Gláucia Jansen Da Re Lopes

Expressão gênica e protéica de rodopsina em
células pigmentares e mecanismos de
sinalização intracelular da sua modulação por
endotelinas

São Paulo

2009

Gláucia Jansen Da Re Lopes

Expressão gênica e protéica de rodopsina em
células pigmentares e mecanismos de
sinalização intracelular da sua modulação por
endotelinas

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de
Lauro Castrucci

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS/USP

Lopes, Gláucia Jansen Da Re
L 864e Expressão gênica e protéica de rodopsina em
células pigmentares e mecanismos de sinalização
intracelular da sua modulação por endotelinas / Gláucia
Jansen Da Re Lopes. – São Paulo : G. J. D. L., 2009.
120.: il.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia,
2009.

1. Célula pigmentar 2. Endotelinas
3. Rodopsina I.Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Fisiologia II. Título

LC QP 670
LC QP 88.45

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci

Orientadora

***Aos meus amados pais,
Dilermando e Leonor.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci pela excelente orientação. Você é um exemplo de dedicação e seriedade na prática de Ciência no Brasil e no mundo! Obrigada por estar sempre disposta a me ensinar, indicando qual o melhor caminho a seguir.

À Profa. Dra. Maria Aparecia Visconti pelo auxílio no desenvolvimento do projeto.

Aos meus queridos pais, que sempre me incentivam a buscar o conhecimento. Amo muito vocês!

Ao doutorando Leonardo H. Ribeiro Graciani de Lima, por estar sempre disposto a ajudar.

À grande amiga Luciana Dotta, por todos estes (mais de 16!) anos de amizade. Você é minha irmã de coração. Obrigada por compreender as minhas ausências nos últimos anos.

À amiga Cássia Borges Lima Bulhões Martins pelos ótimos momentos que compartilhamos juntas no laboratório e fora dele. Muito obrigada por ter alegrado meus dias no IB, com seu bom-humor e amizade.

À amiga Fernanda Pizão Farhat, pela amizade e apoio, nos momentos bons e ruins. A minha companheira de congressos, meu muito obrigada!

À amiga Roseli Barbosa, pelas palavras de apoio e amizade, apesar da distância.

À amiga Simone Gomes Ferreira, pela amizade e incentivo durante a finalização do meu projeto.

Ao pessoal do laboratório de Fisiologia Comparativa da Pigmentação do Instituto de Biociências da USP: Jennifer, Luciane, Maria Nathália e Thiago.

Ao técnico Márcio de Patto Lima, por toda a assistência técnica prestada.

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, no qual este trabalho foi desenvolvido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa, sem a qual este projeto não poderia ter sido desenvolvido.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1) ENDOTELINAS E SARAFOTOXINAS	1
1.1) <i>Síntese; receptores e seu acoplamento às proteínas G; clearance e degradação</i>	1
1.2) <i>Efeitos e vias de sinalização intracelular evocados por ETs em células pigmentares e não-pigmentares</i>	9
2) RODOPSINA	15
2.1) <i>Características gerais</i>	15
2.2) <i>Regulação da transcrição em mamíferos e peixes teleósteos</i>	17
2.3) <i>Síntese</i>	21
3) CÉLULAS PIGMENTARES E FOTOPIGMENTOS NÃO-VISUAIS	23
4) O MODELO BIOLÓGICO: LINHAGENS GEM-81 DE <i>CARASSIUS AURATUS</i> E B16 DE <i>MUS MUSCULUS</i>	27
OBJETIVOS	28
1) GERAL	28
2) ESPECÍFICOS	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
1) MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS	29
2) QUANTIFICAÇÃO DO RNAm PARA RODOPSINA	29
2.1) <i>Ensaio hormonal</i>	29
2.1.1) <i>Linhagem GEM-81</i>	29
2.1.2) <i>Linhagem B16</i>	31
2.2) <i>Determinação das vias de sinalização intracelular envolvidas na modulação dos níveis do RNAm para rodopsina</i>	32
2.2.1) <i>Linhagem GEM-81</i>	32
2.2.2) <i>Linhagem B16</i>	33
2.3) <i>Quantificação dos níveis do RNAm para rodopsina por PCR em tempo real (quantitativo)</i>	35
2.3.1) <i>Extração de RNA total e RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)</i>	35

2.3.2) PCR em tempo real (quantitativo)	37
3) QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RODOPSINA	39
3.1) <i>Linhagem GEM-81</i>	39
3.2) <i>Linhagem B16</i>	39
3.3) <i>Quantificação da proteína rodopsina por Western blotting</i>	40
ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
RESULTADOS	44
1) ENSAIOS HORMONAIS: QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DO RNAM PARA RODOPSINA	44
1.1) <i>Linhagem GEM-81</i>	44
1.2) <i>Linhagem B16</i>	46
2) DETERMINAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR ENVOLVIDAS NA MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DO RNAM PARA RODOPSINA	49
2.1) <i>Linhagem GEM-81</i>	49
2.2) <i>Linhagem B16</i>	55
3) QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RODOPSINA	61
3.1) <i>Linhagem GEM-81</i>	61
3.2) <i>Linhagem B16</i>	62
DISCUSSÃO	64
1) MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DO RNAM PARA RODOPSINA EM CÉLULAS GEM-81 E B16	64
2) VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR ENVOLVIDAS NA MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DO RNAM PARA RODOPSINA EM CÉLULAS GEM-81 E B16	69
2.1) <i>Via da PLC, PKC, Ca²⁺ e Ca²⁺/CaM quinase</i>	69
2.2) <i>Via das MAPKs</i>	74
3) MODULAÇÃO DOS NÍVEIS PROTÉICOS DE RODOPSINA EM CÉLULAS GEM-81 E B16	76
CONCLUSÕES	85
RESUMO	87
ABSTRACT	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I. SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DOS RECEPTORES ET _A E ET _B HUMANOS. OS DOMÍNIOS TRANSMEMBRÂNICOS ENCONTRAM-SE SUBLINHADOS (EXTRAÍDO DE DAVENPORT, 2002).	5
TABELA II. SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA SRTX S6C (EXTRAÍDO DE WILLIAMS <i>ET AL.</i> , 1991).	5
TABELA III. BLOQUEADORES/INIBIDORES DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO _____	34
TABELA IV. SEQÜÊNCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE PCR QUANTITATIVO ____	37

