

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA NAS ENGRENAGENS DO RELÓGIO CIRCADIANO DE MAMÍFEROS

Erika Cecon*, Danilo Eugênio de França Laurindo Flôres

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, USP
Recebido 19out09 / Aceito 14jan10 / Publicação inicial 15abr10
*erika.cecon@usp.br

Resumo. A manifestação de ritmos biológicos nos mais diversos organismos é reconhecida desde a antiguidade, mas os princípios básicos responsáveis por sua geração começaram a ser desvendados somente no século passado, e continuam até os dias atuais. Nesse contexto, um grande marco foi a descoberta de uma rede de genes cujos processos de transcrição e tradução são regulados entre si e que constituem a maquinaria básica do sistema oscilatório endógeno. Esta revisão visa descrever o funcionamento desta maquinaria em mamíferos, detalhando seus atuais componentes e como isso se propaga para todo o organismo.

Palavras-chave. Ritmo circadiano, regulação gênica, núcleos supraquiasmáticos, genes relógios.

REGULATION OF GENE EXPRESSION IN THE MAMMALIAN CIRCADIAN CLOCKWORK

Abstract. The expression of biological rhythms in most organisms is recognized since antiquity, but the basic principles responsible for their generation have only been unraveled from the last century on. In this context, a great mark was the discovery of a net of genes whose transcription and translation processes are regulated between each other and constitute the basic machinery of the endogenous oscillatory system. This review aim to describe how this machinery works in mammals, detailing its current components, and how it is propagated all over the organism.

Keywords. Circadian rhythm, gene regulation, suprachiasmatic nuclei, clock genes

Introdução à cronobiologia

Todos os seres vivos apresentam variações rítmicas em sua fisiologia e comportamento: os **ritmos biológicos**. Muitos desses ritmos são importantes adaptações temporais a ciclos ambientais da natureza.

Os **ritmos diários** são os mais bem estudados dentro da cronobiologia (Moore-Ede e col., 1982) e, ao contrário do que se acreditava inicialmente, a maioria deles não é uma mera reação às variáveis ambientais diárias. Ritmos como de atividade/repouso de animais ou abertura e fechamento de folíolos em algumas plantas, continuam a ocorrer mesmo quando esses organismos são transferidos para locais sem variação nas condições ambientais, ou seja, em condições de iluminação, temperatura e umidade constantes (Marques e col., 2003). Acredita-se que a **endogenicidade** dos ritmos permitiria antecipação fisiológica aos ciclos da natureza, garantindo, por exemplo, que um animal diurno já esteja fisiologicamente preparado para acordar um pouco antes do nascer do sol (Enright, 1970).

Curiosamente, os ritmos diários, quando livres de referências ambientais temporais, possuem um período próprio levemente diferente de 24 horas, por isso são chamados **circadianos** (do Latim: *circa* = “cerca de”; *dien* = “dia”). Nessas condições em que o ritmo circadiano expressa seu período próprio, diz-se que está em **livre-curso**.

Com base nos fatos apresentados sobre a endogenicidade dos ritmos biológicos, foi idealizada a existência de um **relógio biológico** circadiano, de período intrínseco próximo de 24 horas. Esse relógio (**marca-passo** ou **oscilador**) deveria ser capaz de sincronizar-se com as 24 horas do dia externo por um processo denominado **arrastamento**. A sincronização com o ambiente é um requisito fundamental para a sobrevivência de muitas espécies, garantindo que processos importantes como forrageamento e acasalamento aconteçam no momento mais adequado do dia. Os ciclos ambientais responsáveis por arrastar o relógio endógeno são chamados de **Zeitgeber** (doadores de tempo) ou agentes arrastadores. Para a maioria das espécies estudadas, o **Zeitgeber** mais importante dos ritmos circadianos é a variação diária de claridade e escuridão (**ciclo claro-escuro ambiental**) (Moore-Ede e col., 1982).

