UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Thiago Henrique Ribeiro Glória

Efeito de α -MSH sobre a expressão gênica de rodopsina, tirosinase e do receptor de
 α -MSH, subtipo MC1R, em melanócito B16 de *Mus musculus*

α -MSH effects on rhodopsin, tyrosinase and MC1R genes in B16 *Mus musculus*
melanocytes

São Paulo

2012

Thiago Henrique Ribeiro Glória

Efeito de α -MSH sobre a expressão gênica de rodopsina, tirosinase e do receptor de
 α -MSH, subtipo MC1R, em melanócito B16 de *Mus musculus*

α -MSH effects on rhodopsin, tyrosinase and MC1R genes in B16 *Mus musculus*
melanocytes

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Fisiologia, na Área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa Dra Ana Maria de Lauro
Castrucci

São Paulo

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS/USP

Glória, Thiago Henrique Ribeiro
Efeito de α -MSH sobre a expressão gênica de rodopsina,
tirosinase e do
receptor α -MSH, subtipo MC1R, em melanócito B16 de *Mus
musculus* /
Thiago Henrique Ribeiro Glória ; orientadora Ana Maria de Lauro
Cas-
trucci. --. São Paulo, 2012.
XX f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade
de
São Paulo. Departamento de Fisiologia

1. Células Pigmentares. 2. α -MSH. 3. Rodopsina. 4. Tirosinase.
5. MC1R. 1. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Fisiologia. II. Título.

Nome: Glória, Thiago Henrique Ribeiro

TÍTULO: Efeito de α -MSH sobre a expressão gênica de rodopsina, tirosinase e do receptor α -MSH, subtipo MC1R, em melanócito B16 de *Mus musculus*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Fisiologia, na Área de Fisiologia Geral.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr (a)._____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Prof.Dr (a)._____

Instituição:_____

Julgamento:_____

Assinatura:_____

Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci

Orientadora

Julgamento:_____ Assinatura:_____

“Aprenda como se você fosse viver para sempre. Viva como se você fosse morrer amanhã.”

(Mahatma Gandhi)

*A todos que depositaram fé, amor e
esperança no meu caminho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que sou e tudo que tenho.

À Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci, por ser um exemplo de dedicação e seriedade na prática de Ciência. Agradeço imensamente pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório sob sua orientação, pelo seu jeito de ser, pelo apoio, pelo carinho, pela companhia e por tornar possível a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Silvana e José, que me ensinaram o que é a vida com seu amor incondicional, sempre me ajudando a realizar meus sonhos.

Aos meus irmãos, Bruno e Victória que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso. Obrigado pelas orientações nos momentos em que eu mais precisava. Sem vocês eu não conseguiria realizar esse trabalho.

Aos meus amigos que sempre me deram força e, pacientemente, entenderam minha ausência em muitos momentos importantes, mas permaneceram sempre ao meu lado.

Ao Diego, meu amor e melhor amigo, obrigado pelo carinho, paciência, companheirismo e por fazer parte da minha vida. Sou uma pessoa melhor desde que te conheci.

Aos meus amigos de laboratório Luciane, Jennifer e Gláucia (que sempre me alegravam o dia e se tornaram grandes amigos), Rafael (grande companhia para todos os dias e pelas muitas risadas dentro e fora do laboratório), Maristela e Bruno (pela orientação intelectual e experimental) e ao técnico Márcio (por toda ajuda na manutenção do laboratório, caronas e conversas que tivemos).

Aos novos amigos que entraram na minha vida e gentilmente me acolheram no seu peito. Heloisa, Soraya, Gustavo e Shirlene, jamais irei esquecer o carinho que vocês me dedicam.

À Profa. Dra. Maria Aparecia Visconti pelo auxílio durante minha iniciação científica.

Aos melanócitos de *Mus musculus*.

Aos estudantes de pós-graduação do Instituto de Biociências/USP pela amizade.

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências/USP, onde foi realizado este trabalho.

A todos os docentes do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências/USP.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências/USP pela dedicação, pelo café, pelo “bom dia!”.

À Universidade de São Paulo pelo espaço e continuação de minha formação.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

“Escolho meus amigos não pela pele ou outro arquétipo qualquer, mas pela pupila. Tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante. A mim não interessam os bons de espírito nem os maus de hábitos. Fico com aqueles que fazem de mim louco e santo. Deles não quero resposta, quero meu avesso. Que me tragam dúvidas e angústias e agüentem o que há de pior em mim. Para isso, só sendo louco. Quero-os santos, para que não duvidem das diferenças e peçam perdão pelas injustiças. Escolho meus amigos pela cara lavada e pela alma exposta. Não quero só o ombro ou o colo, quero também sua maior alegria. Amigo que não ri junto não sabe sofrer junto. Meus amigos são todos assim: metade bobeira, metade seriedade. Não quero risos previsíveis nem choros piedosos. Quero amigos sérios, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça. Não quero amigos adultos nem chatos. Quero-os metade infância e outra metade velhice. Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto e velhos, para que nunca tenham pressa. Quero amigos para saber quem eu sou... Pois os vendo loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esquecerei de que "normalidade" é uma ilusão imbecil e estéril...”

(Loucos e Santos - Oscar Wilde)

RESUMO

A coloração dos vertebrados deve-se a presença de pigmentos, sintetizados e/ou armazenados em células denominadas células pigmentares cutâneas. A mudança de cor nos vertebrados é principalmente regulada por α -MSH e uma família de enzimas melanossômicas, que incluem tirosinase e as proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2 (TRP-1 e TRP-2, respectivamente). Sua ação está ligada à dispersão dos melanossomos ou síntese de melanina, processos que resultam em escurecimento do animal, enquanto a agregação ou inibição de síntese leva ao seu empalidecimento. Opsinas, como a melanopsina e a rodopsina, além de presentes na retina, podem ser expressas em células pigmentares cutâneas, intermediando foto-respostas de proliferação e de dispersão de melanossomos.

O objetivo deste trabalho foi investigar a expressão temporal da rodopsina, tirosinase e do receptor MC1R, bem como os efeitos do tratamento com α -MSH 10^{-7} M, 10^{-8} M e 10^{-9} M por 24 horas sobre esses parâmetros, em melanócitos B16 de *Mus musculus*, mantidos em escuro constante.

Através de PCR em tempo real (quantitativo) demonstrou-se que α -MSH 10^{-7} M não modula os níveis de mRNA para o receptor MC1R quando comparado com o grupo controle, contudo há uma evidente tendência de redução dos níveis do transcrito. Todavia, na concentração de 10^{-8} M, observou-se um aumento estatisticamente significativo no nível do transcrito na hora 20 quando comparado ao grupo controle e na concentração de 10^{-9} M o tratamento mostrou uma diminuição estatisticamente significativa no nível do transcrito entre o grupo controle e o tratado para cada ponto temporal analisado. Para a rodopsina, foi demonstrado que α -MSH 10^{-7} M modula os níveis do mRNA quando comparado ao grupo controle, mostrando uma diminuição estatisticamente significativa na hora 0 e 16. Na concentração de 10^{-8} M houve um aumento estatisticamente significativo nos níveis do transcrito na hora 4 quando comparado ao grupo controle. Já, na concentração de 10^{-9} M, o hormônio induziu um robusto aumento no nível do transcrito quando comparado ao grupo controle para cada ponto temporal analisado. Nossos resultados são pioneiros em demonstrar a modulação de rodopsina por α -MSH, pois não há dados na literatura, seja em retina ou em outros tecidos, que tenham investigado essa ação do hormônio melanotrópico.

O mesmo padrão foi observado para a tirosinase, demonstrando uma diminuição estatisticamente significativa na concentração de 10^{-7} M na hora 0 e um aumento significativo na concentração de 10^{-8} M na hora 8 e na concentração de 10^{-9} M na hora 12 e 8.

Através de PCR em tempo real (quantitativo) nós demonstramos que α -MSH apresenta uma modulação dose-dependente para o transcrito do mRNA do receptor MC1R, tirosinase e rodopsina, mas não sincronizou a expressão desses genes, que permaneceram arrítmicos.

Palavras-Chave: Mamíferos, Células Pigmentares, Melanina, α -MSH, Rodopsina, Tirosinase, MC1R.

ABSTRACT

In vertebrates, skin color is given by pigments, synthesized and/or stored in cutaneous pigment cells. The vertebrate color change is mainly regulated by α -MSH and a family of melanosome enzymes, which includes tyrosinase and tyrosinase-related proteins 1 and 2 (TRP-1 and TRP-2, respectively). α -MSH action is associated with melanosome dispersion or melanin synthesis, processes which lead to skin darkening, whereas melanin aggregation or synthesis inhibition results in skin lightening. Opsins, such as melanopsin and rhodopsin, may be expressed in skin pigment cells, besides being present in the retina, and mediate non visual photoresponses such as cell proliferation and melanosome dispersion.

The aim of this study was to investigate the temporal expression of rhodopsin, tyrosinase and the receptor MC1R, as well as the effects of 10^{-7} M, 10^{-8} M and 10^{-9} M α -MSH for 24 hours in *Mus musculus* B16 melanocytes, kept in constant darkness.

Using real time PCR (quantitative) we demonstrated that 10^{-7} M α -MSH does not modulate MC1R mRNA levels, as compared to the control group, although a tendency to reduction was evident. On the other hand, at the concentration of 10^{-8} M, we observed a statistically significant increase of the transcript level at the hour 20, as compared to the control group and at the concentration of 10^{-9} M the treatment showed a statistically significant decrease of the transcript level for each temporal point analyzed. For rhodopsin, we showed that 10^{-7} M α -MSH modulates mRNA levels, as compared to the control group, demonstrating a statistically significant decrease at the hour 0 and 16. At the concentration of 10^{-8} M there was a statistically

significant increase of transcript levels at the hour 4, as compared to the control group. The hormone at 10^{-9} M induced a robust increase of the transcript levels, as compared to the control group, for each time point analyzed. Our results are pioneering in demonstrating the regulation of rhodopsin by α -MSH, since there are no data in the literature which report the action of melanotropic hormone on rhodopsin in either the retina or other tissues.