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1. AS TRÊS ISOFORMAS DE ENDOTELINA. OS RESÍDUOS EM VERDE INDICAM AQUELES QUE DIFEREM DE ET-1. NA ET-2 DE CAMUNDONGO, SER⁴ DA ET-1 É SUBSTITUÍDA POR ASN⁴ (EXTRAÍDO DE MASAKI, 2004). _____ 2
- FIGURA 2. VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR PARTICIPANTES DA ESTIMULAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E MELANOGENESE EM MELANÓCITOS HUMANOS. SCF, FATOR DE CÉLULAS-TRONCO; C-KIT, RECEPTOR PARA A CITOCINA SCF; SCFGM-CSF, FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA GRANULÓCITO-MACRÓFAGO; HGF, FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITOS; BFGF, FATOR BÁSICO DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS; C-MET, RECEPTOR TIROSINA-QUINASE PARA GM-CSF, HGF E BFGF (EXTRAÍDO DE IMOKAWA *ET AL.* 1997). _____ 11
- FIGURA 3. A) FOTOATIVAÇÃO DA RODOPSINA. ALGUNS FOTOINTERMEDIÁRIOS NÃO FORAM INCLUÍDOS. AS ESCALAS DE TEMPO PARA AS TRANSFORMAÇÕES, ASSIM COMO Λ_{MAX} DE ABSORÇÃO PARA CADA INTERMEDIÁRIO ENCONTRAM-SE INDICADOS (EXTRAÍDO DE RIDGE & PALCZEWSKI, 2007). B) RESPOSTA À LUZ DE UM FOTORRECEPTOR DO TIPO BASTONETE. MOLÉCULAS DE RODOPSINA PRESENTES NO SEGMENTO EXTERNO DOS DISCOS ABSORVEM OS FÓTONS, CULMINANDO COM A HIPERPOLARIZAÇÃO DA MEMBRANA (EXTRAÍDO DE ALBERTS *ET AL.*, 2004A). _____ 15
- FIGURA 4. A) MODELO BIDIMENSIONAL DA RODOPSINA. C-I, C-II E C-III: DOMÍNIOS CITOPLASMÁTICOS. E-I, E-II, E-III E E-IV: DOMÍNIOS EXTRACELULARES. O CROMÓFORO 11-*CIS*-RETINAL (NÃO APRESENTADO) LIGA-SE À PROTEÍNA PELA LYS²⁹⁶. B) LOCALIZAÇÃO DO CROMÓFORO. A LOCALIZAÇÃO PROPOSTA DA MEMBRANA É MOSTRADA EM CINZA E A DO CROMÓFORO 11-*CIS*-RETINAL É MOSTRADA ATRAVÉS DA EXCLUSÃO DE FRAGMENTOS DAS HÉLICES TRANSMEMBRÂNICAS. DOIS LADOS DA RODOPSINA SÃO ILUSTRADOS (EXTRAÍDO DE PALCZEWSKI, 2006). _____ 16
- FIGURA 5. FOTOTRANSDUÇÃO EM BASTONETES (EXTRAÍDO DE PURVES *ET AL.*, 2000). _____ 17
- FIGURA 6. MODELO DO COMPLEXO DE INICIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO NO PROMOTOR DO GENE DA RODOPSINA. TBP = TATA *BINDING PROTEIN*; RNAP II = RNA POLIMERASE II (EXTRAÍDO DE CHENG *ET AL.*, 2004). _____ 18
- FIGURA 7. DIAGRAMA ILUSTRANDO A SÍNTESE PROTÉICA EM BASTONETES APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS RADIOATIVOS. A) AS PROTEÍNAS ENCONTRAM-SE INICIALMENTE CONCENTRADAS NO PRINCIPAL LOCAL DE SÍNTESE, LOCALIZADO NO SEGMENTO INTERNO. B) AS MOLÉCULAS PROTÉICAS ENTÃO SE DIFUNDEM PELA CÉLULA, MUITAS DELAS SENDO EXPORTADAS PELO COMPLEXO DE GOLGI, ORGANELA NA QUAL RECEBEM A ADIÇÃO DE CARBOIDRATOS. C) A MAIOR PARTE DAS PROTEÍNAS ATRAVESSA O CÍLIO CONECTIVO E É INCORPORADA ÀS MEMBRANAS LOCALIZADAS NA BASE DO SEGMENTO EXTERNO. PARTE DAS

