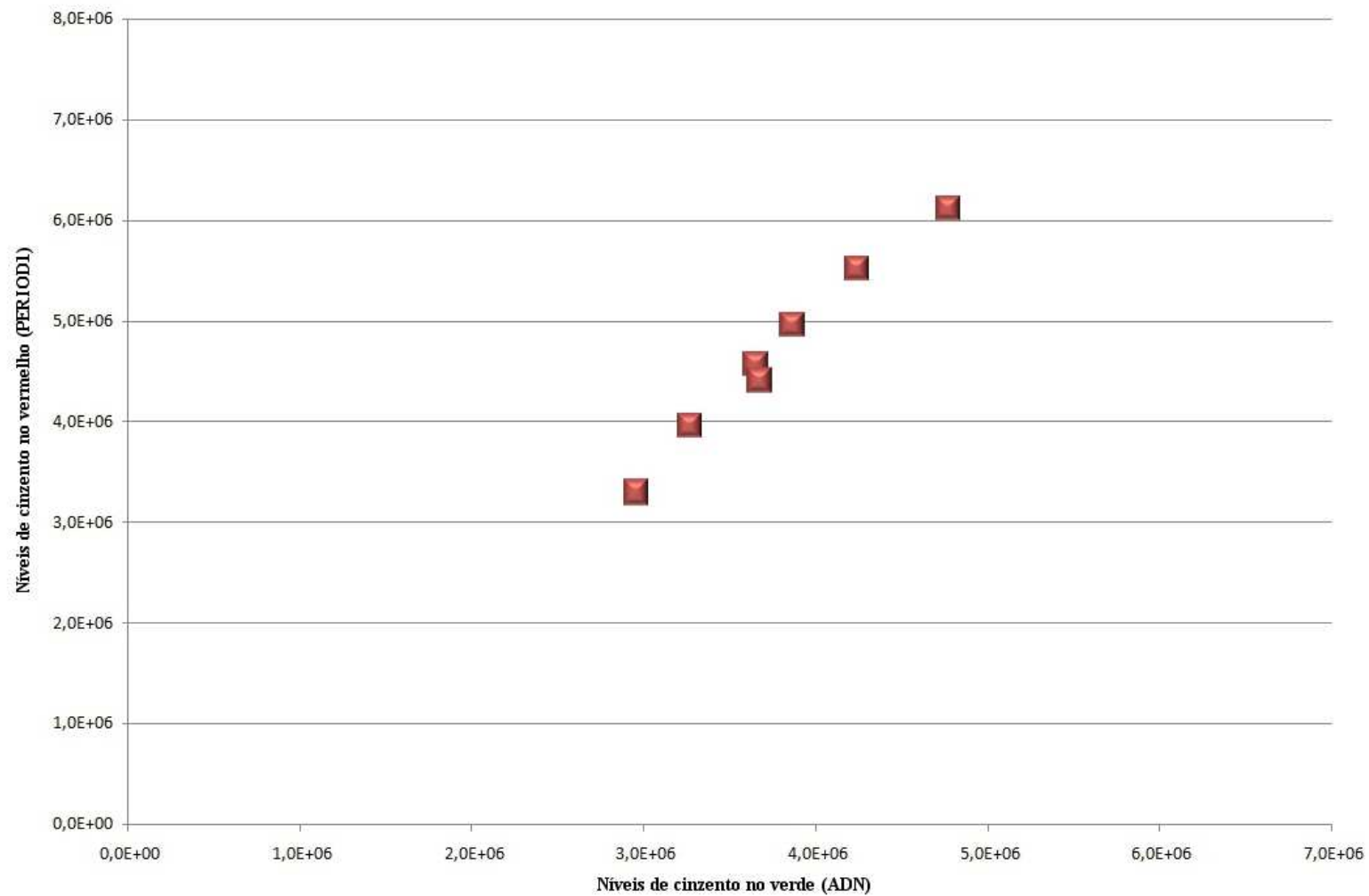
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2 sobre 48h

### ■ Controlo



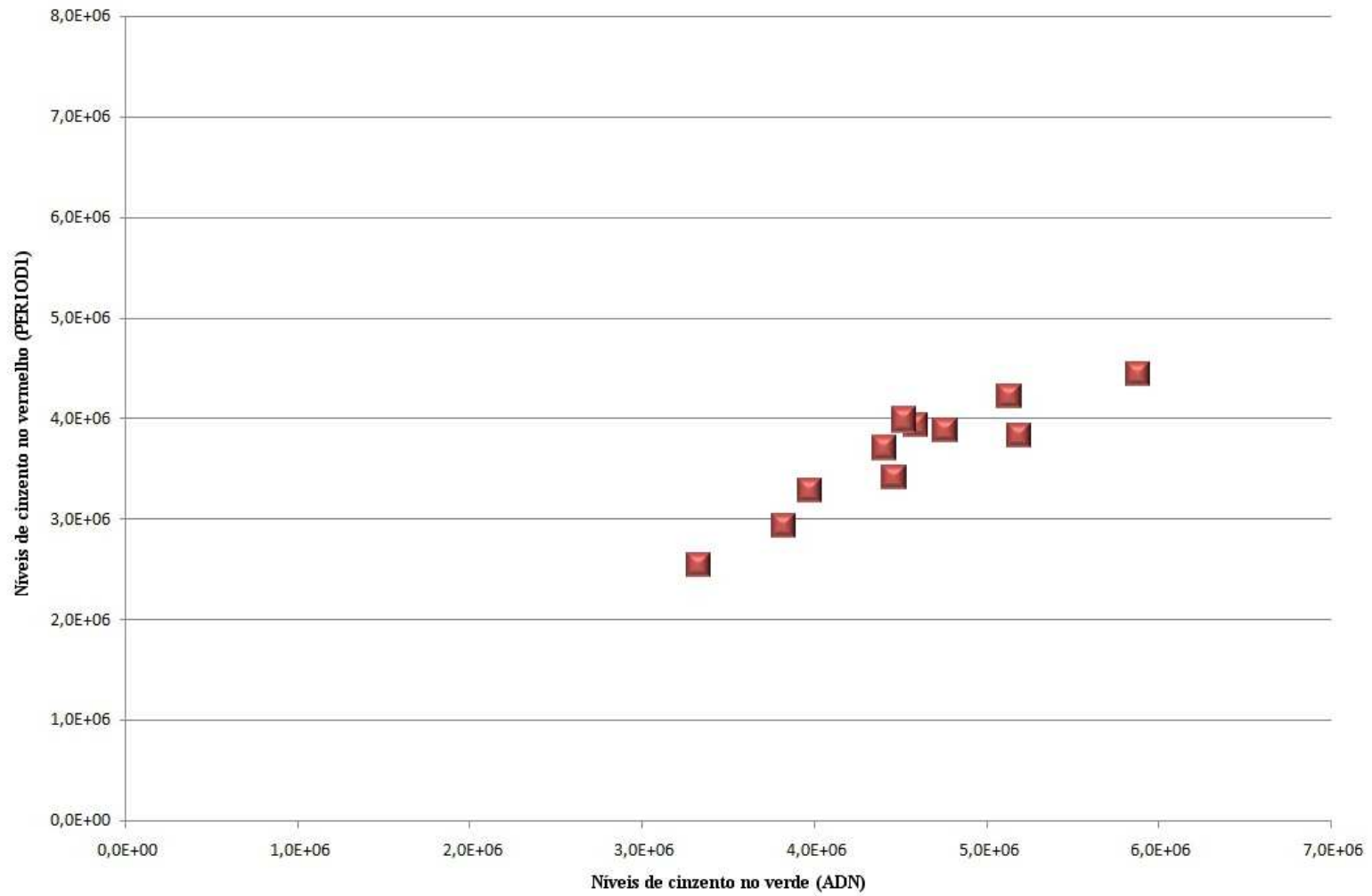
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2 sobre 48h