Similar pattern was observed for the tyrosinase gene, demonstrating a statistically significant decrease in the concentration of 10^{-7} M at the hour 0 and a significant increase in the concentration of 10^{-8} M at the hour 8 and in the concentration of the 10^{-9} M at the hour 12 and 8.

Using real time PCR (quantitative) we demonstrated that α -MSH shows a dose-dependent modulation for mRNA transcripts of the MC1R receptor, tyrosinase and rhodopsin, but the hormone was not able to synchronize the expression of these genes, which remained arrhythmic.

Key-Words: Mammals, Pigment Cells, Melanin, α -MSH, Rhodopsin, Tyrosinase, MC1R.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS____vi

RESUMO____ix

ABSTRACT____xi

INTRODUÇÃO____1

As células pigmentares cutâneas1

Rodopsina e fototransdução.....2

As opsinas não visuais.....3

O sistema pró-opiomelanocortina.....5

α -MSH e sistemas pigmentares.....7

Os receptores de melanocortinas.....8

Tirosinase, a enzima chave da melanogênese.....11

JUSTIFICATIVA____12

OBJETIVOS13

Geral.....13

Específico.....13

Material e Métodos____14

Cultura de células.....14

Verificação do padrão temporal de expressão de rodopsina, tirosinase e receptor de α -MSH, MC1R, na ausência e presença de α -MSH.....14

Extração de RNA, RT-PCR e PCR em tempo real.....14

Tabela 1. Primers e probes específicos para genes de *M. musculus*.....16

Análise estatística.....17

RESULTADOS____18

Ensaio hormonal.....	18
Quantificação dos níveis do RNAm para MC1R.....	18
Quantificação dos níveis do RNAm para rodopsina.....	25
Quantificação dos níveis do RNAm para tirosinase.....	32
RESUMO DOS RESULTADOS	40
DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

INTRODUÇÃO

As células pigmentares cutâneas

A coloração dos animais deve-se à presença de pigmentos cutâneos, sendo os principais pigmentos as melaninas, omocromos, carotenóides, purinas e pteridinas. Estes pigmentos são sintetizados e/ou armazenados dentro de células denominadas células pigmentares ou cromatóforos, originários da crista neural embrionária em vertebrados (BAGNARA & HADLEY, 1973). Estes cromatóforos estão localizados principalmente na derme do animal e, dependendo da cor e do tipo de pigmento, recebem denominação própria: melanóforos (preto/marrom – omocromo em invertebrados ou melanina nos vertebrados), leucóforos (branco – purinas), eritróforos (vermelho – carotenóides e pteridinas), xantóforos (amarelo – carotenóides e pteridinas) e iridóforos (iridescente – purinas) (BAGNARA & HADLEY, 1973).

Muitas espécies animais realizam adaptação cromática em resposta a estímulos ambientais, como luz, cor do substrato e interações intra- e interespecíficas. Essas mudanças de coloração auxiliam no mimetismo, termorregulação, comunicação social e expressão de comportamentos como medo, agressividade e excitação sexual (BAGNARA & HADLEY, 1973; FUJII, 2000).

A mudança de cor pode ocorrer através de dois processos: um lento, denominado mudança de cor morfológica e um rápido, denominado mudança de cor fisiológica. O processo de mudança de cor morfológica envolve a variação da quantidade de pigmentos e/ou da proliferação de células pigmentares, sendo visível somente horas ou dias depois do início do processo. Este tipo de mudança de cor é encontrado em todos os animais e é o único que ocorre em aves e mamíferos (BAGNARA & HADLEY, 1973). A mudança de cor rápida ou fisiológica é promovida pela translocação de grânulos de pigmentos ao longo dos processos dendríticos das células pigmentares, característica de alguns invertebrados, como crustáceos e moluscos, e de vertebrados ectotérmicos (FUJII, 2000).

Em estágios embrionários e larvais de teleósteos, quando os cromatóforos ainda apresentam independência dos sistemas nervoso e/ou endócrino, pode ocorrer a resposta direta à luz incidente (WAKAMATSU, 1978; OHTA, 1983; OHTA & MURAMATSU, 1988). Com o desenvolvimento, essa resposta fica submissa ao

controle neuro-endócrino e, na maioria dos casos, só reaparece se os cromatóforos forem desenhervados ou colocados em cultura primária (FUJII, 2000).

Em aves e mamíferos, o melanócito é a única célula pigmentar remanescente e a capacidade de rápida migração pigmentar foi perdida (SHERBROOKE et al., 1988), sendo os grânulos lentamente deslocados ao longo das projeções dendríticas para os queratinócitos vizinhos, penas ou pêlos (BOISSY, 1988).

Os pigmentos produzidos nos melanócitos ficam no interior de organelas denominadas melanossomos e são transferidos aos queratinócitos vizinhos conferindo coloração à pele. O conjunto dessas células epidérmicas associadas a um melanócito constitui a unidade funcional da pigmentação em mamíferos (BAGNARA & HADLEY, 1973). A melanina pode ser de dois tipos: eumelanina, de cor marrom a preta, ou feomelanina, de cor parda a avermelhada. A quantidade produzida de cada tipo de melanina define os diferentes padrões de coloração da pele ou da pelagem dos mamíferos (KADEKARO et al., 2003).

Rodopsina e fototransdução

Nos mamíferos, a fotorrecepção se dá através da retina a qual contém os fotorreceptores cones e bastonetes que realizam a fototransdução dos sinais luminosos em sinais elétricos. A rodopsina, assim como proteínas auxiliares, é o pigmento visual encontrado no segmento externo dos bastonetes (AIRES & BALDO, 2008).

O segmento externo dos bastonetes está organizado em discos membranosos empilhados, que são originados de invaginações da membrana celular. Essas invaginações conferem aos bastonetes um aumento da área superficial da membrana o que possibilita uma absorção maximizada dos fótons de luz (AIRES & BALDO, 2008).

A rodopsina é constituída por uma proteína transmembrânica designada opsina e pelo cromóforo 11-cis-retinal, que pode assumir diferentes conformações isoméricas. Os cones também possuem pigmentos visuais formados por 11-cis-retinal e uma opsina, cuja sequência varia, conferindo ao cone a capacidade de absorver diferentes comprimentos de onda de luz (HAMASSAKI & VENTURA, 2007; AIRES & BALDO, 2008).

Ao absorver um fóton de luz, o 11-cis-retinal isomeriza-se para all-trans-retinal, que rapidamente se transforma em metarrodopsina I e em seguida metarrodopsina II, que é crucial para a transdução do sinal. A rodopsina ativa atua sobre uma proteína G (G_t) de membrana, a transducina, que é constituída por três subunidades α , β e γ (AIRES & BALDO, 2008; CASTRUCCI & ISOLDI, 2008). O trans-retinal é regenerado em 11-cis-retinal em células do epitélio pigmentar da retina e devolvido às células fotorreceptoras.

A ação da metarrodopsina II sobre a transducina promove um desligamento do GDP (difosfato de guanosina) da subunidade α e a sua substituição por GTP (trifosfato de guanosina), que então é ativada, se dissocia das subunidades β e γ e ativa uma fosfodiesterase de GMPc (monofosfato cíclico de guanosina). A hidrólise de GMPc faz com que haja uma diminuição da sua concentração citossólica, reduzindo a quantidade de GMPc ligado aos canais catiônicos de sódio na membrana plasmática. Isso promove um fechamento dos canais de sódio dos bastonetes, promovendo a hiperpolarização da célula e reduzindo a taxa de liberação do neurotransmissor glutamato na região da sinapse com as células bipolares (ALBERTS et al., 2004; AIRES & BALDO, 2008; CASTRUCCI & ISOLDI, 2008).

Essa cascata promovida pelo GMPc fornece um alto grau de amplificação das respostas à luz, de modo que uma única molécula de metarrodopsina II pode interagir com cerca de 500 moléculas de transducina que, por sua vez, podem ativar moléculas de fosfodiesterase, e cada uma delas pode levar à hidrólise de aproximadamente 2.000 moléculas de GMPc/segundo, fechando muitos canais catiônicos (AIRES & BALDO, 2008). Este sistema constitui o mecanismo de fototransdução visual, cujo sinal luminoso é convertido em sinal elétrico para o córtex visual do cérebro (ALBERTS et al., 2004).

As opsinas não visuais

Em anfíbios, répteis e aves, a pineal constitui eficiente fotorreceptor, juntamente com os olhos laterais, sendo os pinealócitos estruturas semelhantes aos fotorreceptores da retina (GOLOMBEK & ROBLERO, 2003). O órgão parietal de peixes e lagartos é importante para a percepção de amanhecer e entardecer e possui pigmentos não retinianos, como parapinopsina e parietopsina (TERAKITA et

al., 2004; SU et al., 2006). Outras células de vertebrados que apresentam uma resposta funcional quando expostas à luz e, portanto, podem servir como fotorreceptores extra-retinais são os melanóforos (ZATZ et al., 1988), neurônios (OLIVER & BAYLE, 1982) e miócitos iridiais (BARR, 1989).