PROTEÍNAS SE DIFUNDE A PARTIR DAS NOVAS MEMBRANAS PARA A MEMBRANA CELULAR EXTERNA, COM A QUAL SÃO CONTÍGUAS. D) SEPARAÇÃO DAS MEMBRANAS DUPLAS EM FORMA DE DISCO DA MEMBRANA EXTERNA PRENDE AS PROTEÍNAS MARCADAS DENTRO DOS DISCOS. A FORMAÇÃO REPETIDA DE NOVAS MEMBRANAS DESLOCA OS DISCOS MARCADOS AO LONGO DO SEGMENTO EXTERNO. E) OS DISCOS ATINGEM O FINAL DA CÉLULA E SÃO LIBERADOS. OS DISCOS LIBERADOS SÃO FAGOCITADOS PELO EPITÉLIO PIGMENTAR (EXTRAÍDO DE YOUNG, 1976).	23
FIGURA 8. PROTOCOLO EXPERIMENTAL. ENSAIOS HORMONAIS COM CÉLULAS GEM-81.	30
FIGURA 9. PROTOCOLO EXPERIMENTAL. ENSAIOS HORMONAIS COM CÉLULAS B16.	32
FIGURA 10. PROTOCOLO EXPERIMENTAL. DETERMINAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR.	35
FIGURA 11. PROTOCOLO EXPERIMENTAL. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RODOPSINA.	40
FIGURA 12. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE <i>CARASSIUS AURATUS</i> , DIFERENCIADAS POR DMSO, TRATADAS COM SRTX S6C EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES (10^{-11} A 10^{-7} M) POR 6 HORAS, MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=3-5 GARRAFAS).	45
FIGURA 13. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE <i>CARASSIUS AURATUS</i> , DIFERENCIADAS POR DMSO TRATADAS COM SRTX S6C EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES (10^{-11} A 10^{-7} M) POR 12 HORAS, MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=3-5 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,05$. ** SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,01$.	45
FIGURA 14. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE <i>CARASSIUS AURATUS</i> , DIFERENCIADAS POR DMSO, TRATADAS COM SRTX S6C EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES (10^{-11} A 10^{-7} M) POR 24 HORAS, MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=3-6 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,001$.	46
FIGURA 15. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE <i>MUS MUSCULUS</i> TRATADOS COM ET-1 EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES (10^{-11} A 10^{-7} M) POR 6 HORAS, MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=3-5 GARRAFAS).	47
FIGURA 16. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE <i>MUS MUSCULUS</i> TRATADOS COM ET-1 EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES (10^{-11} A 10^{-7} M) POR 12 HORAS, MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=6 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,05$. ** SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,001$.	48
FIGURA 17. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE <i>MUS MUSCULUS</i> TRATADOS COM ET-1 EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES (10^{-11} A 10^{-7} M) POR 24 HORAS,	

- MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=3-4 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,01$. _____ 48
- FIGURA 18. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE *MUS MUSCULUS* TRATADOS COM ET-1 EM CONCENTRAÇÕES CRESCENTES (10^{-11} A 10^{-7} M) POR 48 HORAS, MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=3-5 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,01$. _____ 49
- FIGURA 19. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE *CARASSIUS AURATUS*, DIFERENCIADAS POR DMSO, TRATADAS COM SRTX S6C (10^{-9} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDOR DE PLC (U73122, 3×10^{-6} M) POR 24 HORAS E MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=4-5 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,001$. _____ 51
- FIGURA 20. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE *CARASSIUS AURATUS*, DIFERENCIADAS POR DMSO, TRATADAS COM SRTX S6C (10^{-9} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE QUELANTE DE Ca^{2+} (BAPTA-AM, 10^{-5} M) POR 24 HORAS E MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=5-7 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,05$. ** SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,001$. _____ 51
- FIGURA 21. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE *CARASSIUS AURATUS*, DIFERENCIADAS POR DMSO, TRATADAS COM SRTX S6C (10^{-9} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE ANTAGONISTA PARA CALMODULINA (R24571, 10^{-6} M) POR 24 HORAS E MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=5-7 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,05$. _____ 52
- FIGURA 22. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE *CARASSIUS AURATUS*, DIFERENCIADAS POR DMSO, TRATADAS COM SRTX S6C (10^{-9} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDOR DE Ca^{2+} /CAM QUINASE II (KN-93, 3×10^{-6} M) POR 24 HORAS E MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=4-7 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,05$. _____ 52
- FIGURA 23. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE *CARASSIUS AURATUS*, DIFERENCIADAS POR DMSO, TRATADAS COM SRTX S6C (10^{-9} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDOR DE PKC (Ro31-8220, 3×10^{-6} M) POR 24 HORAS E MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=6-8 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P<0,05$. $\neq$ SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DE SRTX S6C, $P<0,05$. _____ 53
- FIGURA 24. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE *CARASSIUS AURATUS*, DIFERENCIADAS POR DMSO, TRATADAS COM SRTX S6C (10^{-9} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDOR DE cRAF-1 (GW5074, 10^{-8} M) POR 24 HORAS E MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=3-5 GARRAFAS). *

SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P < 0,05$. ≠ SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DE SRTX S6C, $P < 0,01$. _____ 53

FIGURA 25. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE *CARASSIUS AURATUS*, DIFERENCIADAS POR DMSO, TRATADAS COM SRTX S6C (10^{-9} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDOR DE MEK (MAP QUINASE QUINASE) (PD-98059, 2×10^{-5} M) POR 24 HORAS E MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=4-7 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P < 0,05$. ≠ SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DE SRTX S6C, $P < 0,05$. _____ 54

FIGURA 26. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE *CARASSIUS AURATUS*, DIFERENCIADAS POR DMSO, TRATADAS COM SRTX S6C (10^{-9} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDOR DE ERK2 (MAP QUINASE 1) (5-IODOTUBERCIDIN, $5,3 \times 10^{-7}$ M) POR 24 HORAS E MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=3-6 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P < 0,05$. ≠ SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DE SRTX S6C, $P < 0,05$. _____ 55

FIGURA 27. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE *MUS MUSCULUS*, TRATADOS COM ET-1 (10^{-10} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDOR DE PLC (U73122, 3×10^{-6} M) POR 24 HORAS E MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=5-6 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P < 0,05$. ≠ SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DE ET-1, $P < 0,001$. _____ 57

FIGURA 28. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE *MUS MUSCULUS*, TRATADOS COM ET-1 (10^{-10} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE QUELANTE DE Ca^{2+} (BAPTA-AM, 10^{-5} M) POR 24 HORAS E MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=4-7 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P < 0,01$. ≠ SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DE ET-1, $P < 0,05$. _____ 57

FIGURA 29. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE *MUS MUSCULUS*, TRATADOS COM ET-1 (10^{-10} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE ANTAGONISTA PARA CALMODULINA (R24571, 10^{-6} M) POR 24 HORAS E MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=5-7 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P < 0,001$. ≠ SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DE ET-1, $P < 0,001$. _____ 58

FIGURA 30. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE *MUS MUSCULUS*, TRATADOS COM ET-1 (10^{-10} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDOR DE Ca^{2+} /CAM QUINASE II (KN-93, 3×10^{-6} M) POR 24 HORAS E MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=4-9 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, $P < 0,01$. ≠ SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DE ET-1, $P < 0,001$. _____ 58