A figura 1 apresenta um esquema do funcionamento do sistema circadiano. A informação dos ciclos ambientais é levada ao relógio endógeno por vias aferentes. O relógio, uma vez sincronizado, passa a informação para o resto do organismo por vias eferentes, gerando ritmos biológicos sincronizados em sua fisiologia geral. Quando o relógio é deixado em condições ambientais constantes, passa a expressar seu período próprio, e os ritmos por ele controlados entram em livre-curso.

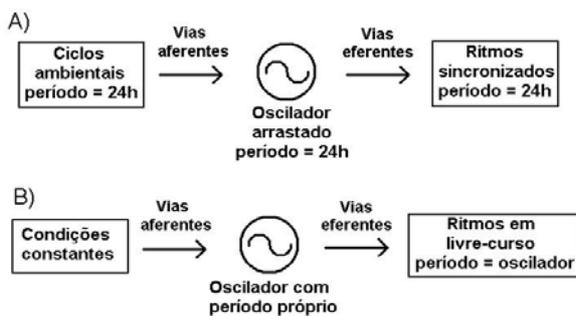


Figura 1 – Modelo de funcionamento do sistema circadiano. A) Sistema sincronizado por ciclos ambientais. B) Sistema em livre-curso.

Alguns grupos de pesquisa foram aos poucos desvendando as bases anatômicas e fisiológicas do sistema circadiano. Em mamíferos, o marca-passo que controla o ritmo de atividade-reposo está localizado nos **núcleos supraquiasmáticos (NSQs)**: um conjunto de aproximadamente 20 mil neurônios do hipotálamo. Os NSQs recebem informações do ciclo claro-escuro a partir de uma via aferente que os comunica com as retinas. As vias eferentes são tanto nervosas como humorais.

Em outros vertebrados, a glândula pineal e a retina podem atuar junto com os NSQs como marca-passos (Golombek e Aguilar-Roblero, 2003). Em plantas, não foi possível identificar a existência de um marca-passo centralizado e, aparentemente, existem vários osciladores redundantes em um único indivíduo (Marques, 2003).

Análises mais aprofundadas demonstraram que, na verdade, mesmo em mamíferos existem **osciladores periféricos** além do marca-passo central (Yamazaki e col., 2000), que atuam de forma sincronizada com o oscilador central, mas em determinadas condições podem ser sincronizados por outros *Zeitgebers*.

Cronobiologia molecular

Com as bases anatômicas mais ou menos definidas em mamíferos, surgiu inevitavelmente a questão sobre qual variável dentro dos núcleos supraquiasmáticos seria o verdadeiro marca-passo. Inicialmente, foi observado que o órgão como um todo tem um ritmo circadiano de pulsos elétricos. Estudos com neurônios mostraram que cada neurônio dos NSQs é um oscilador individual e o ritmo final do órgão corresponde ao **ritmo emergente** da interação entre todos esses neurônios (Welsh e col., 1995).

Na busca pelos mecanismos celulares de geração do ritmo em cada neurônio, foi levantada a hipótese de que haveria uma **oscilação molecular**. Assim, na visão mais reducionista, o relógio seria resultante de moléculas que interagiriam entre si gerando uma oscilação auto-sustentável. De alguma forma a oscilação deveria responder a estímulos aferentes para se

sincronizar e, ao mesmo tempo, deveria emitir sinais eferentes para levar a informação para o resto do organismo.

A hipótese do relógio molecular foi inicialmente investigada em outros organismos não-mamíferos. Estudos preliminares utilizaram principalmente a mosca *Drosophila melanogaster* e o fungo *Neurospora crassa*, pelo vasto conhecimento que se tinha sobre sua genética e biologia molecular. O trabalho de Konopka e Benzer (1971) foi o primeiro a demonstrar o caráter genético dos ritmos endógenos em seus estudos com *Drosophila melanogaster* mutantes. Após avanços nos estudos com outras espécies (ex: cianobactéria *Synechococcus* e o camundongo *Mus musculus*), foi proposto um modelo geral de funcionamento do relógio molecular por **alças de retroalimentação negativa**, detalhadas a seguir (Dunlap, 1999).