### ▪ 0h



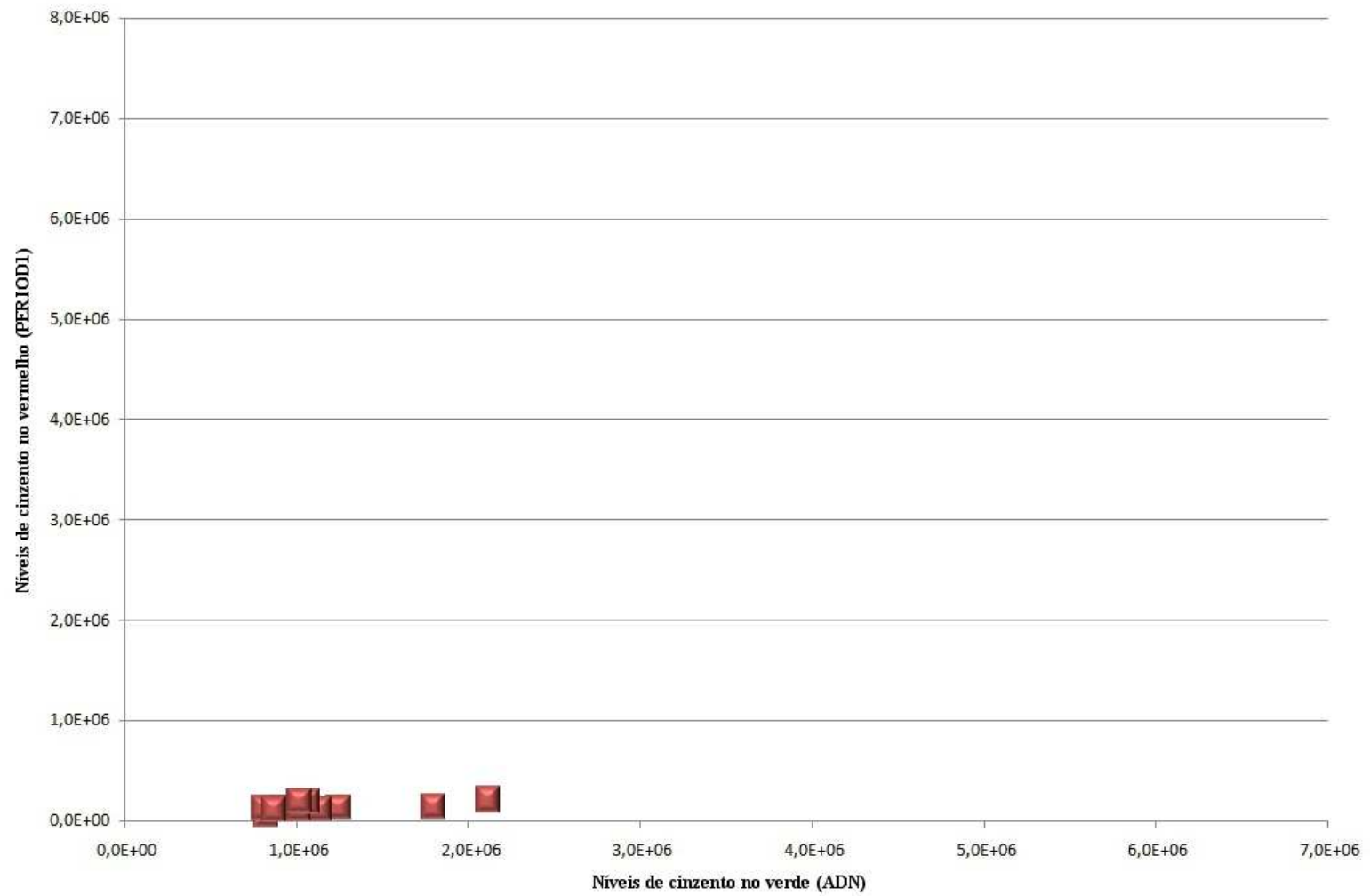
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2 sobre 48h

### ▪ 2h



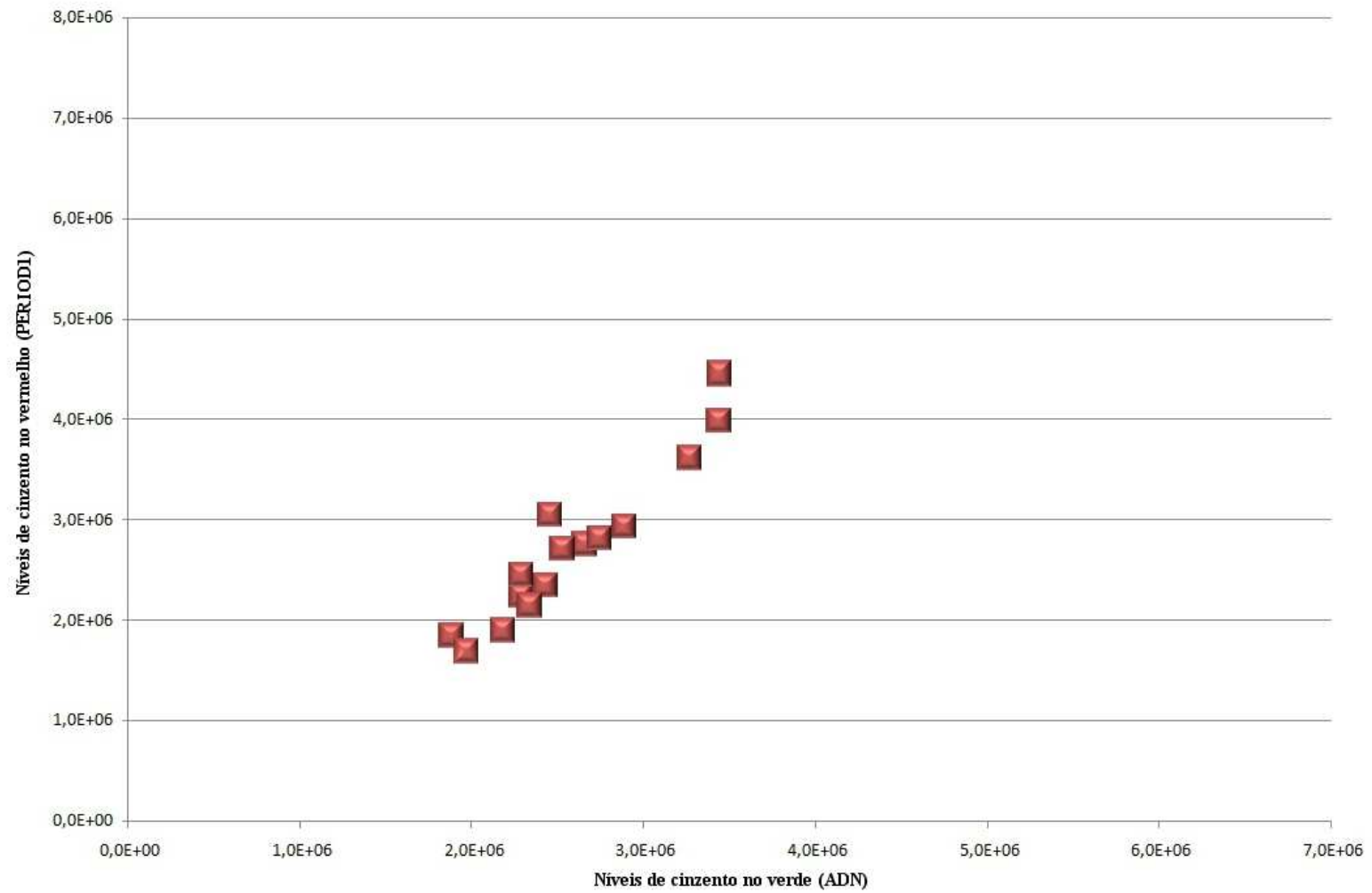
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2 sobre 48h