FIGURA 31. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE *MUS MUSCULUS*, TRATADOS COM ET-1 (10^{-10} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDOR DE PKC (Ro31-8220, 3×10^{-6} M) POR 24 HORAS E MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS

MÉDIAS $\pm$ EPM (N=4-8 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, P<0,01. $\neq$ SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DE ET-1, P<0,001. _____ 59

FIGURA 32. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE *MUS MUSCULUS*, TRATADOS COM ET-1 (10^{-10} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDOR DE CRAF-1 (GW5074, 10^{-8} M) POR 24 HORAS E MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=4-8 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, P<0,05. _____ 59

FIGURA 33. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE *MUS MUSCULUS*, TRATADOS COM ET-1 (10^{-10} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDOR DE MEK (MAP QUINASE QUINASE) (PD-98059, 2×10^{-5} M) POR 24 HORAS E MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=5-6 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, P<0,05. _____ 60

FIGURA 34. PCR QUANTITATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE *MUS MUSCULUS*, TRATADOS COM ET-1 (10^{-10} M) NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE INIBIDOR DE ERK2 (MAP QUINASE 1) (5-iodotubercidin, $5,3 \times 10^{-7}$ M) POR 24 HORAS E MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=5-7 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO CONTROLE, P<0,05. _____ 60

FIGURA 35. *WESTERN BLOTTING* REPRESENTATIVO PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE *CARASSIUS AURATUS*, DIFERENCIADAS POR DMSO, CONTROLE E TRATADAS COM SRTX S6C (10^{-9} M) POR 24 HORAS, MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. A PROTEÍNA TOTAL DAS CÉLULAS FOI EXTRAÍDA AO FINAL DAS 24H DE TRATAMENTO, ASSIM COMO 3 E 6H APÓS O FIM DO TRATAMENTO. LINHA 1, MARCADOR DE PESO MOLECULAR NOVEX® SHARP PROTEIN STANDARD (INVITROGEN, E.U.A.); LINHA 2, CONTROLE 0H; LINHA 3, CÉLULAS TRATADAS COM SRTX S6C, PROTEÍNA EXTRAÍDA AO FINAL DAS 24H DE TRATAMENTO; LINHA 4, CONTROLE 3H; LINHA 5, CÉLULAS TRATADAS COM SRTX S6C, PROTEÍNA EXTRAÍDA 3H APÓS O FIM DAS 24H DE TRATAMENTO; LINHA 6, CONTROLE 6H; LINHA 7, CÉLULAS TRATADAS COM SRTX S6C, PROTEÍNA EXTRAÍDA 6H APÓS O FIM DAS 24H DE TRATAMENTO. _____ 61

FIGURA 36. HISTOGRAMA DO *WESTERN BLOTTING* PARA RODOPSINA EM CÉLULAS DE ERITROFOROMA GEM-81 DE *CARASSIUS AURATUS*, DIFERENCIADAS POR DMSO, CONTROLE E TRATADAS COM SRTX S6C (10^{-9} M) POR 24 HORAS, MANTIDAS EM ESCURO CONSTANTE. A PROTEÍNA TOTAL DAS CÉLULAS FOI EXTRAÍDA AO FINAL DAS 24H DE TRATAMENTO, ASSIM COMO 3 E 6H APÓS O FIM DO TRATAMENTO. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=3-4 GARRAFAS). _____ 62

FIGURA 37. *WESTERN BLOTTING* REPRESENTATIVO PARA RODOPSINA EM MELANÓCITOS B16 DE *MUS MUSCULUS*, CONTROLE E TRATADOS COM ET-1 (10^{-10} M) POR 24 HORAS, MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. A PROTEÍNA TOTAL DAS CÉLULAS FOI EXTRAÍDA AO FINAL DAS 24H DE

TRATAMENTO, ASSIM COMO 3 E 6H APÓS O FIM DO TRATAMENTO. LINHA 1, MARCADOR DE PESO MOLECULAR *NOVEX® SHARP PROTEIN STANDARD* (INVITROGEN, E.U.A.); LINHA 2, CONTROLE 0H; LINHA 3, CÉLULAS TRATADAS COM ET-1, PROTEÍNA TOTAL EXTRAÍDA AO FINAL DAS 24H DE TRATAMENTO; LINHA 4, CONTROLE 3H; LINHA 5, CÉLULAS TRATADAS COM ET-1, PROTEÍNA TOTAL EXTRAÍDA 3H APÓS O FIM DAS 24H DE TRATAMENTO; LINHA 6, CONTROLE 6H; LINHA 7, CÉLULAS TRATADAS COM ET-1, PROTEÍNA TOTAL EXTRAÍDA 6H APÓS O FIM DAS 24H DE TRATAMENTO. _____ 63

FIGURA 38. HISTOGRAMA DO *WESTERN BLOTTING* PARA RODOPSINA MELANÓCITOS B16 DE *MUS MUSCULUS*, CONTROLE E TRATADOS COM ET-1 (10^{-10} M) POR 24 HORAS, MANTIDOS EM ESCURO CONSTANTE. A PROTEÍNA TOTAL DAS CÉLULAS FOI EXTRAÍDA AO FINAL DAS 24H DE TRATAMENTO, ASSIM COMO 3 E 6H APÓS O FIM DO TRATAMENTO. VALORES SÃO AS MÉDIAS $\pm$ EPM (N=3 GARRAFAS). * SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DO RESPECTIVO CONTROLE, $P<0,01$. _____ 63

ABREVIATURAS

ADP: difosfato de adenosina

AMP_c: monofosfato cíclico de adenosina

AP-1: *activator protein 1*

AREs: *AU-rich elements*

ARF: fator de ribosilação do ADP

Arr: arrestina

Baf: *barrier to autointegration factor*

cBAT-1: *carp BAT-1-like element*

BAPTA-AM: *1,2-bis-(o-aminophenoxy)-ethane-N,N,-N',N'-tetraacetic acid tetraacetoxymethyl ester*