Nos mamíferos, os núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos (NSQs), que são os relógios biológicos centrais, recebem informações de iluminação ambiental através de uma projeção da via retino-hipotalâmica (MOORE & KLEIN, 1974). Fotorreceptores clássicos, cones e bastonetes, não são essenciais para o ajuste dos NSQs aos ciclos claro-escuro. Mas a enucleação bilateral em camundongos leva o relógio a correr em livre-curso, com um período menor que 24h. Esse fato levou à descoberta de fotorreceptores retinais outros que não cones e bastonetes, portadores de um novo fotopigmento (PROVENCIO et al., 2002), capaz de capturar a irradiação luminosa e enviar essa informação aos NSQs (BERSON et al., 2002). Ao final da década de 90, os pesquisadores Ignacio Provencio e Mark Rollag descobriram uma nova opsina, que denominaram melanopsina, pois foi inicialmente clonada de melanóforos da rã *Xenopus laevis* (PROVENCIO et al., 1998). A partir de então, demonstraram a presença de melanopsina na retina de todos os grupos de vertebrados, inclusive o homem (PROVENCIO et al., 2000).

Demonstramos em nosso laboratório a expressão funcional de melanopsina na linhagem embrionária ZEM-2S do teleósteo *Danio rerio* (FARHAT et al., 2008) e no melanócito da ave *Gallus gallus* (LIMA et al., 2006), e de rodopsina na linhagem de eritroforoma GEM-81 do teleósteo *Carassius auratus* (IM et al., 2006) e de melanoma S-91 e B-16 do camundongo *Mus musculus*. Curiosamente, em eritróforos fotossensíveis do teleósteo *Oreochromis niloticus*, foi evidenciada a presença de RNA mensageiro de 2 opsinas de cones, de curto e médio comprimento de onda (BAN et al., 2005). Em melanóforos de *Xenopus laevis*, Isoldi e colaboradores (2005) demonstraram que a melanopsina ativada por luz a 460nm ativa a cascata da fosfolipase C, proteína quinase C e aumento de cálcio citoplasmático, semelhantemente ao que se vê em fotorreceptores de alguns invertebrados. As vias de transdução do sinal luminoso por células pigmentares em outras espécies e por outras opsinas são ainda desconhecidas. É interessante mencionar que no caso de opsinas em células pigmentares, a regeneração do 11-

cis-retinal deve dar-se *in loco*, semelhantemente ao que se vê em muitos invertebrados, onde o retinal nunca deixa o sítio de ligação na opsina.

O sistema pró-opiomelanocortina

Vários grupos de pesquisadores descobriram que alguns hormônios, como as melanocortinas, eram derivados de um precursor protéico comum (HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999). A sequência nucleotídica do DNA deste precursor, denominado pró-opiomelanocortina (POMC), foi elucidada pela primeira vez em células bovinas por Nakanishi e colaboradores (1979).

POMC, um pró-hormônio protéico de 31-kDa, encontra-se localizado no cromossomo 2p23 em humanos e, após sua síntese, sofre processamento pós-traducional, sendo clivado proteoliticamente dando origem a vários peptídeos bioativos, incluindo adrenocorticotropinas (ACTH), melanotropinas (α -, β - e γ - MSH), β -lipotropinas e endorfinas. Esta clivagem é dependente da regulação da expressão de enzimas célula-específicas, que irão favorecer a síntese de espécies particulares de peptídeos, como por exemplo, ACTH e MSH, nos corticotrofos da hipófise anterior e *pars intermedia* da hipófise respectivamente (CHAKRABORTY, 1999; HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999; MAZURKIEWICZ et al., 2000).

Na hipófise e no hipotálamo, a proteólise pós-traducional da POMC é realizada por duas pró-hormônio convertases denominadas PC1 e PC2. A clivagem por PC1 na *pars distalis* da hipófise resulta primariamente na produção de ACTH e β -lipotropinas e, em uma extensão menor, β -endorfinas, enquanto a clivagem por PC2 na *pars intermedia* resulta em β -endorfinas e uma porção N-terminal que contém corticotropinas e α -MSH desacetilado (MAZURKIEWICZ et al., 2000). Um par de aminoácidos básicos, arginina e lisina, dentro da estrutura da POMC, é tido como o possível sítio de clivagem e atuação dessas enzimas (HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999), contudo estes mecanismos ainda não estão bem elucidados.

A sequência do RNAm da POMC foi determinada em várias espécies de mamíferos, anfíbios e teleósteos, revelando que todos estes vertebrados mandibulados (gnatostomados) apresentam a mesma estrutura geral de organização da POMC. Também foi evidenciado que a lampréia, um agnatostomado, apresenta uma sequência reconhecível da POMC com uma estrutura similar àquela apresentada em vertebrados superiores. Este achado

sugere que POMC estava presente em um ancestral comum das lampréias e gnatostomados cerca de 700 milhões de anos atrás ou mais, demonstrando um alto grau de conservação filogenética deste pró-hormônio (HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999).

Figura 1: Processamento da POMC para produzir peptídeos, célula-específico, a partir de opiomelanocortinas (Extraído de HADLEY & LUEVANO, 1999).

α -MSH e sistemas pigmentares

A mudança de cor nos vertebrados é principalmente regulada por α -MSH. Sua ação está ligada à dispersão dos melanossomos ou síntese de melanina, processos que resultam em escurecimento do animal, enquanto a agregação ou inibição de síntese leva ao seu empalidecimento (BAGNARA & HADLEY, 1973; SHERBROOKE et al., 1988; FUJII, 2000). O α -MSH, um peptídeo de 13 aminoácidos produzido na *pars intermedia* da hipófise, é extremamente conservado evolutivamente, tanto estrutural como funcionalmente, é estimulador de crescimento neural durante a embriogênese e de produção de melanina pela pele em resposta a radiação ultravioleta, sendo responsável pelo escurecimento de todos os vertebrados estudados até o presente (CASTRUCCI & ISOLDI, 2007; NERY & CASTRUCCI, 1997). Como a *pars intermedia* da hipófise é atrofiada em humanos adultos, a secreção de α -MSH é feita em sítios extra-hipofisários, incluindo a pele, especialmente nos queratinócitos (SLOMINSKI & PAWELEK, 1998; TSATMALI et al., 2002), mas também nos próprios melanócitos (KADEKARO et al., 2003).

O α -MSH difere das outras melanocortinas, pois a sua porção N-terminal se encontra acetilada e a C-terminal amidada. A ausência do grupo acetil N-terminal diminui consideravelmente a potência melanotrópica do α -MSH sobre os melanócitos (HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999).

FIGURA 2: Estrutura primária do α -MSH (Extraído de HADLEY & LUEVANO, 1999).

Os receptores de melanocortinas

Os receptores de melanocortinas constituem-se de 297 a 317 aminoácidos, distribuídos em um pequeno domínio extracelular amino-terminal, sete domínios transmembrânicos hidrofóbicos e um pequeno domínio intracelular carboxi-terminal (GRANTZ et al, 1993; CASTRUCCI & ISOLDI, 2007), estando os resíduos negativamente carregados concentrados na face extracelular da membrana (MOUNTJOY et al., 1992; GRANTZ et al, 1993). O domínio amino-terminal pode variar consideravelmente em tamanho e grau de glicosilação, enquanto o domínio carboxi-terminal e o segundo domínio transmembrânico contêm uma seqüência semelhante àquela determinada para o reconhecimento da proteína-quinase dependente de AMPc (PKA, HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999; KENNELLY & KREBS, 1990).

Mamíferos possuem cinco desses receptores, MC1R, MC2R, MC3R, MC4R e MC5R, que possuem diversas funções em uma variedade de tecidos (LOGAN et al., 2003).

FIGURA 3: Estrutura primária do MC1R de camundongo (Extraído de HADLEY & LUEVANO, 1999).

Os receptores para melanocortinas pertencem à família de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Mensageiros extracelulares ligantes de GPCRs induzem mudanças conformacionais no receptor, que ativa diferentes proteínas G, assim chamadas por ligarem-se a nucleotídeos de guanina, GDP e GTP. As proteínas G são heterotrímeros, constituídos por subunidades α , β e γ (CASTRUCCI & ISOLDI, 2007).

No estado inativo, $G\alpha$ está acoplada a GDP, do lado interno da membrana plasmática; quando o ligante liga-se ao receptor, este sofre uma mudança conformacional, promovendo uma alteração alostérica também na proteína G. Esta libera GDP e liga-se a GTP, o que faz com que $G\alpha$ seja ativada, desligue-se do dímero $\beta\gamma$ (CASTRUCCI & ISOLDI, 2007), e ligue-se a uma enzima, o que pode acarretar na estimulação ou inibição de sua atividade catalítica. Essas enzimas catalisam a geração de mensageiros intracelulares como 3' 5' monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), fosfoinositídeos, diacilglicerol e outros segundos mensageiros. Estes segundos mensageiros, por sua vez, ativam cascatas quinásicas e fosforilam fatores citosólicos e de transcrição nuclear. O dímero $\beta\gamma$ também é capaz de modular a atividade de enzimas, de canais e de receptores de membrana. GPCRs ativados também recrutam quinases de receptores (GRKs), que fosforilam os próprios receptores, facilitando assim o término do sinal (CASTRUCCI & ISOLDI, 2007).

As vias de transdução da sinalização dos receptores de melanocortinas envolvem a geração de AMPc através da proteína G_s , exceto o receptor MC3R que atua através da proteína G_q (CHAKRABORTY, 1999; HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999).

Após a ativação do receptor, a adenilil ciclase é ativada pela subunidade α da proteína trimérica e passa a sintetizar AMPc a partir de ATP (HADLEY & HASKELL-LUEVANO, 1999; CASTRUCCI & ISOLDI, 2007). Quando o receptor é o MC1R em melanócitos, o AMPc interage com a PKA que então fosforila a enzima tirosinase, aumentando assim sua atividade catalítica e, portanto a melanogênese (SATO et al., 2007). Há evidências de que α -MSH também estimula a síntese de novo da tirosinase (ABDEL-MALEK et al., 1995), através do fator de transcrição CREB. O fator de transcrição CREB, quando fosforilado por PKA, liga-se especificamente a

CRE (HAUS-SEUFFERT & MEISTERERNST, 2000), sequência específica presente no promotor do gene da tirosinase e ativa sua transcrição. Além da fosforilação por PKA, CREB pode ser fosforilado por quinase dependente de cálcio/calmodulina II e IV (CAMKII/IV), (HARDINGHAM & BADING, 1998).