### ▪ 6h



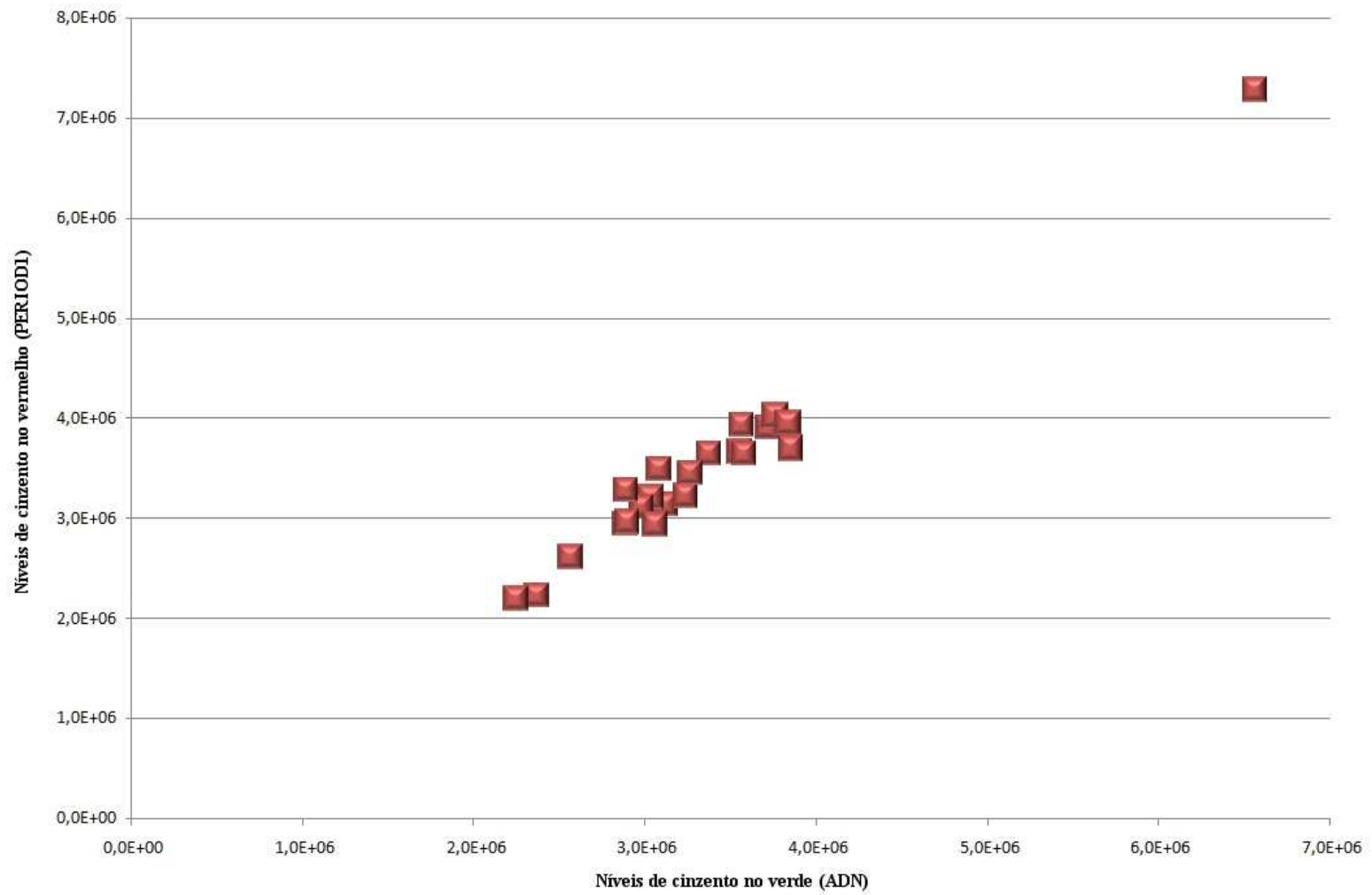
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2 sobre 48h

### ▪ 12h



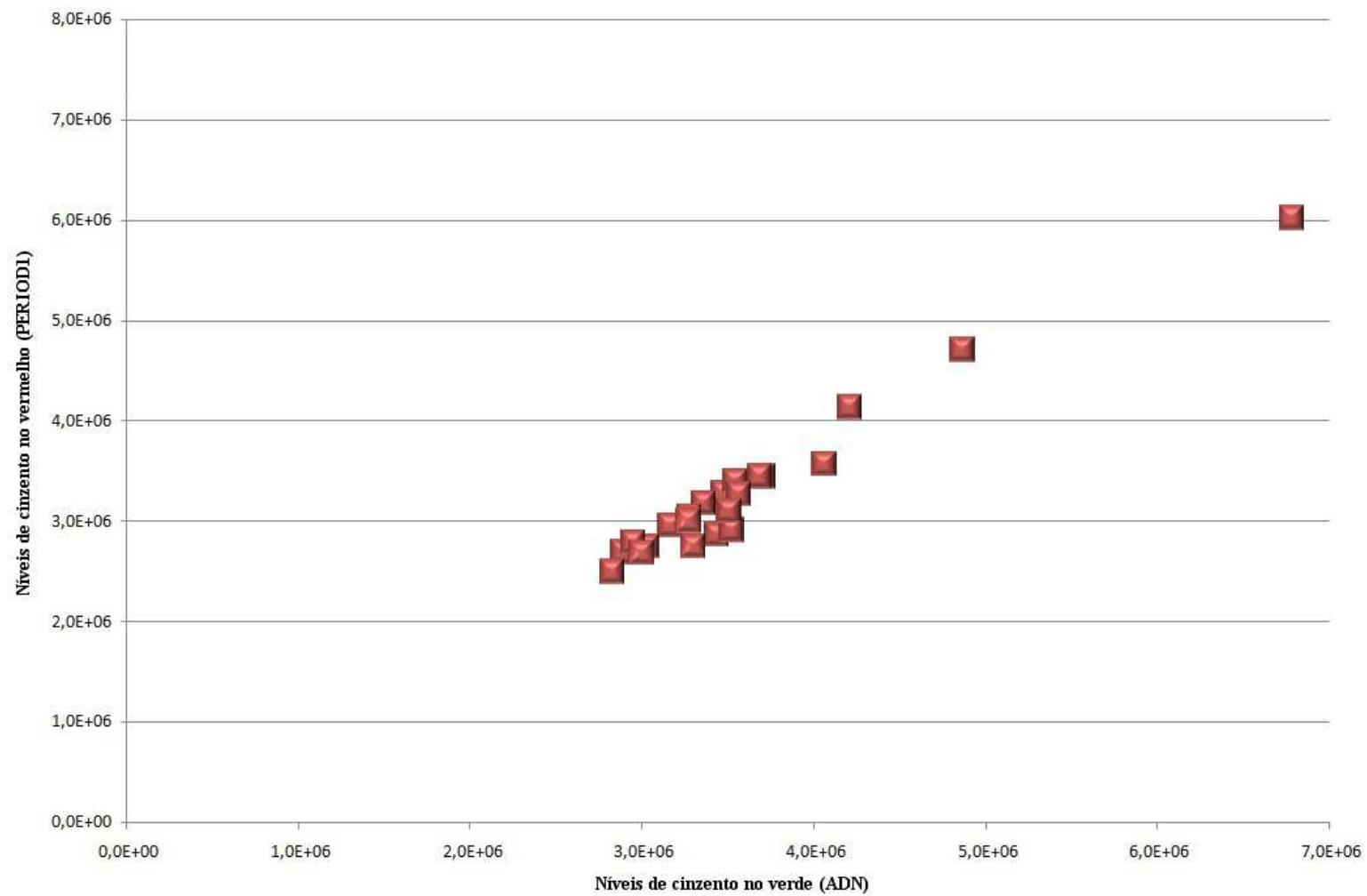
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2 sobre 48h

### ▪ 18h



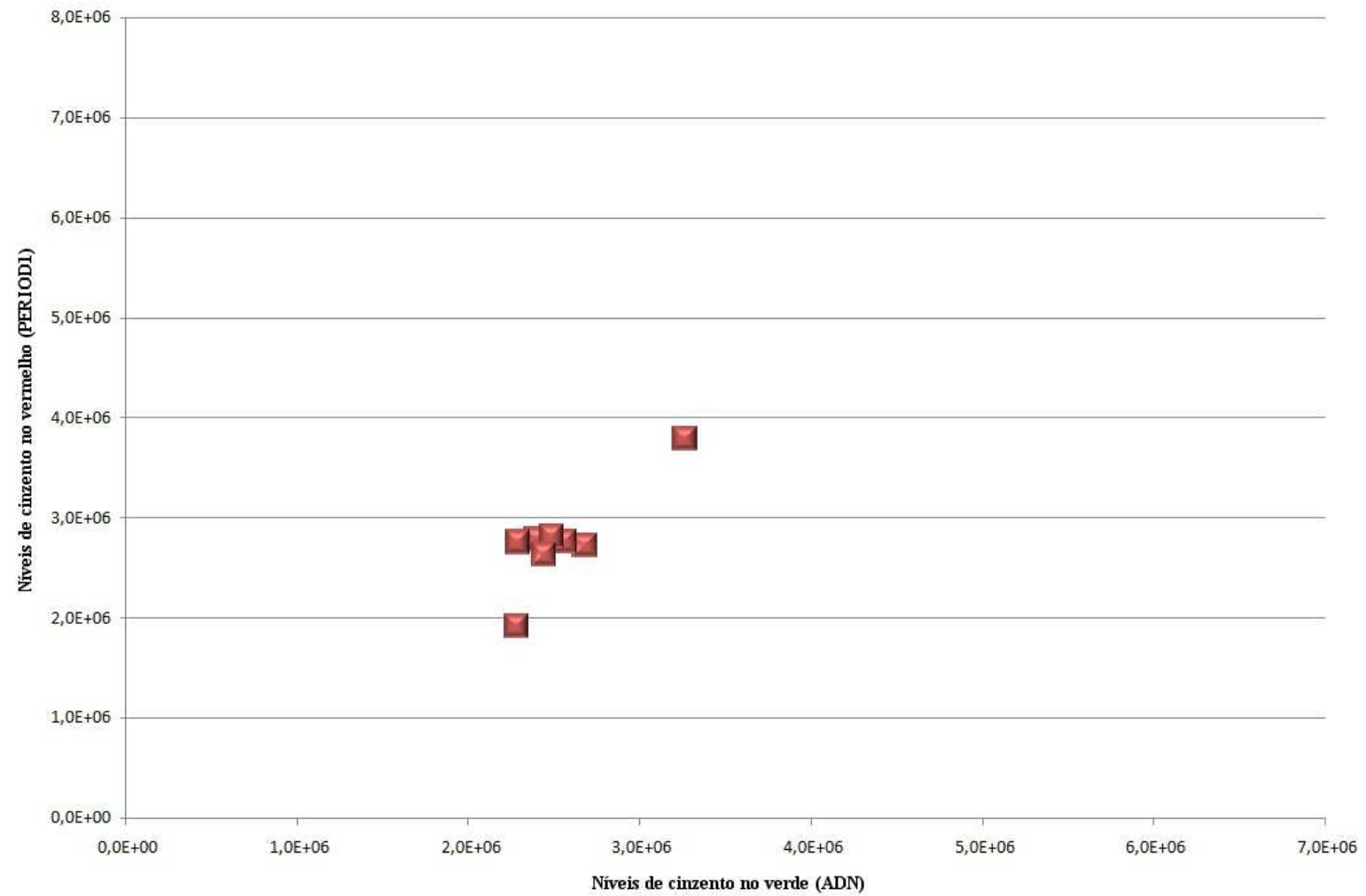
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2 sobre 48h