Ca²⁺/CaM quinase II: proteína quinase dependente de Ca²⁺/calmodulina II

CHO: células ovarianas de hamster chinês

Con.: controle

COX-2: ciclooxigenase 2

CRA: *cancer-retina antigens*

CRX: *cone rod homeobox*

CSE: *carp-specific element*

dbp: gene para o fator de transcrição *mouse albumin D element-binding protein*

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

cDNA: DNA complementar

dNTPs: desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DTT: ditioneitol

ECE: enzima conversora de endotelina

eIF4E: *eukaryotic translation initiation factor 4E*

EPM: erro padrão da média

ERK2: *extracellular signal-regulated kinase II* (MAP quinase 1)

ERX: *empty-spiracles-related retinal homeobox*

ET: endotelina

ET-1: endotelina 1

ET-2: endotelina 2

ET-3: endotelina 3

ET_A: receptor para endotelinas do subtipo A

ET_B: receptor para endotelinas do subtipo B

ET_C: receptor para endotelinas do subtipo C

GC1: guanilil-ciclase 1

GDP: difosfato de guanosina

GMP_c: monofosfato cíclico de guanosina

GRK: quinase de receptor acoplado à proteína G

Gt: proteína G transducina

GTP: trifosfato de guanosina

GTPase: proteína de desfosforilação do GTP

GW 5074: *3-(3,5-dibromo-4-hydroxybenzylidene)-5-iodo-1,3-dihydroindol-2-one*

H₂O DEPC: água tratada com dietil-piromcarbonato

HCS: célula estelada hepática

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanolsulfônico

5-iodotubercidin: *4-amino-5-iodo-7-(β-D-ribofuranosyl)-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine*

IP₃: 1,4,5-trisfosfato de inositol

IRB: *inter-Ret-1-BAT-1*

KN-93: *2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine*

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MCH: hormônio concentrador de melanina

MCR1: receptor de melanocortina do tipo 1

MEK: quinase de MAPK/ERK (MAP quinase quinase)

α-MSH: hormônio estimulante de melanócitos

β-MyHC: cadeia pesada de β-miosina

NEP: endopeptidase neutra (neprilisina, EC 3.4.24.11)

NRE: *neural retina leucine zipper response element*

NRL: *neural retina leucine zipper protein*

PCR: *polymerase chain reaction*

PD-98059: *2'-amino-3'-methoxyflavone*

PDE6: fosfodiesterase de GMP_c 6

Per1: gene *Period 1*

Per2: gene *Period 2*

Per3: gene *Period 3*

PI3K: fosfoinositídeo 3-quinase

PKA: proteína quinase dependente de AMP_c

PKC: proteína quinase dependente de cálcio

PLA₂: fosfolipase A₂

PLC: fosfolipase C

PLD: fosfolipase D

proteína G: proteína de ligação a GTP

QRX: *Q-50 type retinal homeobox*

R24571: *calmidazolium chloride*

c-Raf1: MAP quinase quinase quinase

RBPs: *RNA binding proteins*

Rec: recoverina

RER: retículo endoplasmático rugoso

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

Ro31-8220: *2-[1-(3-(amidinothio)propyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1-methylindol-3-yl) maleimide methanesulfonate*

RPPR: região promotora proximal da rodopsina

RT-PCR: *reverse transcriptase polymerase chain reaction*

RX: *retinal homeobox*

SDS: *sodium dodecyl sulfate*

SRTX: sarafotoxina

TGF: fator de crescimento transformador

U-73122: *1-(6-((17β-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione*

INTRODUÇÃO

1) Endotelinas e sarafotoxinas

1.1) Síntese; receptores e seu acoplamento às proteínas G; *clearance* e degradação

A endotelina (ET), um potente peptídeo vasoconstritor, foi inicialmente isolada e identificada em cultura de células endoteliais de aorta porcina, sendo constituída por 21 resíduos de aminoácidos (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Em humanos, a ET promove o mais potente e mais durador efeito vasoconstritor conhecido (HILLIER *et al.*, 2001; MAGUIRE & DAVENPORT, 2002), sendo cem vezes mais potente do que a noradrenalina (YANAGISAWA *et al.*, 1988; LÜSCHER & BARTON, 2000).

Há três isoformas endógenas de ET: ET-1, ET-2 e ET-3 (INOUE *et al.*, 1989) (FIGURA 1). Os precursores das ETs são processados por duas proteases, dando origem às formas maduras ativas. As pré-proendotelinas, compostas por resíduos de aproximadamente 200 aminoácidos, são clivadas por endopeptidases, formando intermediários inativos, denominados *big* endotelinas. As *big* endotelinas, peptídeos compostos por 37-40 aminoácidos, são clivadas por enzimas conversoras de endotelinas (ECEs), originando as formas ativas, compostas por 21 aminoácidos (INOUE *et al.*, 1989). A enzima conversora de endotelina do tipo 1 (ECE-1) processa as *big* endotelinas tanto intracelularmente, quanto na superfície celular (XU *et al.*, 1994). Sabe-se que a ECE-1 apresenta quatro isoformas (ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c e ECE-1d). ECE-1a é abundante em células endoteliais, encontrando-se em vesículas secretórias intracelulares e é constitutivamente transportada para a superfície celular. ECE-1b é encontrada intracelularmente, próxima à rede trans-Golgi. ECE-1c e ECE-1d localizam-se na superfície celular (CODER, 2001). Já a

enzima conversora de endotelina do tipo 2 (ECE-2) parece atuar de preferência intracelularmente (EMOTO & YANAGISAWA, 1995).

FIGURA 1. As três isoformas de endotelina. Os resíduos em verde indicam aqueles que diferem de ET-1. Na ET-2 de camundongo, Ser⁴ da ET-1 é substituída por Asn⁴ (Extraído de MASAKI, 2004).