O receptor MC1R, de humanos e camundongos, consiste de 317 e 315 amino ácidos, respectivamente, e compartilham 76% de homologia na sequência de amino ácidos (CHHAJLANI & WIKBERG, 1992; MOUNTJOY et al., 1992). MC1R é expresso na superfície celular de melanócitos de mamíferos e possui alta afinidade por α -MSH e ACTH (MOUNTJOY et al., 1992; CHHAJLANI et al., 1993).

FIGURA 4: Mecanismo de ação celular das melanocortinas (Extraído de HADLEY & LUEVANO, 1999).

A modulação da síntese de eumelanina por melanócitos é regulada primariamente por α -MSH, enquanto a síntese de feomelanina é principalmente regulada pela ligação de um agonista inverso, proteína de sinalização agouti (ASP, *agouti signalling protein*) (LOGAN et al., 2003; ABDEL-MALEK et al., 2007). ASP é o antagonista fisiológico de MC1R, agindo como um inibidor competitivo de α -MSH ligando-se neste receptor e bloqueando a produção de eumelanina induzida por α -MSH (LU et al., 1994).

Tirosinase, a enzima chave da melanogênese

A melanogênese é regulada por uma família de proteínas melanossômicas, que compreende a tirosinase e as proteínas relacionadas à tirosinase 1 e 2 (TRP-1 e TRP-2, respectivamente). A síntese de melanina pode ser controlada por fatores não enzimáticos como pH (BHATNAGAR et al., 1993; MOELLMAN et al., 1998), tiols (PROTA, 1992; ITO, 1993) e íons metálicos (PALUMBO et al., 1991; SHIBATA et al., 1993).

A síntese de eumelanina inicia-se pela hidroxilação de tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), pela ação da tirosinase. A mesma enzima catalisa a oxidação de DOPA a DOPAquinona que rapidamente sofre endociclicização a leucoDOPAcromo (PROTA, 1992) e oxidação espontâneas e gera monômeros altamente reativos de 5,6-dihidroxiindol (DHI), ou é rearranjado pela ação da DOPAcromo tautomerase (TRP-2) para formar 5,6-dihidroxiindol-2- ácido carboxílico (DHICA) (LEONARD et al., 1988; AROÇA et al., 1990; PALUMBO et al., 1991).

A eumelanina é gerada a partir da polimerização de DHICA, pela ação da DHICA oxidase (TRP-1), ou de DHI, pela ação da tirosinase (DEL MARMOL & BEERMAN, 1996). A incorporação de DHICA em maior proporção do que DHI em polímeros de eumelanina resulta na formação de pigmento marrom claro solúvel ao invés de marrom escuro insolúvel (ORLOW et al., 1992).

A produção de feomelanina é determinada pela quantidade de compostos sulfidrílicos, cisteína e glutatona, presentes no melanossomo. Uma vez disponíveis, estes compostos combinam-se não enzimaticamente com DOPAquinona formando cisteinilDOPA. Esta, por oxidação espontânea, gera derivados de benzotiazina, que são polimerizados originando a feomelanina (OZEKI et al., 1996).

O gene que codifica a tirosinase humana está localizado no cromossomo 11 (HEARING & TSUKAMOTO, 1991) e é composto por 5 exons e 4 introns (PONNAZHAGAN et al., 1994). A tirosinase é uma enzima que contém cobre, sendo sintetizada como uma proteína de 55 kDa com ponto isoelétrico de aproximadamente 4,2. Após a glicosilação, o peso molecular da proteína alcança de 65-75 kDa (ou ainda acima de 80 kDa) (HEARING & TSUKAMOTO, 1991; CHEN et al., 1995).

JUSTIFICATIVA

Opsinas, como a melanopsina e a rodopsina, além de presentes na retina, podem ser expressas em células pigmentares cutâneas, intermediando foto-respostas de proliferação (IM et al., 2006; FARHAT et al., 2009) e de dispersão de melanossomos (MORIYA et al., 1996; ROLLAG, 1996; ISOLDI et al., 2005). Até o momento não se conhecem os mecanismos de regulação dessas opsinas em células pigmentares de vertebrados.

Considerando que o α -MSH apresenta importante função na modulação da melanogênese, sendo responsável pelo escurecimento de todos os vertebrados estudados até o presente (NERY & CASTRUCCI, 1997; CASTRUCCI & ISOLDI, 2007), faz-se necessária a realização de estudos que verifiquem os mecanismos de controle desse hormônio e os efeitos temporais e dose-dependentes sobre a rodopsina, tirosinase e o receptor MC1R em células pigmentares de *Mus musculus*.

OBJETIVOS

Geral

Verificar se a expressão gênica da rodopsina, tirosinase e do receptor MC1R em célula pigmentar de vertebrados pode ser modulada por α -MSH e se esse sistema está conservado ao longo da evolução.

Específico

Verificar os efeitos temporais e dose-dependentes de α -MSH sobre a expressão gênica da rodopsina, tirosinase e do receptor de α -MSH, subtipo MC1R, em melanócitos de *Mus musculus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células

A linhagem de melanoma murino B-16 foi mantida em meio RPMI (Cultilab, Campinas, Brasil), complementado com 14,3mM de NaHCO₃, 15mM de Hepes, 10% de soro fetal bovino (Cultilab), pH 7,2, em estufa úmida a 37°C, 5% de CO₂ em escuro. O meio de cultura foi trocado a cada 48h e as células subcultivadas (1:3) quando atingiram a confluência nos frascos. Para tanto foram removidas com solução de Tyrode/EDTA e transferidas a novos frascos.

Verificação do padrão temporal de expressão de rodopsina, tirosinase e do receptor de MSH, MC1R, na presença e na ausência de α -MSH

As células foram semeadas (10^6 células por frasco de 25cm²), em meio contendo 10% soro e mantidas em escuro constante por 1 dia. No 2° dia as células mantidas em escuro constante foram tratadas por 24h com α -MSH 10^{-7} M, 10^{-8} M ou 10^{-9} M (Sigma, St. Louis, MO, USA), mantendo-se em paralelo células controle na ausência do hormônio. No dia seguinte ao final do tratamento, o RNA total foi extraído a cada 4 horas, durante 24 horas.

Extração de RNA total, RT-PCR e PCR quantitativo

Após o descarte do meio, adicionou-se 1 mL de Tri-Reagent-LS (Sigma Chem. Co., MO, EUA) ou Trizol (Gibco) diretamente sobre as células. O lisado celular foi coletado e incubado por 5min à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação das proteínas nucleares. Adicionaram-se 200 μ L de bromo cloropentano (Sigma Chem. Co., MO, EUA) e, em seguida, as amostras foram agitadas vigorosamente por 15seg. Após incubação por 10min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15min a 4° C, separando-se a seguir a fase superior aquosa, que contém RNA. O RNA foi precipitado com a adição de 650 μ L de isopropanol (Sigma Chem. Co., MO, EUA) por 10min à temperatura ambiente, seguindo-se centrifugação a 12.000 x g por 35min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o RNA lavado com 1,3 mL de etanol 75%, seguindo-se centrifugação a 12.000 x g por 15min a 4° C. A lavagem com etanol

75% foi repetida, sendo as amostras colocadas a -80°C por no mínimo 1h. Após nova centrifugação, o etanol foi descartado e o precipitado de RNA evaporado à temperatura ambiente, ressuspendido em 20uL de água tratada com dietil pirocarbonato (H₂O/DEPC, Ambion Inc, TX, EUA) e tratado com DNase conforme instruções do fabricante (turbo-DNA-free™, Ambion Inc., TX, EUA). Resumidamente, a cada amostra foram adicionados 10% de volume do tampão para DNase I e 1uL de DNase I. A seguir, as amostras foram incubadas por 30min a 37°C. Foram acrescentados 10% do volume de reagente de inativação, seguido por incubação por 2min à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 x g por 2min para precipitar o reagente de inativação com a DNase, transferindo-se o sobrenadante contendo o RNA para novo *ependorf*.

A concentração de RNA foi determinada por leitura da absorbância a 260nm em espectrofotômetro (Nanodrop) e RT-PCR realizado com 1ug de RNA total, utilizando 1uL de oligonucleotídeos randômicos (50ug/uL) e 1uL de dNTPs 10mM (Gibco-BRL, CA, EUA), em reação com volume final de 13uL ajustado com H₂O/DEPC. As amostras foram aquecidas por 5min a 65° C e a seguir transferidas para cuba com gelo, adicionando-se 4uL de tampão para PCR (5x), 1uL de DTT (0,1 M), 1uL de inibidor de ribonuclease (40 U/uL) e 1uL da enzima Superscript III (200U/uL, Invitrogen, CA, EUA), para um volume final de 20uL. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada por 5 minutos a 25°C, e a seguir por 50 minutos a 50°C. A reação foi inativada por incubação a 70°C por 15 minutos. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subsequentes de PCR quantitativo (em tempo real).

As reações de PCR em tempo real foram feitas através de protocolos distintos. As reações de PCR em tempo real para protocolo multiplex foram feitas com pares de *primers* e sonda específicos para rodopsina e receptor MC1R de *Mus musculus* (desenhados pelo programa Primer Express, Applied Biosystems, U.S.A.) (TABELA I). Foi utilizado RNA 18S como normalizador (*house-keeping gene*) dos experimentos. Para tirosinase, foi usado um par de *primers* específicos, também desenhados pelo programa Primer Express (TABELA I), e a amplificação verificada pela incorporação do fluoróforo SYBR Green, sendo a reação com RNA 18S feita em poços separados.