### ▪ 24h



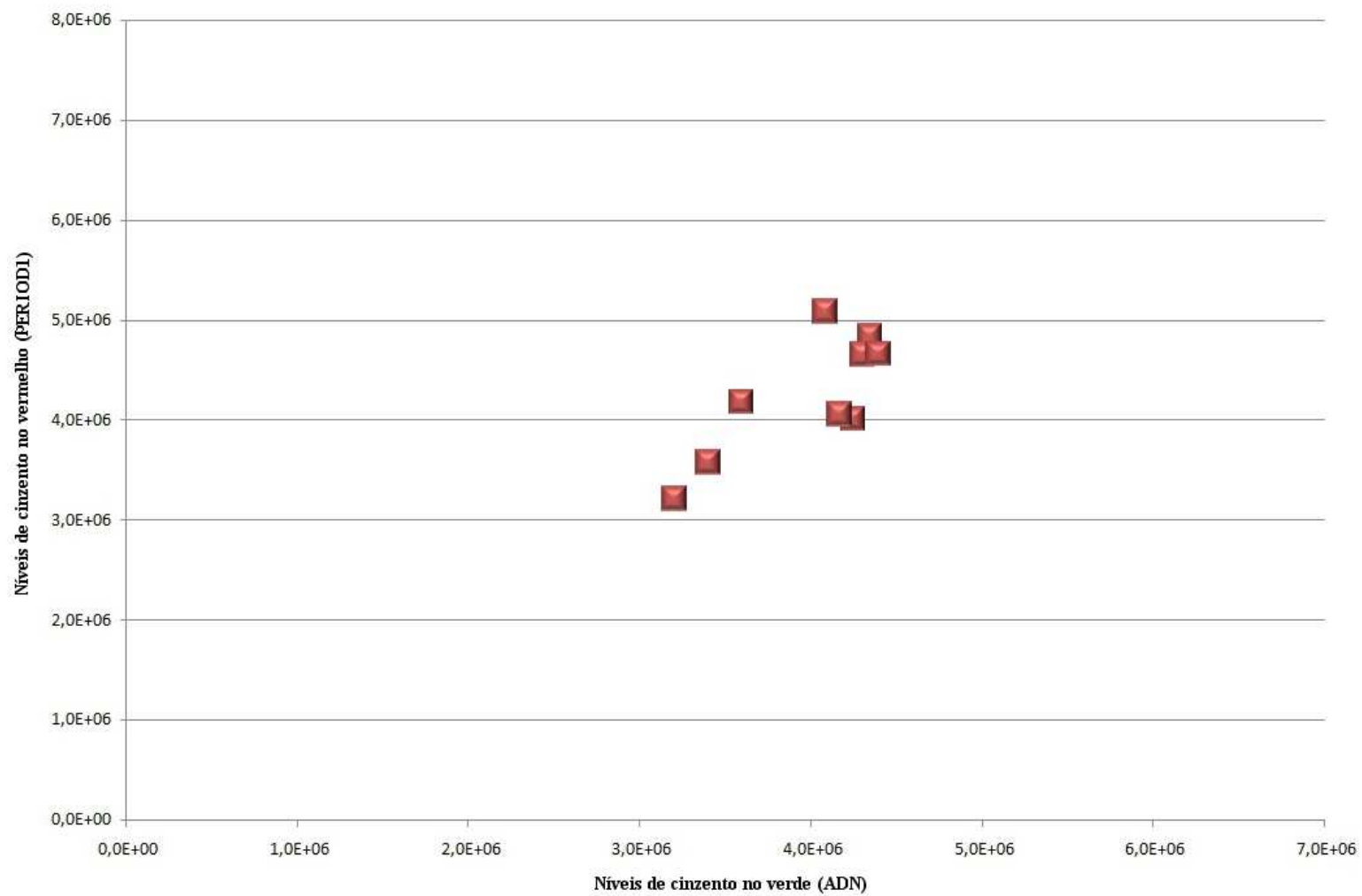
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2 sobre 48h

### ▪ 30h



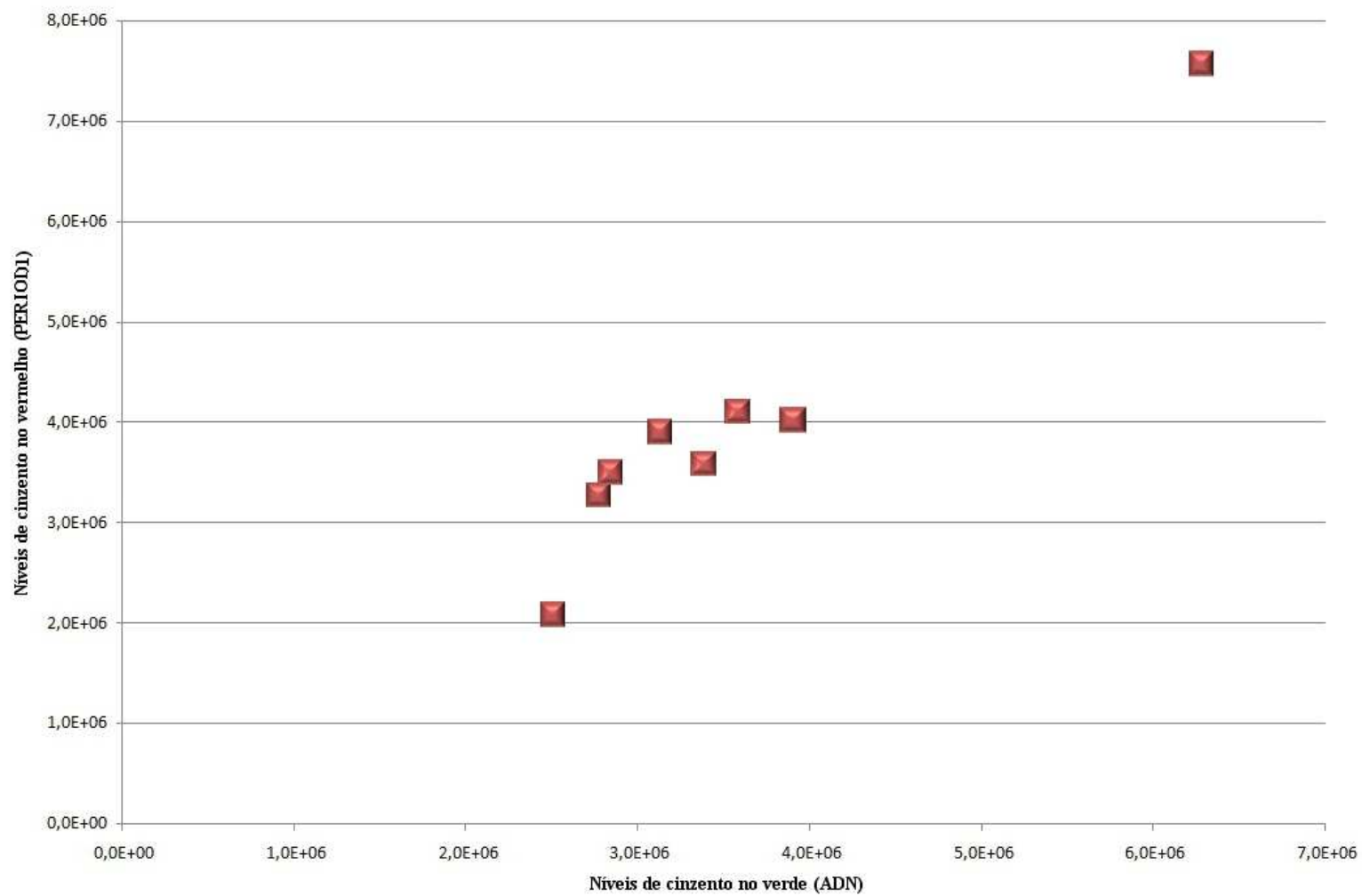
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2 sobre 48h