De modo simplificado, o modelo é baseado em processos de transcrição, tradução, e interações proteína-proteína e proteína-DNA. Elementos positivos estimulam a transcrição de genes do relógio. Após transcrição e tradução, as proteínas codificadas por esses genes entram no núcleo e funcionam como elementos negativos. Elas interagem com os elementos positivos ou diretamente com o DNA, diminuindo a expressão dos próprios genes do relógio.

O relógio molecular em mamíferos

Atualmente, a maquinaria do relógio central de mamíferos é composta por pelo menos 12 proteínas distintas: PERIOD1, PERIOD2, PERIOD3, CLOCK, BMAL1 (do inglês, *brain and muscle ARNT-like 1*, onde ARNT= *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), CRYPTOCHROME1, CRYPTOCHROME2, CASEÍNA KINASE I ϵ , DEC1, DEC2 (Honma e col., 2002) e os receptores órfãos REV-ERB α (Pando e Sassone-Corsi, 2001) e ROR (receptor órfão relacionado ao ácido-retinóico) (Dardente e col., 2007). Essas proteínas encontram-se altamente relacionadas entre si, de modo a formarem alças de retroalimentação auto-sustentadas e auto-reguladas, atuando como fatores de transcrição que regulam a expressão gênica uns aos outros.

O gene *per* foi o primeiro a ser descrito, inicialmente em *Drosófilas* e mais tarde seu homólogo em mamíferos, e os estudos de seu RNA mensageiro (mRNA) e sua proteína (PER) indicaram que ambos apresentam ritmos circadianos robustos em sua expressão, mas que não estão em fase: os níveis de mRNA de *per* decrescem quando aumentam os níveis da proteína PER, e o mRNA aumenta quando PER diminui (Hardin, 1990). Esse dado foi o primeiro indicativo da existência de mecanismos auto-regulatórios na expressão do gene e da proteína, o que mais tarde seria verificado também para os

demais componentes da maquinaria do oscilador circadiano.

Hoje se postula que o eixo central dessa maquinaria consista de duas alças principais de retroalimentação interligadas (figura 2). Na primeira, estão os elementos que são membros da família de fatores de transcrição que apresentam o domínio bHLH-PAS (do inglês, *basic helix-loop-helix, Period-ARNT-Single-minded*): CLOCK (CLK) e BMAL1 (Gekakis e col., 1998). A presença do domínio PAS permite que elas interajam entre si formando heterodímeros, enquanto que o domínio bHLH lhes garante a capacidade de se ligar a elementos E-box (sequências nucleotídicas) presentes na região promotora de diversos genes, entre eles os de *period* (*per1*, 2 e 3) e *cryptochrome* (*cry1* e 2), regulando suas transcrições (Murre e col., 1989). A retroalimentação negativa é realizada pelo heterodímero recém-transcrito e traduzido PER:CRY (setas vermelhas na figura 2), que transloca-se ao núcleo e, após atingir determinada concentração, inibe a ação do heterodímero CLK:BMAL1, diminuindo então as transcrições dos próprios genes *cry* e *per*. Como consequência, os níveis de mRNA e de proteína de PER e CRY vão decrescendo até o ponto em que tornam-se insuficientes para reprimir a atividade de CLK:BMAL1, reiniciando um novo ciclo (Yoo e col., 2005).

Além disso, as proteínas DEC1 e DEC2 também parecem inibir a atividade de CLK:BMAL1 tanto por interação direta proteína:proteína quanto por competição pela ligação aos elementos E-box (Honma e col., 2002).