TABELA I: Sequências de *primers* e sondas utilizados nos ensaios de PCR quantitativo

Primer	Sequência	Seletividade
Forward	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	RNA 18S
Reverse	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	RNA 18S
Probe	5'-5- <i>TexRd</i> -TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC-3BHQ_2-3'	RNA 18S
Forward	5'-TGCCACACTTGGAGGTGAAA-3'	rodopsina de <i>M. musculus</i>
Reverse	5'-ACCACGTAGCGCTCAATGG-3'	rodopsina de <i>M. musculus</i>
Probe	5'-6-FAM-CGCCCTGTGGTCCCTGGTGG-BHQ1-3'	rodopsina de <i>M. musculus</i>
Forward	5'-GGAGAATGTGCTGGTTGTGATAG-3'	MC1R de <i>M. musculus</i>
Reverse	5'-CCAGGCAGCAGATGAAGTAATAC-3'	MC1R de <i>M. musculus</i>
Probe	5'-HEX-AAACCGCAACCTGCACTCGCCCA-BHQ1-3'	MC1R de <i>M. musculus</i>
Forward	5'-TCCTCCTGGCAGATCATTTGT-3'	tirosinase de <i>M. musculus</i>
Reverse	5'-TGGTCCCTCAGGTGTTCCA-3'	tirosinase de <i>M. musculus</i>

A solução para os ensaios de PCR multiplex continham *primers* (300nM para rodopsina e MC1R e 50nM para RNA 18S), sondas (200nM para rodopsina e MC1R e 50nM para 18S), Supermix 2X (KCl 100mM, Tris-HCl 40mM, dNTPs 1,6mM, iTaq DNA polimerase 50U/mL e MgCl₂ 6mM, BioRad, CA, EUA) suplementado para 400uM de dNTPS, 6mM de MgCl₂ e 0,1 U/uL de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, CA, EUA), e H₂O para volume final de 29uL/poço. Todos os ensaios foram realizados em um termociclador iCycler (BioRad), nas seguintes condições: 7min a 95°C seguido por 45 ciclos de 30seg a 95°C e 30seg a 55°C.

Para PCR por SYBR Green soluções independentes para o gene da tirosinase e RNA 18S foram feitas, contendo, respectivamente, 300nM de *primers* para tirosinase, 50nM para RNA 18S e mix para SYBR Green 2X (BioRad, CA, EUA) e H₂O para volume final de 23ul/poço. Todos os ensaios foram realizados em um termociclador iCycler (BioRad), nas seguintes condições: ciclo 1: 1x 50°C por 2 min, ciclo 2: 1x 95°C por 8min e 30seg, ciclo 3: 40x 95°C por 15seg, 60°C por 1min, ciclo 4: 1x 95°C por 1min, 1x 55°C por 1min, ciclo 5: 80x 55°C por 10seg, com um aumento gradativo de 0,5°C. Controles negativos foram incluídos rotineiramente, feitos sem cDNA.

Análise estatística

A análise dos dados foi feita pela comparação entre números de ciclos dos poços controle e experimentais (células tratadas com hormônio), ou entre diferentes tempos, obtidos passando-se uma reta denominada limiar entre as porções de crescimento geométrico das curvas. Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (C_T), foi encontrado o ΔC_T que é a diferença entre os valores médios do gene de interesse e do RNA 18S. A seguir, foram subtraídos os valores médios encontrados para os poços tratados da média dos poços controle, obtendo-se o $\Delta\Delta C_T$. Colocando-se esse valor como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) obtivemos o número de vezes que o gene está expresso após o tratamento em questão em relação ao controle. Nos experimentos temporais, sem tratamento hormonal, foi considerado controle o valor médio de menor expressão. Os resultados foram normalizados, estabelecendo-se o número de vezes em que o gene está expresso no grupo controle (menor valor do grupo controle), como correspondendo a 100% da expressão. Para determinar os níveis de significância das possíveis diferenças entre os ZTs e aquelas induzidas pelo tratamento hormonal em relação ao controle, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA TWO-WAY), seguida por Bonferroni. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$. Para determinar a probabilidade de uma variação temporal ser resultante de um componente circadiano, os dados foram analisados por Cosinor modificado, Cosana (BENEDITO-SILVA, 2003, baseado em Cosinor, MONK & FORT, 1983), usando estimativa não linear dos mínimos quadrados (HAUS et al., 1972). Previamente ao ajuste, todos os dados foram normalizados e uma função coseno foi aplicada. Para determinar a significância de cada curva ajustada para cada gene em cada condição experimental um teste de probabilidade foi empregado para testar a hipótese nula de amplitude (linha reta). O ajuste ao período foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$ ($R \geq 75\%$).

RESULTADOS

Ensaio hormonal

Quantificação dos níveis do RNAm para MC1R

A análise de RNAm do receptor MC1R nas amostras temporais dos grupos controle por One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey indicou diferenças significativas entre a hora 0 (a) comparada com as horas 4 e 20 (b, pontos de menor valor) ($n=10$ $p= 0,0138$) (Fig. 1). Nos grupos tratados com α -MSH 10^{-7} M e 10^{-8} M pelo período de 24 horas em regime de escuro constante, a análise por One-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey ($n=4$) não indicou diferenças significativas entre os pontos (Fig. 2 e 3 respectivamente). No grupo tratado com α -MSH 10^{-9} M observou-se diferença na hora 12 (a) em relação a todos os pontos temporais (b) ($n=4$ $p= 0,0051$) (Fig. 4).

Observou-se uma tendência de diminuição da expressão dos níveis de RNAm para o receptor no grupo tratado por α -MSH 10^{-7} M quando comparado ao grupo controle. No entanto, o teste t não apontou diferença significativa entre as amostras controle e tratada para cada hora analisada isoladamente (Fig. 5). Já o tratamento com α -MSH na concentração de 10^{-8} M apresentou um aumento significativo do transcrito para o receptor na hora 20 (*, $p= 0,0359$) quando comparado ao seu controle (Fig. 6), evidenciado através do teste t. Contudo, na concentração de 10^{-9} M o tratamento apresentou uma significativa inibição do transcrito para o receptor entre as amostras controle e tratada para todos os pontos temporais analisados isoladamente (Fig. 7).

FIGURA 1: PCR quantitativo para MC1R em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, no grupo controle, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média (n=10), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey apontou diferença significativa ($p= 0,0138$) na hora 0 (a) em relação às horas 4 e 20 (b).

FIGURA 2: PCR quantitativo para MC1R em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, tratadas com α -MSH na concentração 10^{-7} M por 24 horas, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média ($n=4$), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. A análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey não apontou diferença significativa entre os pontos temporais.

FIGURA 3: PCR quantitativo para MC1R em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, tratadas com α -MSH na concentração 10^{-8} M por 24 horas, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média ($n=4$), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. A análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey não apontou diferença significativa entre os pontos temporais.

FIGURA 4: PCR quantitativo para MC1R em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, tratadas com α -MSH na concentração 10^{-9} M por 24 horas, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média ($n=4$), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey apontou diferença significativa ($p= 0,0051$) na hora 12 (a) em relação a todos os outros pontos temporais (b).

FIGURA 5: PCR quantitativo para MC1R em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média, $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. O teste t não apontou diferença significativa entre as amostras controles e as tratadas para cada hora analisada isoladamente.

FIGURA 6: PCR quantitativo para MC1R em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média, $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. O teste t apontou diferença significativa ($p = 0,0359$) na hora 20 (*) entre as amostras controle e tratada.

FIGURA 7: PCR quantitativo para MC1R em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média, $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. O teste t apontou diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os pontos temporais (*) entre as amostras controle e as tratadas.

Quantificação dos níveis do RNAm para rodopsina

A análise das amostras temporais de RNAm da rodopsina no grupo controle por One-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey indicou diferenças significativas entre a hora 16 (a) comparada às horas 4, 12 e 20 (b), pontos temporais de menor valor ($n=10$ $p= 0,0024$) (Fig. 8). Nos grupos tratados com α -MSH 10^{-7} M e 10^{-8} M pelo período de 24 horas em regime de escuro constante, a análise por One-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey ($n=4$) não indicou diferenças significativas entre os pontos (Fig. 9 e 10 respectivamente). No grupo tratado com α -MSH 10^{-9} M, houve diferença significativa na hora 12 (a) em relação a todos os pontos temporais (b) ($n=4$ $p= 0,0001$) (Fig. 11).

O test t, no entanto, apontou uma diminuição significativa da expressão dos níveis de RNAm para a rodopsina no grupo tratado por α -MSH 10^{-7} M no ponto 0 (*, $p= 0,0294$) e no ponto 16 (*, $p= 0,0069$) quando comparados aos respectivos

controles (Fig. 12). Já as células tratadas com α -MSH 10^{-8} M apresentaram um aumento significativo na hora 4 (*, $p= 0,0301$) (Fig. 13), quando comparada ao respectivo controle. Não obstante, na concentração de 10^{-9} M o tratamento também apresentou um significativo aumento do transcrito para a rodopsina entre as amostras controle e tratada para todos os pontos temporais analisados isoladamente (Fig. 14).

FIGURA 8: PCR quantitativo para rodopsina em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, no grupo controle mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média ($n=10$), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey apontou diferença significativa ($p= 0,0024$) na hora 16 (a) em relação às horas 4, 12 e 20 (b).

FIGURA 9: PCR quantitativo para rodopsina em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, tratadas com α -MSH na concentração 10^{-7} M por 24 horas, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média ($n=4$), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. A análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey não apontou diferença significativa entre os pontos temporais.

FIGURA 10: PCR quantitativo para rodopsina em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, tratadas com α -MSH na concentração 10^{-8} M por 24 horas, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média ($n=4$), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. A análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey não apontou diferença significativa entre os pontos temporais.

FIGURA 11: PCR quantitativo para rodopsina em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, tratadas com α -MSH na concentração 10^{-9} M por 24 horas, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média ($n=4$), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey apontou diferença significativa ($p= 0,0001$) na hora 12 (a) em relação a todos os pontos temporais (b).