Os estímulos fisiológicos para a síntese e liberação de ET-1 pelas células endoteliais incluem a própria ET-1, angiotensina II, catecolaminas, cardiotrofina-I, trombina, fatores de crescimento, citocinas, radicais livres, insulina, hipóxia e forças de cisalhamento (*shear stress*) (EMORI *et al.*, 1991; MASAKI *et al.*, 1991; LEVIN, 1995; LOVE & MCMURRAY, 1996; JOUGASAKI *et al.*, 2002). A síntese de ET-1 é inibida por agentes incluindo o óxido nítrico, peptídeos natriuréticos, heparina e prostaglandinas (BOULANGER & LÜSHER, 1990; HU *et al.*, 1992; YOKOKAWA *et*

al., 1993; PRINS *et al.*, 1994).

Sabe-se hoje que, além das células endoteliais vasculares, diversos tipos celulares, tecidos e órgãos também produzem ETs. Em mamíferos, ET é produzida por células do endocárdio em cultura (EVANS *et al.*, 1994), cardiomiócitos (SUZUKI *et al.*, 1993), células do baço (BLOCH *et al.*, 1989a,b), células endoteliais (LÓPEZ-FARRÉ *et al.*, 1991) e epiteliais glomerulares (CYBULSKY *et al.*, 1993), células epiteliais da traquéia (ENDO *et al.*, 1992), células epiteliais gástricas (OTA *et al.*, 1991), hepatócitos (RIEDER *et al.*, 1991), endométrio (CAMERON *et al.*, 1992), placenta (BENIGNI *et al.*, 1991), olho (MACCUMBER *et al.*, 1989; MACCUMBER *et al.*, 1991), mastócitos derivados da medula óssea (EHRENREICH *et al.*, 1992), cérebro (LEE *et al.*, 1990), medula espinhal (GIAID *et al.*, 1989), dentre outros. Queratinócitos humanos em cultura expressam RNAm para pré-proendotelina e secretam ET-1 madura (YOHN *et al.*, 1993). Na epiderme humana, os melanócitos produzem melanina e a transferem para os queratinócitos vizinhos que, por sua vez, produzem fatores que regulam o funcionamento dos melanócitos, tal como a própria ET-1.

Em 1982, KOCHVA e colaboradores identificaram um novo grupo de toxinas a partir do veneno da serpente *Atractaspis engaddensis* (em hebraico *Saraf Ein Gedi*), que foram denominadas sarafotoxinas (SRTXs). Em 1988, TAKASAKI e colaboradores, isolaram a partir do veneno desta mesma espécie, através de cromatografia, seis frações, sendo que a fração S6 apresentou atividade cardiotoxica. A fração S6 foi submetida a fracionamento, sendo que três novas frações foram obtidas: S6a, S6b e S6c.

SRTXs e ETs formam uma família homogênea de isopeptídeos vasoconstritores (KLOOG *et al.*, 1988; KLOOG & SOKOLOVSKY, 1989) que atuam sobre o sistema cardiovascular através de receptores idênticos, modulando a

contração da musculatura cardíaca e da musculatura lisa em diferentes órgãos de vertebrados (SOKOLOVSKY, 1991). SRTXs e ET apresentam aproximadamente 60% de homologia na sequência de aminoácidos (DUCANCEL, 2002).

As primeiras quatro isoformas de SRTXs identificadas foram: S6a ou SRTX-a, S6b ou SRTX-b, S6c ou SRTX-c (isoladas a partir do veneno da espécie *Atractaspis engaddensis*) e Btx (isolada a partir do veneno da espécie *Atractaspis bibroni*). Recentemente, novas isoformas de SRTXs foram isoladas e caracterizadas, incluindo três isoformas provenientes da espécie *Atractaspis engaddensis* (DUCANCEL, 2002), além de seis isoformas isoladas a partir do veneno da *Atractaspis microlepdota microlepdota*. As seqüências das seis isoformas isoladas a partir desta última espécie possuem três aminoácidos a mais do que as seqüências de SRTXs previamente descritas, sendo chamadas de SRTXs longas (*long-sarafotoxins*) (HAYASHI *et al.*, 2004).

Três subtipos de receptores para ETs foram identificados. Eles são denominados ET_A, ET_B e ET_C (este último clonado a partir de melanóforos dérmicos de *Xenopus leavis*), pertencendo à família dos receptores acoplados à proteína G (TABELA I) (ARAI *et al.*, 1990; SAKURAI *et al.*, 1990, 1992; KARNE *et al.*, 1993).

TABELA I. Seqüência de aminoácidos dos receptores ET_A e ET_B humanos. Os domínios transmembrânicos encontram-se sublinhados (Extraído de DAVENPORT, 2002).

ET _A	M-----ETLCRLASF
ET _B	MQPPPSLCGRALVALVLACGLSRIWGEERGFPDRA----TP- LLQTAEIMTPPTKTL
ET _A	WLALVGCVISDNPERYSTNLSNHVDDFTTFRGTLSFLVTTHQPTNLVLPNSGSMHNYC
ET _B	W-----PKGSNASLARSLAPAEVPGDR---TAGSPPTISPPP-----C
I	
ET _A	PQQTKITSAFKYINTVISCTIFIVGMVGNATLLRIIYQNKCMRNGPNALIASLALGDLI
ET _B	QGPIEKETFKYINTVVSCLVFLGIIGNSTLLRIIYKNKCMRNGPNILIASLALGDLI
II	
ET _A	<u>YVVIDLPINVEKLLAGRWPF</u> DHNDGVLCKLPFLQKSSVGITVLNLCALSVDYRAV
ET _B	<u>HIVIDIPIINVYKLLAEDW</u> PFGAE----MCKLVFFIQKASVGITVLSLCALSIDRYRAV
III	
IV	
ET _A	ASWSRVQIGIGIPLVTAIEIVSIWILSFILAIPEAIGFVMVPFEYRGEQHKTCMLNATSK
ET _B	ASWSRIKGIGVPKWTAVEIVLIWVVSVLAVPEAIGFDIITMDYKGSYLRIICLLHPVQK
ET _A	--FMEFYQDVKDWWLFGFYFCMPLVCTAIFYTLMTCEMLNRRNGSLRIALSEHLKQRRE
ET _B	TAFMQFYKTAKDWWLFSFYFCLPLAITAFFYTLMTCEML-RKKSGMQIALNDHLKQRRE
V	
ET _A	VAKTVFCLVVFALCWFLHLSRILKKTVYNEMDKNRCCELLSFLLLMDYIGINLATMNS
ET _B	VAKTVFCLVLFALCWFLHLSRILKLTLYNQNDPNRCCELLSFLLVLDYIGINMASLNS
ET _A	<u>CINPIALYFVSKKFKNC</u> FQSCLCYQSKSLMTSVPMTGTSIQWKNHDQNNHNTDRSS
ET _B	<u>CINPIALYLVS</u> KRFKNCFKSCLCCWCQSFEKQSLEEKQSLKFKANDHGYDNFRSSNK
ET _A	HKDSMN
ET _B	YSSS