A outra alça de retroalimentação é iniciada também por CLK:BMAL1, que ativam a transcrição de *rev-erba* e *rora*, cujas proteínas competem entre si pela ligação aos elementos responsivos ao ROR (ROREs) presentes no promotor de *bmal1*, onde terão ações antagônicas: ROR ativa a transcrição de *bmal1* enquanto que REV-ERB a inibe (setas azuis na figura 2; para revisão ver Ko e Takahashi, 2006). Além de *bmal1*, os promotores de *clock* e *cry1* também apresentam sequências ROREs e camundongos deficientes em ROR α ou ROR β apresentam comportamentos circadianos aberrantes (revisto por Jetten, 2009).

Todos os ciclos de alças de retroalimentação descritos ocorrem em fases consecutivas que, em conjunto, levam cerca de 24h para se completarem. A concentração fásica dessas diferentes proteínas que regulam de maneira rítmica seus próprios componentes é o que constitui a base molecular do relógio biológico capaz de gerar ritmos com períodos próximos de 24h (circadianos).

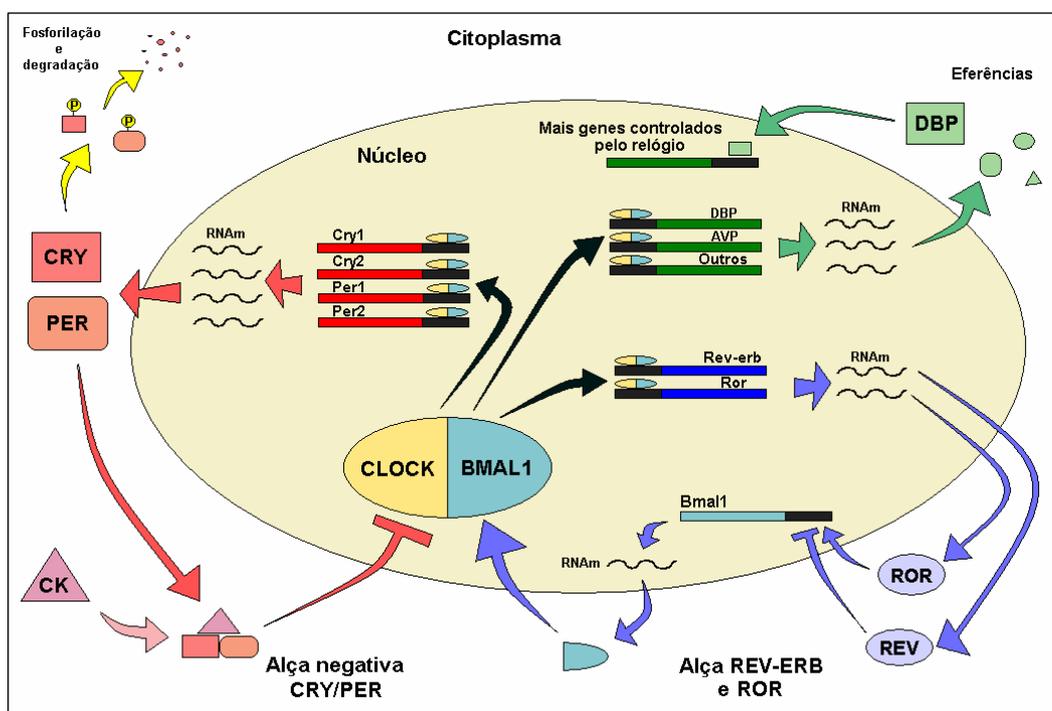


Figura 2 - O oscilador molecular de mamíferos. Em vermelho, a alça de retroalimentação CRY-PER; setas azuis delimitam a alça REV-ERB e ROR; setas verdes representam as vias de eferência molecular; e as setas amarelas mostram um possível ponto de atraso do sistema, pela fosforilação e degradação dos elementos negativos CRY e PER.

O panorama descrito aqui certamente não é definitivo, já que os modelos de funcionamento do relógio molecular se modificam a partir da descoberta de novos genes, proteínas e suas funções.