FIGURA 12: PCR quantitativo para rodopsina em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média, $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. O teste t apontou diferença significativa no ponto 0 (*) ($p= 0,0294$) e no ponto 16 (*) ($p= 0,0069$) entre as amostras controle e tratada.

FIGURA 13: PCR quantitativo para rodopsina em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média, $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. O teste t apontou diferença significativa na hora 4 (*) ($p=0,0301$) entre as amostras controle e tratada.

FIGURA 14: PCR quantitativo para rodopsina em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média, $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. O teste t apontou diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os pontos temporais (*), entre as amostras controle e tratada.

Quantificação dos níveis do RNAm para tirosinase

A análise de RNAm de tirosinase nas amostras controle por One-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey indicou diferença significativa entre a hora 0 (a) comparada com a hora 8 (b), ponto temporal de menor valor ($n=8$, $p= 0,0483$) (Fig. 15). Nos grupos tratados com α -MSH 10^{-7} M e 10^{-8} M pelo período de 24 horas em regime de escuro constante, a análise por One-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey ($n=4$) não indicou diferenças significativas entre os pontos (Fig. 16 e 17 respectivamente). Na concentração de α -MSH 10^{-9} M, apareceram diferenças significativas ($p= 0,0030$) entre a hora 12 (a) e todos os outros pontos temporais (b).

O emprego do teste t apontou uma diminuição significativa (*, $p= 0,0322$) no transcrito de RNA para tirosinase no ponto 0 na amostra tratada com α -MSH 10^{-7} M, quando comparada ao seu respectivo controle (Fig. 19). Já as células tratadas com α -MSH 10^{-8} M apresentaram um aumento significativo na hora 8 (*, $p= 0,0278$), quando comparadas ao respectivo controle (Fig. 20). O teste t apontou diferença

significativa na hora 8 ($p= 0,0184$) (*) e na hora 12 ($p= 0,0002$) (*) entre as amostras tratadas com α -MSH 10^{-9} M e seu respectivo controle (Fig. 21).

FIGURA 15: PCR quantitativo para tirosinase em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, no grupo controle mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média ($n=12$), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey apontou diferença significativa ($p= 0,0261$) na hora 0 (a) em relação à hora 8 (b).

FIGURA 16: PCR quantitativo para tirosinase em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, tratadas com α -MSH na concentração 10^{-7} M por 24 horas, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média ($n=4$), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. A análise por One-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey não apontou diferença significativa entre os pontos temporais.

FIGURA 17: PCR quantitativo para tirosinase em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, tratadas com α -MSH na concentração 10^{-8} M por 24 horas, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média ($n=4$), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. A análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey não apontou diferença significativa entre os pontos temporais.

FIGURA 18: PCR quantitativo para tirosinase em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, tratadas com α -MSH na concentração 10^{-9} M por 24 horas, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média ($n=4$), $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. Análise por One-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey apontou diferença significativa ($p= 0,0030$) na hora 12 (a) em relação a todos os outros pontos temporais (b).

FIGURA 19: PCR quantitativo para tirosinase em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média, $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. O teste t apontou diferença significativa ($p=0,0327$) na hora 0 (*) entre a amostra tratada e seu respectivo controle.

FIGURA 20: PCR quantitativo para tirosinase em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média, $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. O teste t apontou diferença significativa ($p=0,0183$) na hora 8 (*) entre a amostra tratada e seu respectivo controle.

FIGURA 21: PCR quantitativo para tirosinase em células de melanoma B16 de *Mus musculus*, mantidas em regime de escuro constante. Os valores são a média, $\pm$ erro padrão, em porcentagem do menor valor encontrado no grupo controle. O teste t apontou diferença significativa na hora 8 ($p= 0,0184$) (*) e na hora 12 ($p= 0,0002$) (*) entre as amostras tratadas e seus respectivos controles.

RESUMO DOS RESULTADOS

- A expressão do gene MC1R não foi modulada na concentração de α -MSH 10^{-7} M. Na concentração de 10^{-8} M, observou-se um aumento no nível do transcrito na hora 20 quando comparado ao grupo controle e na concentração de 10^{-9} M o tratamento inibiu os níveis do transcrito entre o grupo controle e o tratado.
- Na concentração de 10^{-7} M, α -MSH inibiu a expressão do gene da rodopsina na hora 0 e 16 quando comparado ao grupo controle. Na concentração de 10^{-8} M houve um aumento nos níveis do transcrito na hora 4 quando comparado ao grupo controle. Já, na concentração de 10^{-9} M, o hormônio induziu um robusto aumento no nível do transcrito quando comparado ao grupo controle.
- O mesmo padrão foi observado para a tirosinase, demonstrando uma diminuição na concentração de 10^{-7} M na hora 0 e um aumento significativo na concentração de 10^{-8} M na hora 8 e na concentração de 10^{-9} M na hora 12 e 8.

DISCUSSÃO

A pigmentação em mamíferos é regulada por mais de 120 genes, entre estes, o locus de MC1R que codifica o receptor de melanocortina 1 acoplado a proteína G, expresso na membrana celular dos melanócitos (Rouzaud & Hearing, 2005), de células da hipófise, leucócitos, mastócitos e pró-monócitos, sugerindo várias funções ainda não elucidadas (Rouzaud et al., 2005).

A ligação do α -MSH (agonista) ao receptor MC1R promove a sua ativação desencadeando a cascata de sinalização intracelular com ativação de enzimas, como adenilil ciclase, que irá aumentar os níveis de AMPc, de modo que a via de sinalização mediada por AMPc é considerada a principal via do receptor MC1R ativado e o maior regulador de produção de melanina (Abdel-Malek & Supp, 2008; Rouzaud & Hearing, 2005; Sanches-Más et al., 2005). Em peixes teleósteos, como *Danio rerio*, o receptor MC1R possui um papel semelhante àquele encontrado em mamíferos, pois afeta a distribuição e síntese de melanina e pode ainda afetar a síntese de outros tipos de pigmentos em células pigmentares não melânicas. Nesses animais, ectotérmicos, pode ocorrer uma rápida redistribuição dos pigmentos no interior das células pigmentares mediada por α -MSH (hormônio α -melanócito estimulante) e MCH (hormônio agregador de melanina, este último só em peixes) (Richardson et al., 2008).

O presente trabalho demonstrou que o tratamento com α -MSH 10^{-7} M, pelo período de 24 horas em regime de escuro constante, não modula os níveis de RNAm para o receptor MC1R na linhagem celular pigmentar B16 de *Mus musculus*, embora tenha sido evidenciada uma tendência de diminuição no grupo tratado. Interessantemente, os dados da literatura apontam uma divergência dos resultados quanto à regulação do transcrito para o receptor em presença do seu agonista. Rouzaud e colaboradores (2003) demonstraram que os níveis de transcrição de RNAm para o receptor MC1R, mensurado através de um ensaio semi-quantitativo em tempo real (RT-PCR), são aumentados significativamente em melanócitos Melan-A tratados com α -MSH 10^{-7} M por 4 dias, período bem mais longo que o utilizado por nós.

Já o tratamento com α -MSH 10^{-8} M foi capaz de modular os níveis de RNAm para o receptor MC1R na hora 20, observando-se um aumento no nível do transcrito

quando comparado ao grupo controle. Como os níveis de RNAm encontrados no grupo experimental tratado com α -MSH 10^{-8} M diferiram significativamente do grupo controle, é possível ter havido uma estimulação da via de sinalização do AMPc com conseqüente aumento da transcrição de RNAm para o receptor.

Newton e colaboradores (2007) demonstraram que o tratamento de melanócitos humanos com NDP-MSH (um análogo sintético não degradável do α -MSH) 20nM por 1 hora aumentou os níveis do transcrito para o receptor, resposta esta, que persistiu por até 24 horas após o tratamento. Contudo, este aumento foi moderado, sugerindo que o potencial de regulação positiva da expressão do receptor MC1R pode ser limitado. A elevação da expressão foi demonstrada ser AMPc-dependente cuja cascata de sinalização culminaria com a promoção da transcrição e mobilização de fatores de transcrição que poderiam interagir com a região promotora proximal do gene do receptor ativando seu promotor e, conseqüentemente, promovendo a transcrição do RNAm para o receptor.

Contudo, o tratamento com α -MSH 10^{-9} M apresentou uma significativa inibição da expressão do RNAm do receptor quando comparado o grupo experimental com o seu respectivo controle para todos os pontos temporais analisados. Wong e Minchin (1996) demonstraram que o tratamento de melanócitos B16 de *Mus musculus* com NDP-MSH 10^{-6} M por 90 min apresentou um efeito regulatório negativo, diminuindo os níveis do transcrito para o receptor, assim como a sua presença na superfície da membrana, por até 96 horas após a remoção do hormônio quando comparado ao seu controle, evidenciando, segundo os autores, uma dessensibilização do receptor quando tratado nestas condições.

Em humanos, a dessensibilização dos receptores de melanócitos é mais eficiente com a concentração do agonista correspondendo a uma grande ocupação dos receptores, enquanto que na linhagem celular B16 de camundongos a dessensibilização ocorre em concentrações correspondendo a uma ocupação muito baixa dos receptores (Sánchez-Más et al., 2005).

Como os níveis de RNAm encontrados no grupo experimental tratado com α -MSH 10^{-7} M não foram diferentes do grupo controle, é possível ter havido uma dessensibilização dose-dependente dos receptores após o período de 24 horas de exposição ao tratamento.

Sánchez-Mas e colaboradores (2005) demonstraram que a dessensibilização dos receptores é mediada, pelo menos parcialmente, por uma família específica de serina/treonina quinases denominadas GRKs que possuem a capacidade de reconhecer receptores ocupados. O receptor fosforilado pode então interagir com proteínas da família das arrestinas, que desacoplam o complexo MC1R da proteína G e, junto com outras proteínas, seqüestram o receptor internalizando-o e levando a ativação de novos eventos de sinalização.