### ▪ 36h



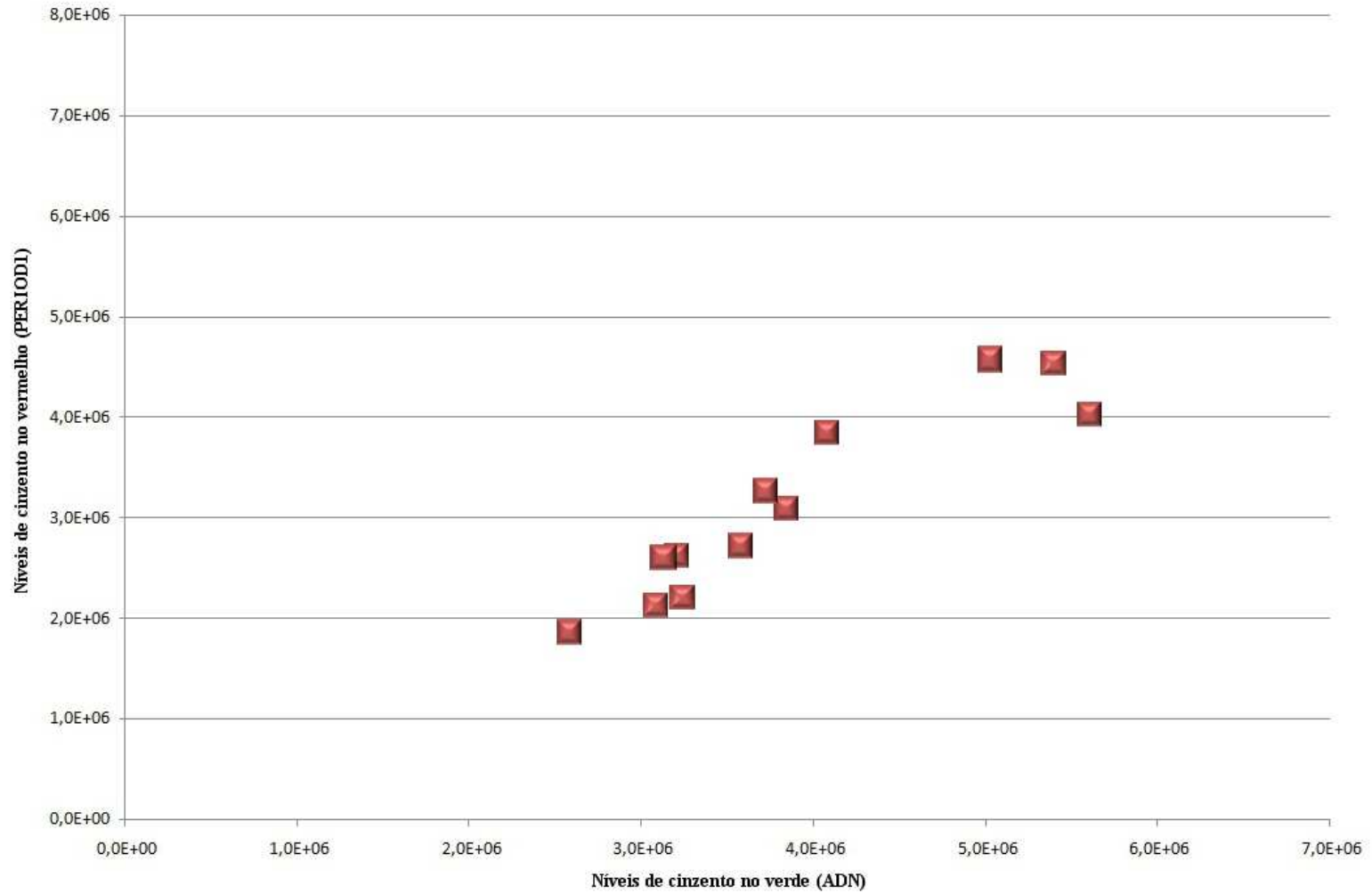
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2 sobre 48h