Aferências

A sincronização dessa maquinaria com o ciclo claro-escuro se dá por meio de informações luminosas ambientais captadas pela retina e enviadas via trato retino-hipotalâmico até os NSQs. O estímulo luminoso interfere nos níveis do mRNA de *period1*, que aumentam rapidamente após um pulso de luz, enquanto os outros componentes da maquinaria não se modificam (Field e col., 2000; Paranjpe e Sharma, 2005). Esse é, portanto, o sinal que faz o *reset* diário do relógio.

Eferências

Outros genes, que não os do relógio, também apresentam o elemento E-box em sua região promotora, de modo que sua transcrição também está sob o comando da maquinaria do relógio: CLK:BMAL1 (setas verdes na figura 2). Esses genes foram denominados *clock controlled genes* (ccgs) e são genes que codificam para as mais diversas substâncias, podendo ser neuropeptídeos, como a vasopressina (Duffield, 2003), neurotransmissores, hormônios, fatores de transcrição, moléculas de sinalização intracelular, dentre outros. Considerando esta maquinaria nos NSQs, as proteínas codificadas pelos *ccgs* regulam a atividade dos neurônios que, por sua vez, sincronizam o restante do organismo através de inervações diretas sobre o tecido-alvo ou por secreção hormonal (Bosek e col., 2009). Assim, os *ccgs* constituem o mecanismo molecular de eferência do relógio circadiano, através do qual todo o organismo pode estar conectado à maquinaria básica do oscilador central.

O gene que codifica para a proteína DBP é um exemplo claro de *ccg*, com um E-box que permite controle pelo dímero CLK-BMAL1 (Ripperger e col., 2000). A proteína DBP se liga na região promotora de outros genes à jusante, em uma sequência do DNA conhecida como elemento D, e regula sua expressão (figura 2 canto superior direito). Assim, a informação rítmica do relógio é transmitida inicialmente para o gene da DBP e posteriormente para outros genes controlados por DBP.

Estudos de *microarray* identificaram centenas de genes, além dos genes do relógio central, cuja expressão oscila ao longo do dia nos NSQs. Nas regiões promotoras desses genes foram encontrados elementos E-box, RORE e CRE como possíveis locais de regulação direta e indireta pelas alças do relógio circadiano molecular (Hardin, 2004).

Modificações pós-transcricionais na maquinaria do relógio biológico

Poucos trabalhos estudaram poliadenilação, 5'CAP, *splicing*, transporte e meia-vida dos mRNA do relógio circadiano de mamíferos. Kojima e colaboradores (2003) verificaram que uma sequência da região 3' UTR do mRNA de *per1* é responsável pela inibição pós-transcricional da expressão do próprio *per1*. Os autores especulam que esta sequência de 196 nucleotídeos do mRNA deve se ligar a uma proteína que inibe a tradução. Eles também sugerem que esta inibição está relacionada com a diferença de fase entre transcrição e tradução dos genes *per* (descrita acima). Outro exemplo refere-se ao trabalho de Yu e colaboradores (1999) que mostra três diferentes produtos do gene *bmal1*, resultantes de *splicings* alternativos. Um desses produtos não contém o domínio PAS, apesar de reter o bHLH; sendo possível que esta proteína aja como um competidor que se liga ao E-box (por meio do bHLH), sem dimerizar com CLOCK (já que não possui o PAS), e impeça a ativação dos genes controlados por CLK:BMAL1.

Modificações pós-traducionais na maquinaria do relógio biológico

Os processos de regulação pós-traducional são mais bem entendidos, principalmente no que diz respeito a eventos de fosforilação, que modificam as proteínas estrutural e funcionalmente. O exemplo mais bem descrito é a participação de caseínas quinase [CK I ϵ (épsilon) e δ (delta)] na rede de alças de retroalimentação descrita anteriormente e esquematizada na figura 2 (Ko e Takahashi, 2006). A fosforilação dependente destas enzimas propicia estabilidade e translocação nuclear adequadas das proteínas, principalmente PER, e sua relevância foi demonstrada em organismos mutantes que não expressavam essas quinases e apresentavam fenótipos com ritmos circadianos alterados (Gachon e col., 2004).