Concomitantemente a internalização e degradação dos receptores, ocorre uma queda dos níveis de AMPc mediada por uma fosfodiesterase, que leva a menor ativação da tirosinase, bem como queda na transcrição da mesma pelo fator CREB e a diminuição da transcrição de RNAm para o próprio receptor MC1R.

Deste modo, os dados sugerem que a regulação do transcrito para o receptor em presença do seu agonista é temporal, dose-dependente e bi-modal, aumentando ou diminuindo os níveis do transcrito conforme a concentração do hormônio, e não apresentando alteração quando o hormônio foi acrescentado em doses maiores.

Por sua vez a presença do agonista α -MSH foi capaz de modular os níveis de RNAm para tirosinase, observando-se uma diminuição no nível do transcrito na concentração de 10^{-7} M na hora 0 e um aumento nas concentrações de 10^{-8} M na hora 8 e principalmente 10^{-9} M nas horas 8 e 12, quando comparado ao seu controle.

A tirosinase, TRP-1 (proteína relacionada à tirosinase 1) e dopacromo tautomerase são uma família de proteínas melanossômicas que modulam a melanogênese, convertendo tirosina em pigmentos de melanina (Cheli et al., 2009). Após a ligação de α -MSH a MC1R, a proteína G α ativa a adenililciclase, levando ao aumento dos níveis de AMPc, mensageiro para a via de síntese de melanina. A proteína quinase A (PKA) é então ativada, fosforilando a tirosinase, aumentando assim sua atividade catalítica e, portanto a melanogênese (Sato et al., 2007). Há evidências de que α -MSH também estimula a síntese de novo da tirosinase (Abdel-Malek et al., 1995), através do fator de transcrição CREB. O fator de transcrição CREB, quando fosforilado por PKA, liga-se especificamente a CRE (Haus-Seuffert & Meisterernst, 2000), seqüência específica presente no promotor do gene da tirosinase e ativa sua transcrição. Além da fosforilação por PKA, CREB pode ser fosforilado por quinase dependente de cálcio/calmodulina II e IV (CAMKII/IV) (Hardingham & Bading, 1998).

Como o tratamento com α -MSH 10^{-7} M apresentou uma significativa diminuição do transcrito de RNAm para o grupo tratado, ao passo que o tratamento por α -MSH 10^{-8} M e 10^{-9} M exibiu um significativo aumento, os dados sugerem que o mecanismo de regulação da expressão gênica para a tirosinase pode se encontrar atrelado a modulação presente para o receptor. Deste modo o tratamento na concentração de 10^{-7} M poderia estar levando a uma dessensibilização do receptor MC1R diminuindo, então, os níveis de AMPc e conseqüentemente a atividade catalítica da tirosinase bem como a síntese de novo da tirosinase. Já na concentração de 10^{-8} M o inverso poderia estar acontecendo, uma vez que há uma maior expressão dos receptores os níveis de AMPc estariam elevados ativando toda a cascata de sinalização que culminaria com o aumento da atividade catalítica da tirosinase bem como maior ativação do fator de transcrição CREB. Curiosamente, na concentração de 10^{-9} M observa-se um acentuado aumento da expressão, embora o receptor esteja fortemente inibido, sendo possível que após 24 horas de tratamento as respostas gênicas para a tirosinase estejam no seu pico.

Resposta semelhante foi encontrada para a rodopsina, onde a presença do agonista α -MSH foi capaz de modular os níveis do RNAm, observando-se uma diminuição no nível do transcrito na concentração de 10^{-7} M na hora 0 e 16 e um aumento nas concentrações de 10^{-8} M na hora 4. Na concentração de 10^{-9} M, o hormônio induziu robusto aumento em todos os pontos temporais analisados, quando comparados aos respectivos controles.

α -MSH, assim como endotelinas-1 (ET-1), é sintetizado por vários tipos de células da pele, apresentando ações mitogênica e melanogênica. A ativação do receptor MC1R por α -MSH induz uma elevação de AMPc, que além de interagir com PKA, também pode estimular a atividade de IP_3 quinase (PI_3K) que resulta em uma elevação dos níveis de PIP_3 e inositol 3,4-bifosfato, Akt/PKB (uma serina/treonina quinase) e a ativação de MAP quinases (MAPKs) ERK1/2 com subsequente transcrição do fator CREB (Rouzaud et al., 2005).

Nossos resultados são pioneiros em demonstrar a modulação de rodopsina por α -MSH, pois não há dados na literatura, seja em retina ou em outros tecidos, que tenham investigado essa ação do hormônio melanotrópico. Igualmente, também não há dados disponíveis na literatura que elucidem os mecanismos de sinalização

celular para modulação dos níveis de RNAm para rodopsina, promovido pela interação entre o receptor MC1R acoplado a proteína G_s em ligação ao seu agonista.

Contudo, a modulação da transcrição de rodopsina por ET-1 foi verificada em células B16 e GEM-81 de *Carassius auratus* (Lopes et al., 2010). Em melanoma B16, a ativação de G_q leva a ativação de PLC que uma vez ativada cliva o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato em IP_3 e diacilglicerol (DAG). O IP_3 por sua vez liga-se a canais de Ca^{2+} regulados por IP_3 presentes no retículo endoplasmático, que então permitem a passagem do Ca^{2+} estocado no retículo para o citosol. O Ca^{2+} liberado do retículo poderia ligar-se à proteína calmodulina, que atua como transdutora do sinal citosólico de Ca^{2+} , sendo que o complexo Ca^{2+} /calmodulina possui a capacidade de ligar-se a proteínas-alvo, tais como a quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina. O aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular induzido por IP_3 faz com que a PKC se desloque do citosol para a face citoplasmática da membrana celular, onde é ativada por DAG (Lopes et al., 2010).

Esta cascata de sinalização culminaria com a promoção da transcrição e mobilização de fatores de transcrição que poderiam interagir com a região promotora proximal do gene da rodopsina ativando seu promotor e, consequentemente, promovendo a transcrição do RNAm para rodopsina nos melanócitos B16.

Já na linhagem GEM-81 a ativação de uma isoforma de PKC independente de cálcio poderia estar fosforilando diretamente fatores que levam à fosforilação de ERK, culminando com a transcrição e mobilização de fatores de transcrição, além de um fator de transcrição semelhante ao presente em mamíferos. Esses fatores já ativados poderiam ligar-se a região promotora proximal do gene da rodopsina, ativando seu promotor e, consequentemente, promovendo a transcrição do RNAm para rodopsina (Lopes et al., 2010).

Como discutido anteriormente, o AMPc pode afetar diferentes substratos entre eles as MAPKs. A fosforilação direta de ERK promovida pelo aumento de AMPc poderia estar atuando de modo semelhante ao encontrado na linhagem GEM-81. Assim, após a ativação do receptor MC1R por α -MSH e conseqüente ativação da adenililciclase, duas possíveis vias estariam sendo moduladas: 1) uma que irá favorecer a cascata de PKA com subsequente aumento no transcrito de RNAm para o próprio receptor e atividade tirosinásica, além da formação de novo da tirosinase através do fator CREB de transcrição e 2) ativação da via das MAPKs que irá

culminar com a transcrição do RNAm da rodopsina. É importante ressaltar, porém, que um estudo minucioso seria necessário para elucidar os reais mecanismos por trás desta cascata de sinalização além da caracterização de elementos responsivos aos fatores de transcrição na região promotora destes genes. Ainda, embora a concentração de 10^{-7} M evoque uma significativa diminuição para os transcritos de quase todos os genes analisados e a concentração de 10^{-8} M um aumento significativo (em relação aos respectivos controles) é possível que todo o sistema esteja saturado devido não somente as concentrações utilizadas, mas como o tempo de exposição das células experimentais ao α -MSH, tal suposição é corroborada ao se comparar os dados com a concentração de 10^{-9} M.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MALEK, Z. *et al.* Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. ***Proc Natl Acad Sci***, v.92, p. 1789–1793, 1995.

ABDEL-MALEK, Z.A.; SUPP, D. β -Defensin 3: a novel and unexpected key that unlocks the melanocortin 1 receptor. ***Pigment Cell Melanoma Res***, v. 21, p. 7-8, 2008.

ALBERTS, B. *et al.* ***Molecular Biology of the Cell***. New York: ed. Garland Publishing, Inc, 2004. p. 721-783.

AROCA, P. *et al.* Regulation of distal mammalian melanogenesis I. Partial purification and characterization of a dopachrome converting factor: dopachrome tautomerase. ***Biochem Biophys Acta***, v.1035, p. 266-275, 1990.

BAGNARA, J.T.; HADLEY, M.E. ***Chromatophores and Color Change***. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, 304p, 1973.

BALDO, M.V.C. Visão. In: AIRES, M.M. (Coord.) ***Fisiologia***. Rio de Janeiro: ed. Guanabara-Koogan, 2008. p. 245-276.

BAN, E. *et al.* The signaling pathways in photoresponses that may be mediated by visual pigments in erythrophores of Nile tilapia. ***Pigment Cell Res***, v.18, p. 360-369, 2005.

BARR, L. Photomechanical coupling in the vertebrate sphincter pupillae. ***CRC Crit Rev Neurobiol***, v. 4, p. 325-366, 1989.

BENEDITO-SILVA, A.A. Aspectos metodológicos da cronobiologia. IN: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L.S. (Eds) ***Cronobiologia princípios e aplicações***. São Paulo: ed. EDUSP, 2003. p. 297-320.

BERSON, D.M. *et al.* Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. **Science**, v. 295, p.1070-1073, 2002.

BHATNAGAR, V. *et al.* pH of melanosome of B16 murine melanoma is acidic: its physiological importance in the regulation of melanin biosynthesis. **Arch Biochem Biophys**, v. 307, p. 183-187, 1993.