### ▪ 42h



## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2 sobre 48h

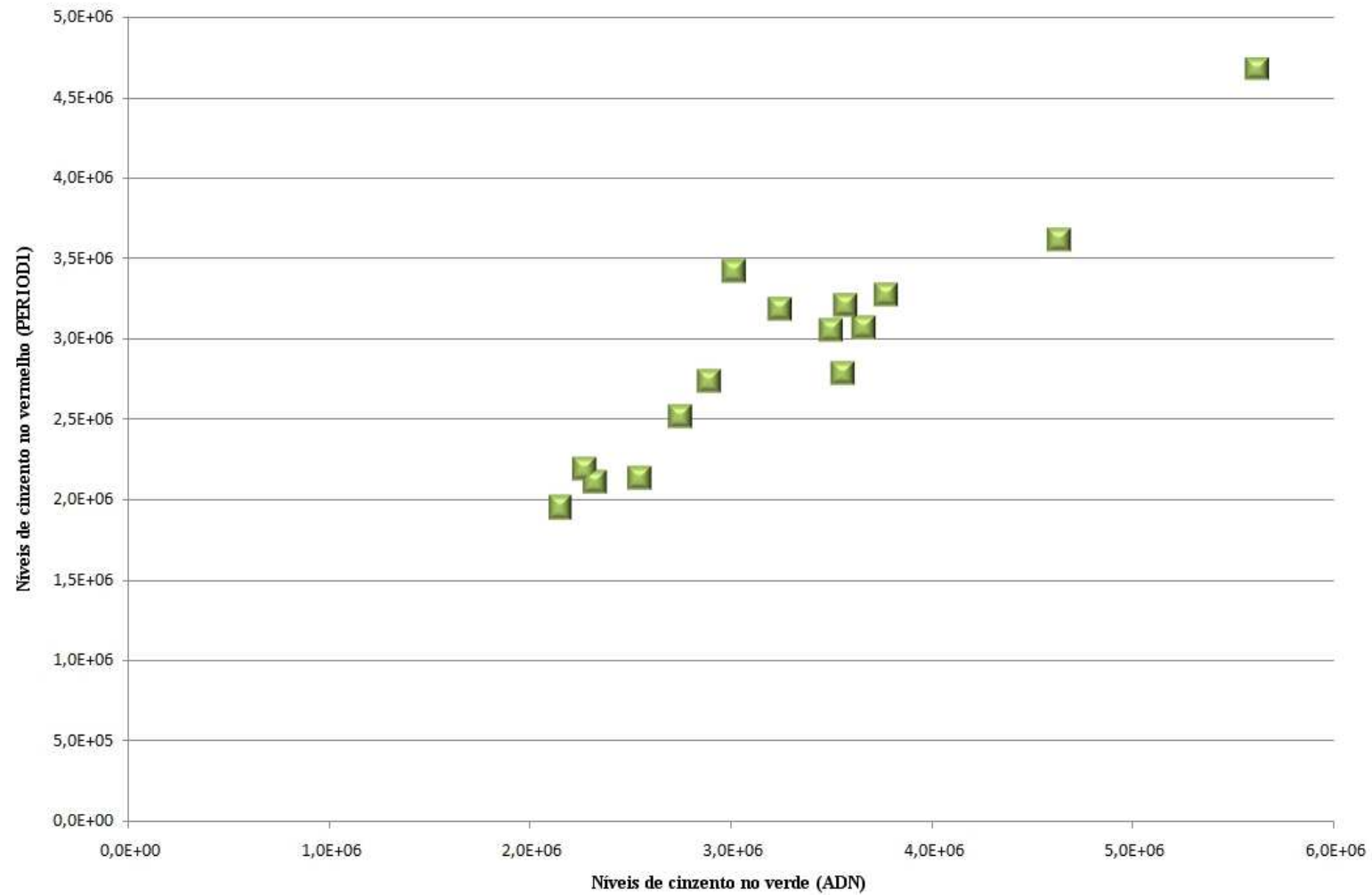
- 48h



# **Anexo 5**

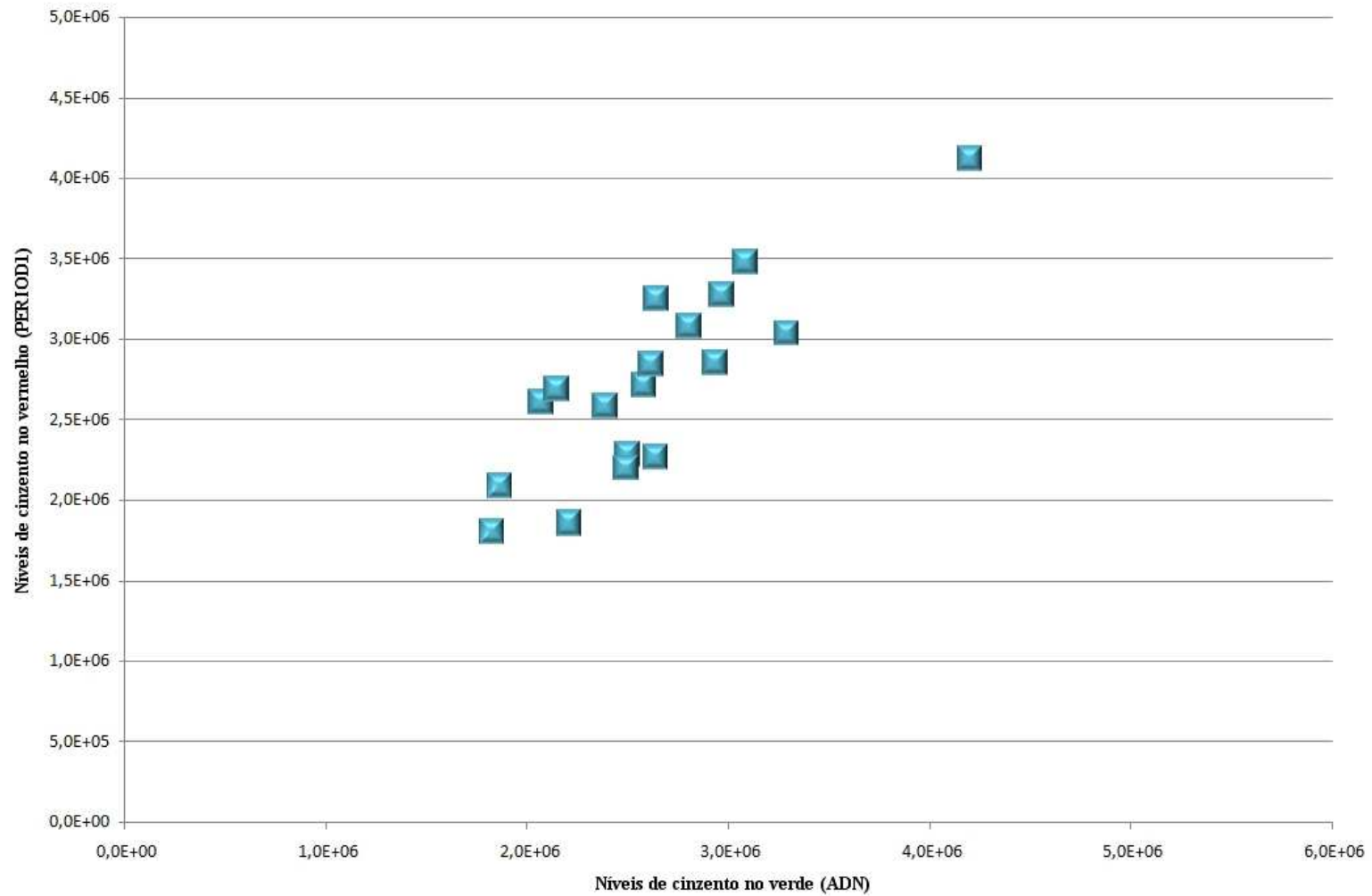
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2

18h após a realização do choque sérico – Meio 10% FCS



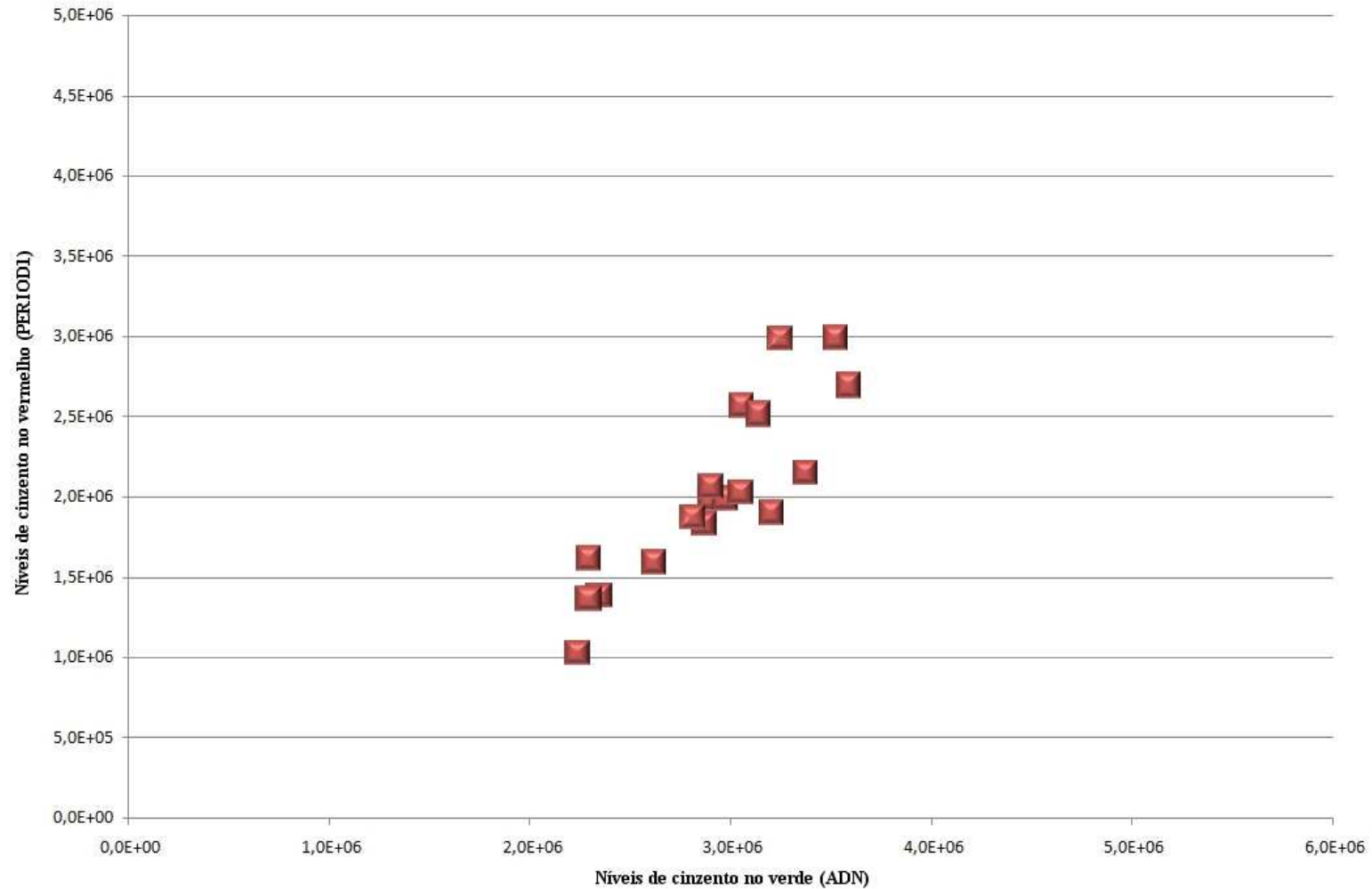
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2