Além das caseínas quinases, outras quinases envolvidas com sinalização celular também parecem participar da modulação das proteínas do relógio, tais como a quinase dependente de cálcio/calmodulina II (CaMK II) e as MAP quinases (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Weber e col., 2006).

Experimentos em cultura celular mostram que a expressão de proteínas fosforiladoras (CKIs) é importante para a atividade de BMAL1. Em contrapartida, fosforilação por MAP quinase leva à redução da atividade de BMAL1. Considerando que os dois sítios de fosforilação são parcialmente sobrepostos, é possível que as caseínas quinases compitam com a MAP quinase na fosforilação de BMAL1, de modo que esta proteína seja hora ativada, hora inativada, dependendo do contexto (Hirayama e Sassone-Corsi, 2005).

Além dos mecanismos de fosforilação descritos, outras regulações pós-traducionais passíveis de ocorrer são a ubiquitinação e a sumoilação. Essas vias também estão relacionadas à estabilidade da proteína alvo, uma vez que levam à sua degradação. A sumoilação refere-se ao complexo formado entre a proteína-alvo e a proteína SUMO, que assemelha-se à ubiquitina e ambas as vias a direcionam para degradação proteossomal (Cardone e col., 2005). A importância da proteína SUMO também já foi demonstrada em organismos mutantes que não a expressavam e cujos ritmos circadianos apresentavam um encurtamento em seus períodos (Cardone e col., 2005).

Como o relógio se baseia em fatores de transcrição protéicos que se inter-regulam, uma modificação pós-traducional em uma proteína reflete na transcrição dos genes por ela regulados. Ou seja, dentro do mecanismo central do relógio, a regulação pós-traducional é tão importante para os eventos de transcrição gênica quanto as regulações transcricional e pós-transcricional.

Modificações estruturais na cromatina

Recentemente, muitos dados têm apontado para o importante papel de enzimas acetilases, desacetilases e metilases nos processos de regulação da expressão gênica como um todo por alterarem a conformação da cromatina. Na transcrição dependente das proteínas do relógio isto não tem sido diferente. Além da necessidade de um elemento E-box na região promotora do gene alvo, a atuação do heterodímero CLK:BMAL1 parece requerer também o recrutamento de coativadores, como a histona acetiltransferase (HAT) p300, responsável por acetilar a histona H3 (Lee e col., 2001; Etchegaray e col., 2003). Entretanto, o fator chave responsável pela existência de uma acetilação rítmica na cromatina ainda não foi elucidado. Esse cenário torna-se ainda mais complexo após a demonstração de que a porção C-terminal da proteína CLOCK de mamíferos possui, por si só, atividade de HAT (Doi e col., 2006).

Sabe-se que, dentre os coativadores recrutados para a transcrição gênica, os mais comuns são o complexo CBP/p300, onde CBP significa *Creb Binding Protein*. A disponibilidade/afinidade desses fatores pela maquinaria transcricional dos genes do relógio também tem sido apontadas como fatores essenciais para o ajuste dos ritmos biológicos, de forma que os altos níveis de CLK:BMAL1 em determinada fase do dia recrutaria mais CBP, competindo com outras ativações transcricionais que necessitem desse fator, resultando numa regulação negativa indireta destas (Weber, 2009). De fato, a redução nos níveis de CBP pela técnica de RNA de interferência (RNAi) em

Drosófilas resultou em níveis diminuídos dos transcritos dependentes de CLOCK (Hung e col., 2007).

Conclusões

Os genes do relógio constituem um dos mais notórios exemplos da importância de uma regulação fina da transcrição e tradução gênicas. A complexidade com que os diferentes elementos dessa maquinaria se interligam e promovem a regulação de uma infinidade de ritmos perceptíveis tem sido um desafio constante aos estudiosos da área desde os séculos passados.