Os receptores possuem diferentes afinidades para as isoformas de ETs e/ou SRTXs, sendo: (1) ET_A→ET-1≥ET-2>>SRTX S6b>ET-3 (ARAI *et al.*, 1990); (2) ET_B→ET-1=ET-2=ET-3=SRTXs (SAKURAI *et al.*, 1990; SAKURAI *et al.*, 1992) e (3) ET_C→ET-3>ET-1=ET-2 (KARNE *et al.*, 1993). A SRTX S6c (TABELA II) é um agonista altamente seletivo para os receptores ET_B (WILLIAMS *et al.*, 1991).

TABELA II. Seqüência de aminoácidos da SRTX S6c (Extraído de WILLIAMS *et al.*, 1991).

H-Cys¹-Thr-Cys³-Asn-Asp-Met-Thr-Asp-Glu-Glu-Cys¹¹-Leu-Asn-Phe-Cys¹⁵-His-Gln-Asp-Val-Ile-Trp-OH

O receptor ET_A, na presença ou ausência de seu ligante, pode ser encontrado em cavéolas (CHUN *et al.*, 1994). Cavéolas são invaginações da membrana plasmática, constituindo um subtipo de plataforma lipídica e são consideradas subcompartimentos celulares onde se alojam inúmeras moléculas envolvidas na

sinalização celular. A rápida dessensibilização através da internalização dos receptores ET_A e ET_B é agonista-dependente, sendo que esse processo depende da atividade de quinases de receptores acoplados à proteína G (GRKs), em especial a GRK2 (FREEDMAN *et al.*, 1997), além de arrestina, dinamina e clatrina. A fosforilação de receptores através de GRKs parece facilitar a ligação de arrestinas, inibindo a interação entre receptor e a proteína G (PIERCE *et al.*, 2002). Ambos os receptores são transportados para endossomos primários. Contudo, enquanto o receptor ET_A segue para a reciclagem através do compartimento de reciclagem pericentriolar (BREMNES *et al.*, 2000), o receptor ET_B segue para lisossomos para sua degradação (BREMNES *et al.*, 2000; OKSCHE *et al.*, 2000) ou é translocado para a membrana nuclear para outros eventos sinalizadores (BKAILY *et al.*, 2006).

Em experimentos utilizando duas linhagens de fibroblastos obtidas a partir do pulmão de hamster chinês (CCL39), cada uma expressando um subtipo do receptor para endotelina humano, ET_A ou ET_B , foi demonstrado que os receptores para endotelina se acoplam a diferentes proteínas G, dependendo do ligante usado e do subtipo de receptor expresso. ET-1, ET-2, SRTX S6b e SRTX S6c promoveram aumento no acoplamento de $G_{13}\alpha$ ao ET_B , quando comparado ao receptor na ausência do ligante. ET-1 não modificou o acoplamento da subunidade $G_{13}\alpha$ ao ET_A , sendo que ET-3 e SRTX S6c foram capazes de induzir uma diminuição neste acoplamento. ET-1, ET-2, SRTX S6b e SRTX S6c induziram um aumento muito maior no acoplamento de $G_q\alpha/G_{11}\alpha$ ao ET_A do que ao ET_B . O acoplamento induzido por ligante entre as subunidades α de G_{i1} ou G_{i2} e os dois subtipos de receptores foi basicamente o mesmo. Isso também foi verdadeiro para o acoplamento dos receptores a $G_o\alpha$, exceto pelo fato de que ET-3 aumentou o acoplamento desta subunidade α ao ET_B mas diminuiu seu acoplamento ao ET_A (SHRAGA-LEVINE & SOKOLOVSKY, 2000). Sabe-se que G_s promove a ativação da adenilil-ciclase,

enquanto as três subunidades α de G_i (G_{i1} , G_{i2} e G_{i3}) causam a inibição do sistema da adenilil-ciclase, em conjunto com a estimulação dos canais de K^+ . G_0 promove a inibição dos canais de Ca^{2+} e G_q/G_{11} atuam na ativação das isoformas da PLC- β .

Os receptores para ETs são capazes de ativar diversas vias de sinalização intracelular, tais como da fosfolipase C (PLC) (SOKOLOVSKY, 1993), da fosfolipase D (PLD) (AMBAR & SOKOLOVSKY, 1993), aumento nos níveis de cálcio (Ca^{2+}) citosólico (KOIZUMI *et al.*, 1994), da fosfolipase A_2 (PLA $_2$) (ARAMORI & NAKANISHI, 1992), da produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMP $_c$) (SOKOLOVSKY *et al.*, 1994) e de guanosina (GMP $_c$) (SHRAGA-LEVINE *et al.*, 1994; SHRAGA-LEVINE & SOKOLOVSKY, 1996) e da cascata de sinalização por proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (KASUYA *et al.*, 1994).

No sistema vascular, o receptor ET $_A$ pode ser considerado o receptor primário responsável pelo efeito vasoconstritor e pela proliferação celular promovidos pelas ETs, enquanto o receptor ET $_B$ inibe o crescimento celular e a vasoconstrição, atuando também como um receptor responsável pelo *clearance* de ET. A ET-1 liga-se ao receptor ET $_B$, com subsequente internalização e degradação do complexo ligante-receptor, sendo este processo responsável por grande parte do *clearance* da ET-1, principalmente na circulação pulmonar (DUPUIS *et al.*, 1996), embora também haja contribuição da circulação esplênica e renal (ATTINÀ *et al.*, 2005).