18h após a realização do choque sérico – Meio 1mM ácido butírico



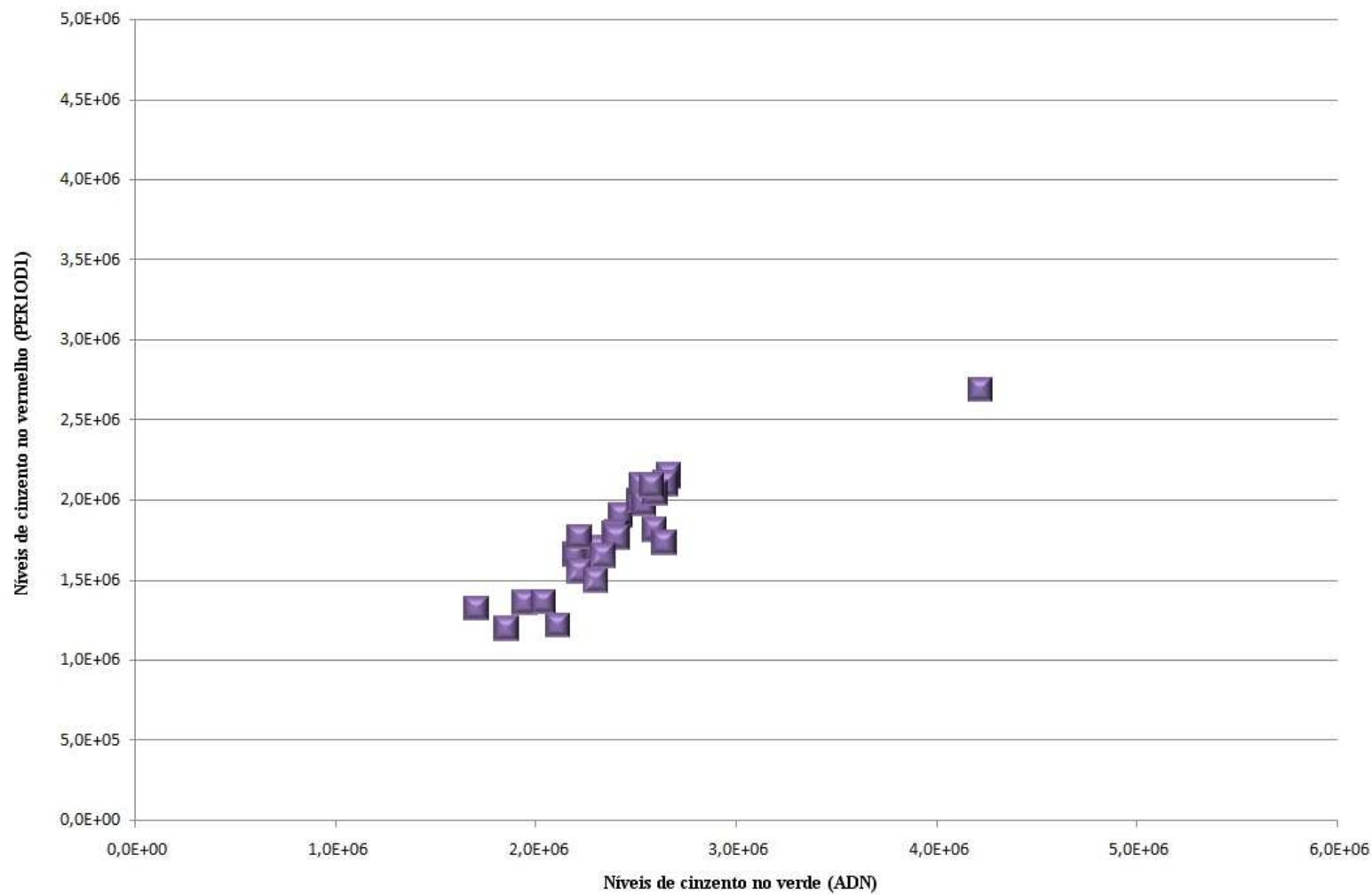
## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2

18h após a realização do choque sérico – Meio 25mM D-glucose



## Semi-quantificação dos sinais emitidos pelos núcleos de células Caco-2

18h após a realização do choque sérico – Meio sem glucose nem ácido butírico



## **Anexo 6**

## Resultados da dosagem do ácido butírico: análise de variância a 2 vias

### ▪ Factores tempo e idade do tapete celular

Para determinar um eventual efeito dos factores tempo e idade do tapete celular sobre o desaparecimento do ácido butírico, realizamos uma análise de variância (ANOVA) a 2 vias.

Classificamos os resultados da dosagem por cromatografia em fase gasosa consoante a dose de ácido butírico colocada inicialmente, uma vez que esta poderá igualmente constituir um factor com influência sobre o desaparecimento do ácido butírico:

- 2mM (Tabela 1);
- 1mM (Tabela 2);
- 0,5mM (Tabela 3);

**Tabela 1: Concentração em ácido butírico remanescente em função do tempo e a idade do tapete celular - Dose inicial: 2mM de ácido butírico**

	3h	22h	27h	46h
5 dias	1,726	1,490	1,412	1,422
	1,736	1,492	1,502	1,364
	1,728	1,264	1,520	1,308
12 dias	1,242	1,266	1,256	0,780
	1,238	1,036	1,346	0,886
	1,390	1,024	1,122	0,886

**Tabela 2: Concentração em ácido butírico remanescente em função do tempo e a idade do tapete celular - Dose inicial: 1mM de ácido butírico**

	3h	22h	27h	46h
<b>5 dias</b>	0,860	0,660	0,636	0,456
	0,858	0,686	0,708	0,512
	0,808	0,462	0,556	0,376
<b>12 dias</b>	0,672	0,534	0,394	0,212
	0,704	0,542	0,462	0,232
	0,660	0,458	0,350	0,090

**Tabela 3: Concentração em ácido butírico remanescente em função do tempo e a idade do tapete celular - Dose inicial: 0,5mM de ácido butírico**

	3h	22h	27h	46h
<b>5 dias</b>	0,462	0,198	0,200	0,038
	0,456	0,210	0,178	0,040
	0,400	0,066	0,090	0,048
<b>12 dias</b>	0,298	0,106	0,106	0,000
	0,316	0,152	0,068	0,000
	0,412	0,042	0,042	0,000

Análise de variância a 2 vias (conforme a dose inicial de ácido butírico)

- Factor tempo (3, 22, 27 e 46h);
- Factor idade do tapete celular (5 ou 12 dias).

**H<sub>0</sub>**: O factor tempo (idade do tapete celular) não tem efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

**vs**

**H<sub>1</sub>**: O factor tempo (idade do tapete celular) tem efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

### Dose inicial = 2mM de ácido butírico

Os resultados da análise de variância realizada encontram-se resumidos na tabela 4.

**Tabela 4: Resultados da Análise de variância – Dose inicial = 2mM de ácido butírico**

RESUMO	Efectivo	Soma	Média	Variância
5 dias	4	6,0500	1,5125	0,021460
5 dias	4	6,0940	1,5235	0,024017
5 dias	4	5,8200	1,4550	0,045615
12 dias	4	4,5440	1,1360	0,056424
12 dias	4	4,5060	1,1265	0,042214
12 dias	4	4,4220	1,1055	0,045345
3h	6	9,0600	1,5100	0,061093
22h	6	7,5720	1,2620	0,042525
27h	6	8,1580	1,3597	0,023225
46h	6	6,6460	1,1077	0,082057

#### ANOVA

Fonte de variação	SS	df	MS	F	Valor P	F crítico
Linhas	0,85352733	5	0,17070547	13,40848172	0,00004363	2,90129454
Colunas	0,51425667	3	0,17141889	13,46451924	0,00015709	3,28738210
Erro	0,19096733	15	0,01273115			
Total	1,55875133	23				

No que diz respeito ao factor tempo, sendo o F calculado (13,41) superior ao F crítico (2,90), rejeita-se a hipótese nula. O valor de P, por ser inferior a 0,05, indica também que se deve rejeitar essa hipótese. O tempo decorrido tem assim, de facto, um efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

No que diz respeito ao factor idade do tapete, sendo o F calculado (13,46) superior ao F crítico (3,29), rejeita-se a hipótese nula. O valor de P, por ser inferior a 0,05, indica também que se deve rejeitar essa hipótese. A idade do tapete celular tem assim igualmente um efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

### Dose inicial = 1mM de ácido butírico

Os resultados da análise de variância realizada encontram-se resumidos na tabela 5.

**Tabela 5: Resultados da Análise de variância – Dose inicial = 1mM de ácido butírico**

RESUMO	Efectivo	Soma	Média	Variância
5 dias	4	2,6120	0,6530	0,027332
5 dias	4	2,7640	0,6910	0,020081
5 dias	4	2,2020	0,5505	0,034873
12 dias	4	1,8120	0,4530	0,038695
12 dias	4	1,9400	0,4850	0,038583
12 dias	4	1,5580	0,3895	0,056374
3h	6	4,5620	0,7603	0,008557
22h	6	3,3420	0,5570	0,009366
27h	6	3,1060	0,5177	0,019641
46h	6	1,8780	0,3130	0,026102

ANOVA
-------

Fonte de variação	SS	df	MS	F	Valor P	F crítico
Linhas	0,27548200	5	0,05509640	19,28755465	0,0000047266	2,90129454
Colunas	0,60496533	3	0,20165511	70,59325067	0,0000000045	3,28738210
Erro	0,04284867	15	0,00285658			
Total	0,92329600	23				

No que diz respeito ao factor tempo, sendo o F calculado (19,29) superior ao F crítico (2,90), rejeita-se a hipótese nula. O valor de P, por ser inferior a 0,05, indica também que se deve rejeitar essa hipótese. O tempo decorrido tem assim, de facto, um efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

No que diz respeito ao factor idade do tapete, sendo o F calculado (70,59) superior ao F crítico (3,29), rejeita-se a hipótese nula. O valor de P, por ser inferior a 0,05, indica também que se deve rejeitar essa hipótese. A idade do tapete celular tem assim igualmente um efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

### Dose inicial = 0,5mM de ácido butírico

Os resultados da análise de variância realizada encontram-se resumidos na tabela 6.