De acordo com dados obtidos por análises por *microarrays*, cerca de 5 a 10% de todo o nosso genoma é controlado pela maquinaria do relógio, o que inclui componentes de metabolismo, detoxificação, transdução de sinais, secreções, proliferação celular, atividades neuronais, respostas imunes, dentre outros processos vitais (revisto por Weber, 2009). Toda essa regulação depende do organismo e do tecido em questão, já que são altamente específicos funcionalmente. Por isso mesmo, não é de se estranhar a quantidade de estudos necessários para que se conclua a inserção de um novo componente geral nessa maquinaria já tão complexa.

De acordo com Hardin (2004), quanto mais promotores de genes expressos ritmicamente forem identificados e analisados, a lista de elementos regulatórios que medeiam ou modificam a expressão de ritmos em mamíferos irá, sem dúvida, crescer além de E-boxes, elementos RORE e CREs. Ressalta-se ainda que, mesmo que um gene seja constitutivamente transcrito, seu produto pode oscilar devido às regulações pós-traducionais sob controle circadiano, tais como a atividade de proteassomas, proteases e ubiquitina ligases (Akhtar e col., 2002). Além disso, evidências recentes apontam para uma intercomunicação entre as moléculas reguladoras do ciclo celular e as do relógio, indicando um novo papel destas últimas na mediação de processos importantes como reparo de DNA e até mesmo no desenvolvimento de câncer (Borgs et al., 2009).

Desta forma, descrevemos aqui uma pequena parte desse complexo cenário que é um dos mais ricos exemplos da importância da regulação gênica. Isso porque nos permite compreender a interação entre os mais diversos níveis organizacionais de um indivíduo: a interação com o ambiente induzindo modificações moleculares que, por sua vez, modulam todo o organismo até atingir o nível comportamental, adaptando-o a interagir da melhor forma possível com esse ambiente.

Agradecimentos. Agradecemos à Professora Dra. Lucile Maria Floeter-Winter pela orientação na disciplina "Regulação da Expressão

Gênica nos Processos Fisiológicos” e pelo apoio e iniciativa para a publicação desta revisão.

Contribuição dos autores. Redação do artigo: Erika Cecon e Danilo Eugênio de França Laurindo Flôres. Figuras: Danilo Eugênio de França Laurindo Flôres.