BOISSY, R.A. The melanocyte. Its structure, function, and subpopulations in skin, eyes, and hair. **Clin Dermatol**, v. 6, n. 2, p. 161-73, 1988.

CASTRUCCI, A.M.L.; ISOLDI, M.C. Sinalização Celular. In: AIRES, M.M. (Coord.) **Fisiologia**. Rio de Janeiro: ed. Guanabara-Koogan, 2008. p. 59-89.

CHAKRABORTY, A.K. *et al.* UV light and MSH receptors. **Ann N Y Acad Sci**, v. 885, p. 100-16, 1999.

CHHAJLANI, V. *et al.* Molecular cloning of a novel human melanocortin receptor. **Biochem Biophys Acta**, v. 195, p. 866–873, 1993.

CHHAJLANI, V.; WIKBERG, J.E. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. **FEBS Letters**, v. 309, p. 417–420, 1992.

DEL MARMOL, V.; BEERMAN, F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. **FEBS Letters**, v. 381, p. 165-168, 1996.

FARHAT, F.P. *et al.* Melanopsin and clock genes: regulation by light and endothelin in the zebrafish ZEM-2S cell line. **Chronobiol Int**, v. 26(6), p. 1090-119, 2009.

FUJII, R. The regulation of motile activity in fish chromatophores. **Pigment Cell Res**, v. 13, p. 300-319, 2000.

GANTZ, I. *et al.* Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. **J Med Chem**, v. 208, p. 8246-8250, 1993.

GOLOMBEK, D.A.; ROBLERO, R.A. Mecanismos de temporização nos vertebrados. In: Marques N. (Coord.). **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. São Paulo: ed. EDUSP, 2003. p. 163-190.

HADLEY, ME; HASKELL-LUEVANO, C. The proopiomelanocortin system. **Ann N Y Acad Sci**, v. 885, p. 1-21, 1999.

HAMASSAKI, D.E.; VENTURA, D.F. Fototransdução e Fisiologia da Retina. IN: AIRES, M.M. (Coord.) **Fisiologia**. Rio de Janeiro: ed. Guanabara-Koogan, 2007. p. 292-298.

HARDINGHAM, G.E.; BADING, H. Nuclear calcium: a key regulator of gene expression. **Biometals**, v. 11, p. 345-58, 1998.

HAUS, E. *et al.* Increased tolerance of leukemic mice to arabinosyl cytosine with schedule adjusted to circadian system. **Science**, v. 43, p. 80-82, 1972.

HAUS-SEUFFERT, P.; MEISTERERNST, M. Mechanisms of transcriptional activation of cAMP-responsive element-binding protein CREB. **Mol Cell Biochem**, v. 212, p. 5-9, 2000.

IM, L.H.J. *et al.* Rhythmic expression, light entrainment and α -MSH modulation of rhodopsin in a teleost pigment cell line. **Comp Biochem Physiol**, v. 147, n. 3, p. 691-696, 2006.

ISOLDI, M.C. *et al.* Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v. 102, p. 1217–1221, 2005.

ITO, A.S. Biochemistry and physiology of melanin. IN: LEVINE, N. **Pigmentation and Pigmentary Disorders**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, p. 533-559.

KADEKARO, A.L. *et al.* Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. ***Ann NY Acad Sc.***, v. 1994, p. 359-365, 2003.

KENNELLY, P.J.; KREBS, E.G. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. ***J Biol Chem***, v. 266, p. 15555-15558, 1990.

LEONARD, L.J. *et al.* Function of DOPAchrome oxidoreductase and metal ions in DOPAchrome conversion in eumelanin pathway. ***Biochemistry***, v. 27, p. 6156-6159, 1988.

LIMA, L.H.R.G. *et al.* Melanopsin in chicken melanocytes and retina. ***Biological Rhythm Res***, v. 37, n. 5, p. 393-404, 2006.

LOGAN, D.W. *et al.* The structure and evolution of the melanocortin and MCH receptors in fish and mammals. ***Genomics***, v. 81, p. 184-91, 2003.

LOPES, G.J.R. *et al.* Modulation of rhodopsin expression and signaling mechanisms evoked by endothelins in goldfish and murine pigment cell lines. ***Braz J Med Biol Res***, v. 43(9), p. 828-836, 2010.

LU, D. *et al.* Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. ***Nature***, v. 371, p. 799–802, 1994.

[MAZURKIEWICZ](#), J.E. *et al.* Spatiotemporal expression, distribution, and processing of POMC and POMC-derived peptides in murine skin. ***J Histochem Cytochem***, v. 48, p. 905-14, 2000.

MOELLMANN, G. *et al.* Regulation of melanogenesis in melanocytes. ***J Invest Dermatol***, v. 1, p. 79-89, 1988.

MONK, T.H.; FORT, A. A cosine curve fitting program suitable for small computer. **G Chronobiol.** v. 8, p. 193-222, 1983.

MOORE, R.Y.; KLEIN, D.C. Visual pathways and the central neural control of rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. **Brain Res**, v. 71, p. 17-33, 1974.

MORIYA, T. *et al.* Light-sensitive response in melanophores of *Xenopus laevis*: I. Spectral characteristics of melanophore response in isolated tail fin of *Xenopus* tadpole. **J Exp Zool**, v. 276, p. 11-18, 1996.

MOUNTJOY, K.G. *et al.* The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. **Science**, v. 257, p. 1248–1251, 1992.

NAKANISHI, S. *et al.* Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. **Nature**, v. 278, p. 423-7, 1979.

NERY, L.E.; CASTRUCCI, A.M.L. Pigment cell signalling for physiological color change. **Comp Biochem Physiol**, v. 118, p. 1135-44, 1997.

OLIVER, J.; BAYLE, J.D. Brain photoreceptors for the photo-induced testicular response in birds. **Experientia**, v. 38, p. 1021-1029, 1982.

OHTA, T. Melanosome dispersion in direct response to light in melanophores of *Rhodeus ocellatus* fry. **Annot Zool Jpn**, v. 56, p. 155–162, 1983.

OHTA, T.; MURAMATSU, K. Spectral sensitivity of melanophores in the primary color response of the rose bitterling, *Rhodeus ocellatus*. **Jpn J Ichthyol**, v. 34, p. 483–487, 1988.

ORLOW, S.J. *et al.* Synthesis and characterization of melanins from dihydroxyindole-2-carboxylic acid and dihydroxyindole. **Pigment Cell Res**, v. 5, p. 113-121, 1992.

OZEKI, H. *et al.* Chemical characterization of melanins in sheep wool and human hair. **Pigment Cell Res**, v. 5, p. 113-121, 1996.

PALUMBO, A. *et al.* Comparative action of dopachrome tautomerase and metal ions rearrangement of dopachrome. **Biochem Biophys Acta**, v. 1115, p. 1-5, 1991.

PROTA, G. **Melanins and Melanogenesis**. Academic Press, 290 p, 1992.

PROVENCIO, I. *et al.* Melanopsin: an opsin in melanophores, brain, and eye. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, p. 340-345, 1998.

PROVENCIO, I. *et al.* A novel human opsin in the inner retina. **J Neurosci**, v. 20, p. 600-605, 2000.

PROVENCIO, I. *et al.* Photoreceptive net in the mammalian retina. **Nature**, v. 415, p. 493, 2002.

RICHARDSON, J. *et al.* MC1R pathway regulation of zebrafish melanosome dispersion. **Zebrafish**, v. 5, p. 289-95, 2008.

ROLLAG, M.D. Amphibian melanophores become photosensitive when treated with retinal. **J Exp Zool**, v. 275, p. 20-26, 1996.

ROUZAUD, F. *et al.* Regulation of melanocortin 1 receptor expression at the mRNA and protein levels by its natural agonist and antagonist. **FASEB J**, v. 17, p. 2154-2156, 2003.

ROUZAUD, F.; HEARING, V.J.; Regulatory elements of the melanocortin 1 receptor. **Peptides**, v. 26, p. 1858-70, 2005.

ROUZAUD, F. *et al.* MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. **Mutat Res**, v. 571, p. 133-152, 2005.

- SÁNCHEZ-MÁS, J. *et al.* Role of G protein-coupled receptor kinases in the homologous desensitization of the human and mouse melanocortin 1 receptors. ***Mol Endocrinol***, v. 19, p. 1035-48, 2005.
- SATO, M. *et al.* Direct effects of visible and UVA light on pigment migration in erythrophores of Nile tilapia. ***Pigment Cell Res***, v. 17, p. 519–524, 2004.
- SHERBROOKE, W.C. *et al.* Melanotropic peptides and receptors: an evolutionary perspective in vertebrates. In: ***The Melanotropic Peptides***. Washington D.C.: M.E., v. 2, 1988 p. 175-190.
- SHIBATA, T. *et al.* Non-melanosomal regulatory factors in melanogenesis. ***J Invest Dermatol***, v. 100, p. 274-290, 1993.
- SLOMINSK, A.; PAWELEK, J. Animals under the sun: effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. ***Clin Dermatol***, v. 16, p. 503–515, 1998.
- SU, C.Y. *et al.* Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. ***Science***, v. 311, p. 1617-1621, 2006.
- TERAKITA, A. *et al.* Counterion displacement in the molecular evolution of the rhodopsin family. ***Nat Struct Mol Biol***, v. 11, p. 284-289, 2004.
- TSATMALI, M. *et al.* Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. ***J Histochem Cytochem***, v. 50, p. 125–133, 2002.
- ZATZ, M. *et al.* Photoendocrine transduction in cultured chick pineal cells: Effects of light, dark, and potassium on the melatonin rhythm. ***Brain Res***, v. 438, p. 199-215, 1988.
- WAKAMATSU, Y. Light-sensitive fish melanophores in culture. ***J Exp Zool***, v. 204, p. 299–304, 1978.