**Tabela 6: Resultados da Análise de variância – Dose inicial = 0,5mM de ácido butírico**

RESUMO	Efectivo	Soma	Média	Variância
5 dias	4	0,8980	0,2245	0,030830
5 dias	4	0,8840	0,2210	0,029985
5 dias	4	0,6040	0,1510	0,027852
12 dias	4	0,5100	0,1275	0,015417
12 dias	4	0,5360	0,1340	0,018587
12 dias	4	0,4960	0,1240	0,037256

3h	6	2,3440	0,3907	0,004812
22h	6	0,7740	0,1290	0,004784
27h	6	0,6840	0,1140	0,003886
46h	6	0,1260	0,0210	0,000540

#### ANOVA

Fonte de variação	SS	df	MS	F	Valor P	F crítico
Linhas	0,04363933	5	0,00872787	4,94515374	0,0071312225	2,90129454
Colunas	0,45330800	3	0,15110267	85,61380978	0,0000000012	3,28738210
Erro	0,02647400	15	0,00176493			
Total	0,52342133	23				

No que diz respeito ao factor tempo, sendo o F calculado (4,95) superior ao F crítico (2,90), rejeita-se a hipótese nula. O valor de P, por ser inferior a 0,05, indica também que se deve rejeitar essa hipótese. O tempo decorrido tem assim, de facto, um efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

No que diz respeito ao factor idade do tapete,, sendo o F calculado (85,61) superior ao F crítico (3,29), rejeita-se a hipótese nula. O valor de P, por ser muito inferior a 0,05, indica também que se deve rejeitar essa hipótese. A idade do tapete celular tem assim igualmente um efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

## **Anexo 7**

## Resultados da dosagem do ácido butírico: análise de variância a 2 vias

### ▪ Factores tempo e dose de ácido butírico

Para determinar um eventual efeito dos factores tempo e dose de ácido butírico sobre o desaparecimento do ácido butírico, realizamos uma análise de variância (ANOVA) a 2 vias.

Classificamos os resultados da dosagem por cromatografia em fase gasosa consoante a idade do tapete celular, uma vez que esta poderá igualmente constituir um factor com influência sobre o desaparecimento do ácido butírico:

- 5 dias (Tabela 1);
- 12 dias (Tabela 2);

**Tabela 1: Concentração em ácido butírico remanescente em função do tempo e a dose de ácido butírico depositada inicialmente em tapetes celulares de 5 dias**

	3h	22h	27h	46h
2mM	1,726	1,490	1,412	1,422
	1,736	1,492	1,502	1,364
	1,728	1,264	1,520	1,308
1mM	0,860	0,660	0,636	0,456
	0,858	0,686	0,708	0,512
	0,808	0,462	0,556	0,376
0,5mM	0,462	0,198	0,200	0,038
	0,456	0,210	0,178	0,400
	0,400	0,066	0,090	0,048

**Tabela 2: Concentração em ácido butírico remanescente em função do tempo e a dose de ácido butírico depositada inicialmente em tapetes celulares de 12 dias**

	3h	22h	27h	46h	51h
<b>2mM</b>	1,242	1,266	1,256	0,780	0,674
	1,238	1,036	1,346	0,886	0,780
	1,390	1,024	1,122	0,886	0,702
<b>1mM</b>	0,672	0,534	0,394	0,212	0,148
	0,704	0,542	0,462	0,232	0,160
	0,660	0,458	0,350	0,090	0,000
<b>0,5mM</b>	0,298	0,106	0,106	0,000	0,000
	0,316	0,152	0,068	0,000	0,000
	0,412	0,042	0,042	0,000	0,000

Análise de variância a 2 vias (conforme a idade do tapete celular)

- Factor tempo (3, 22, 27 e 46h);
- Factor dose inicial de ácido butírico (2, 1 ou 0,5mM).

**H<sub>0</sub>**: O factor tempo (dose inicial de ácido butírico) não tem efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

**vs**

**H<sub>1</sub>**: O factor tempo (dose inicial de ácido butírico) tem efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

### Idade do tapete celular = 5 dias

Os resultados da análise de variância realizada encontram-se resumidos na tabela 3.

**Tabela 3: Resultados da Análise de variância – Idade do tapete celular = 5 dias**

RESUMO	Efectivo	Soma	Média	Variância
2mM	4	6,0500	1,5125	0,021460
2mM	4	6,0940	1,5235	0,024017
2mM	4	5,8200	1,4550	0,045615
1mM	4	2,6120	0,6530	0,027332
1mM	4	2,7640	0,6910	0,020081
1mM	4	2,2020	0,5505	0,034873
0,5mM	4	0,8980	0,2245	0,030830
0,5mM	4	0,8840	0,2210	0,029985
0,5mM	4	0,6040	0,1510	0,027852
3h	9	9,0340	1,0038	0,327579
22h	9	6,5280	0,7253	0,314523
27h	9	6,8020	0,7558	0,339253
46h	9	5,5640	0,6182	0,346307

#### ANOVA

Fonte de variação	SS	df	MS	F	Valor P	F crítico
Linhas	10,55294222	8	1,31911778	463,08906514	2,26E-24	2,35508149
Colunas	0,71777156	3	0,23925719	83,99355090	7,22E-13	3,00878657
Erro	0,06836444	24	0,00284852			
Total	11,33907822	35				

No que diz respeito ao factor tempo, sendo o F calculado (463,09) superior ao F crítico (2,35), rejeita-se a hipótese nula. O valor de P, por ser inferior a 0,05, indica também que se deve rejeitar essa hipótese. O tempo decorrido tem assim, de facto, um efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

No que diz respeito ao factor dose inicial de ácido butírico, sendo o F calculado (83,99) superior ao F crítico (3,01), rejeita-se a hipótese nula. O valor de P, por ser inferior a

0,05, indica também que se deve rejeitar essa hipótese. A dose inicial de ácido butírico depositada no tapete celular tem assim igualmente um efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

### **Idade do tapete celular = 12 dias**

Os resultados da análise de variância realizada encontram-se resumidos na tabela 4.

**Tabela 4: Resultados da Análise de variância – Idade do tapete celular = 12 dias**

RESUMO	Efectivo	Soma	Média	Variância
2mM	4	5,2180	1,0436	0,085007
2mM	4	5,2860	1,0572	0,055673
2mM	4	5,1240	1,0248	0,066571
1mM	4	1,9600	0,3920	0,047626
1mM	4	2,1000	0,4200	0,050062
1mM	4	1,5580	0,3116	0,072623
0,5mM	4	0,5100	0,1020	0,014814
0,5mM	4	0,5360	0,1072	0,017531
0,5mM	4	0,4960	0,0992	0,031017
3h	9	6,9320	0,7702	0,176166
22h	9	5,1600	0,5733	0,198877
27h	9	5,1460	0,5718	0,276821
46h	9	3,0860	0,3429	0,153388
51h	9	2,4640	0,2738	0,116049

### **ANOVA**

Fonte de variação	SS	df	MS	F	Valor P	F crítico
Linhas	7,03957120	8	0,87994640	85,10933885	2,31E-19	2,24439614
Colunas	1,43284924	4	0,35821231	34,64667049	3,29E-11	2,66843694
Erro	0,33084836	32	0,01033901			
Total	8,80326880	44				

No que diz respeito ao factor tempo, sendo o F calculado (85,11) superior ao F crítico (2,24), rejeita-se a hipótese nula. O valor de P, por ser inferior a 0,05, indica também que se deve rejeitar essa hipótese. O tempo decorrido tem assim, de facto, um efeito

sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

No que diz respeito ao factor dose inicial de ácido butírico, sendo o F calculado (34,65) superior ao F crítico (2,67), rejeita-se a hipótese nula. O valor de P, por ser inferior a 0,05, indica também que se deve rejeitar essa hipótese. A dose inicial de ácido butírico depositada no tapete celular tem assim igualmente um efeito sobre a quantidade de ácido butírico que desaparece.