Bibliografia

- Akhtar, R.A., Reddy, A.B., Maywood E.S., Clayton, J.D., King, V.M., Smith, A.G., Gant, T.W., Hastings, M.H., Kyriacou, C.P. (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol.* 12(7), 540-550.
- Borgs, L., Beukelaers, P., Vandenbosch, R., Belachew, S., Nguyen, L., Malgrange, B. (2009). Cell “circadian” cycle: New role for mammalian core clock genes. *Cell Cycle* 8(6):832-837.
- Bozek, K., Relógio, A., Kielbasa, S. M., Heine, M., Dame, C., Kramer, A., Herzog, H. (2009). Regulation of clock-controlled genes in mammals. *PLoS ONE.* 4, e4882.
- Cardone, L., Hirayama, J., Giordano, F., Tamaru, T., Palvimo, J. J., Sassone-Corsi, P. (2005). Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science* 309(5739), 1390-1394.
- Dardente, H. e Cermakian, N. (2007). Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiology International* 24, 195-213.
- Doi, M., Hirayama, J., Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* 125(3), 497-508.
- Duffield, G. E. (2003). DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. *Journal of Neuroendocrinology* 15, 991-1002.
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96, 271-290.
- Enright, J. T. (1970). Ecological aspects of endogenous rhythmicity. *Ann Rev Ecol Syst* 1, 221-238.
- Etchegaray, J. P., Lee, C., Wade, P. A., Reppert, S. M. (2003). Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock *Nature*, 421(6919): 177-182.
- 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: 437-447.
- Gachon, F., Nagoshi, E., Brown, A. S., Ripperger, J., Schibler, U. (2004). The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma* 113, 103-112.
- 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, 1564-1569.
- Golombek, D. A. e Aguilar-Roblero, R. (2003). Mecanismos de temporização nos vertebrados. In: Marques, N.; Menna-Barreto, L. *Cronobiologia: Princípios e aplicações*. Editora da Universidade de São Paulo.
- Hardin, P. E., Hall, J. C., Rosbash, M. (1990). Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343(6258), 536-540.
- Hardin, P. E. (2004). Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *J. Biol. Rhythms* 19, 348-360.
- Hirayama, J. e Sassone-Corsi, P. (2005). Structural and functional features of transcription factors controlling the circadian clock. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 548-556.
- Honma, S., Kawamoto, T., Takagi, Y., Fujimoto, K., Sato, F., Noshiro, M., Kato, Y., Honma, K. (2002). Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419, 841-844.
- Hung, H. C., Maurer, C., Kay, S. A., Weber, F. (2007). Circadian transcription depends on limiting amounts of the transcription co-activator nejdre/CBP. *J Biol Chem* 282(43), 31349-3157.
- Jetten, A. M. (2009). Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal.* 7:e003.
- Ko, C.H. e Takahashi J.S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* 15, r271-r277.
- Kojima, S., Hirose, M., Tokunaga, K., Sakaki, Y., Tei, H. (2003). Structural and functional analysis of 3' untranslated region of mouse Period1 mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 1-7.
- Konopka, R. J. e Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 68, 2112-2116.
- Lee, J. W., Lee, Y. C., Na, S.Y., Jung, D. J., Lee, S. K. (2001). Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. *Cell Mol Life Sci.* 58(2), 289-297.
- Marques, M. D. (2003). Mecanismos de temporização em unicelulares, plantas e invertebrados. In: Marques, N., Menna-Barreto, L. *Cronobiologia: Princípios e aplicações*. Editora da Universidade de São Paulo.
- Marques, M. D., Golombek, D., Moreno, C. (2003). Adaptação temporal. In: Marques, N., Menna-Barreto, L. *Cronobiologia: Princípios e aplicações*. Editora da Universidade de São Paulo.
- Moore-Ede, M. C., Sulzman, F. M., Fuller, C. A. (1982). *The Clocks That Time Us. Physiology of the Circadian Timing System*. Harvard University Press. Cambridge, MA.
- Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, 58(3): 537-544.
- Pando, M. P. e Sassone-Corsi, P. (2001) Signaling to the mammalian circadian clocks: in pursuit of the primary mammalian circadian photoreceptor. *Science STKE* 107, re16.
- Paranjpe, D. A. e Sharma, V. K. (2005). Evolution of temporal order in living organisms. *Journal of Circadian Rhythms* 3, 7-19.
- 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, 679-689.
- Weber, F., Hung, H. C., Maurer, C., Kay, S. A. (2006). Second messenger and Ras/MAPK signalling pathways regulate CLOCK/CYCLE-dependent transcription. *J Neurochem* 98(1), 248-257.
- Weber, F. (2009). Remodeling the clock: coactivators and signal transduction in the circadian clockworks. *Naturwissenschaften* 96, 321-337.
- Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., Reppert, S. M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697-706.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288, 682-685.
- Yoo, S. H., Ko, C.H., Lowrey, P. L., Buhr, E. D., Song, E. J., Chang, S., Yoo, O. J., Yamazaki, S., Lee, C., Takahashi, J. S. (2005). A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 102, 2608-2613.
- Yu, W., Ikeda, M., Abe, H., Honma, S., Ebisawa, T., Yamauchi, T., Honma, K., Nomura, M. (1999). Characterization of Three Splice Variants and Genomic Organization of the Mouse BMAL1 Gene. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 260, 760-767.