Estudos realizados em humanos indicam uma meia-vida plasmática para a ET-1 que varia de 1,4 a 6,3 minutos (VIERHAPPER *et al.*, 1990; WEITZBERG *et al.*, 1991). PARKER e colaboradores (1999) sugerem que esses dados não condizem com o efeito vasoconstritor prolongado da ET-1 exógena, que pode persistir por até algumas horas (VIERHAPPER *et al.*, 1990; LERMAN *et al.*, 1991; PERNOW *et al.*, 1996; WEITZBERG *et al.*, 1991). Além disso, nesses estudos a infusão de grandes quantidades de ET-1 promoveu mudanças significativas nos padrões

hemodinâmicos e nos níveis de ET-1 circulante nos sujeitos estudados.

PARKER e colaboradores (1999), utilizando infusão de ET-1 marcada radioativamente, demonstraram o volume de distribuição e a cinética do *clearance* da ET-1 em humanos. A infusão da ET-1 radioativa não alterou a frequência cardíaca, pressão arterial, pressão atrial direita ou os níveis endógenos de ET-1 nos sujeitos analisados. Os autores identificaram uma meia-vida para a ET-1 marcada de 455 ± 59 minutos, o que dá aproximadamente 8 horas.

A endopeptidase neutra (NEP, neprilisina, EC 3.4.24.11) é uma metaloendopeptidase localizada na superfície celular, que funciona como uma ectoenzima, catalisando a hidrólise de peptídeos na face extracelular da membrana plasmática (TURNER *et al.*, 2001). Essa enzima cliva uma grande variedade de peptídeos ativos, dentre eles o peptídeo natriurético atrial (SONNENBERG *et al.*, 1988; MARGULIES *et al.*, 1990; CHIU *et al.*, 1991) e bradicinina (ERDÖS & SKIDGEL, 1989). A NEP é expressa em uma grande variedade de tecidos, incluindo rins (KERR & KENNY, 1974a, b) e o sistema nervoso central (MATSAS *et al.*, 1983).

SOKOLOVSKY e colaboradores (1990) demonstraram que as ETs também são suscetíveis à hidrólise por NEP, sendo convertidas a uma forma biologicamente inativa. Este mesmo estudo demonstrou que as SRTXs podem ser degradadas pela NEP, porém são mais resistentes à clivagem quando comparadas às ETs. A meia-vida da ET-1, quando em contato com NEP *in vitro*, foi de aproximadamente uma hora, enquanto a meia-vida da SRTX S6c foi de mais de quatro horas.

1.2) Efeitos e vias de sinalização intracelular evocados por ETs em células pigmentares e não-pigmentares

Crustáceos e vertebrados ectotérmicos apresentam células pigmentares denominadas cromatóforos. Os cromatóforos podem ser classificados em cinco grupos, de acordo com sua cor e os pigmentos que apresentam: melanóforos (pretos ou pardos, contêm melanina em grânulos chamados melanossomos); eritróforos (vermelhos, contêm diferentes proporções de pigmentos carotenóides e pteridínicos em eritrossomos); xantóforos (amarelos, contêm pigmentos pteridínicos e carotenóides em proporções variadas em xantossomos); leucóforos (brancos, contêm grânulos de purinas, os leucossomos), iridóforos; (iridescentes, podendo ser azuis ou verde metálicos, contêm purinas depositadas em finas placas cristalinas, os iridossomos) (BAGNARA, 1966; FINGERMAN, 1970; FUJII & OSHIMA, 1986; FUJII, 1993).

Aves e mamíferos não apresentam diversidade de células pigmentares, sendo o melanócito o seu único representante. A capacidade de rápida migração pigmentar dentro dos melanócitos foi perdida (SHERBROOKE *et al.*, 1988), sendo que os grânulos são lentamente deslocados ao longo das projeções dendríticas passando aos queratinócitos vizinhos, penas ou pêlos (BOISSY, 1988).

Diversos hormônios atuam na regulação da mudança de cor em vertebrados, dentre eles: hormônio estimulante de melanócitos (α -MSH); hormônio concentrador de melanina (MCH); prolactina; somatolactina; melatonina; catecolaminas (norepinefrina e epinefrina). Além dos hormônios mencionados, vários fatores de ação parácrina atuam para regular as respostas fisiológicas dessas células efetoras, como peptídeos opióides; eicosanóides, em especial as prostaglandinas; óxido nítrico; endotelinas (FUJII, 2000).

As ETs têm sido reconhecidas como participantes da regulação da migração

e/ou produção de pigmentos em diversos grupos animais. Em várias espécies de peixes teleósteos, as ETs induzem a agregação pigmentar em melanóforos (FUJII *et al.*, 1993; FILADELFI *et al.*, 1996; HAYASHI *et al.*, 1996; RAMANZINI *et al.*, 2006) e xantóforos (MURATA & FUJII, 2000). O mecanismo de transdução de sinal envolvido na agregação pigmentar evocada por ETs parece compreender a produção de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) através da ativação da PLC, a elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} e a ativação de proteína quinase C (dependente de cálcio) (PKC) (FUJII *et al.*, 1993; HAYASHI *et al.*, 1996; MURATA & FUJII, 2000). Já em leucóforos de teleósteos, as ETs induzem a dispersão de leucossomos (FUJITA & FUJII, 1996). Em melanóforos de oito espécies de teleósteos e em xantóforos de *Oryzias latipes*, a SRTX S6c induz a agregação dos grânulos de pigmento (HAYASHI *et al.*, 1996; MURATA & FUJII, 2000). Em leucóforos de *Oryzias latipes*, a SRTX S6c promove a dispersão dos leucossomos (FUJITA & FUJII, 1996). Em células GEM-81 de eritroforoma de *Carassius auratus*, diferenciadas por dimetil sulfoxido (DMSO), ET-1, ET-2, ET-3 e SRTX S6c apresentam efeito mitogênico equipotente e dose-dependente (FILADELFI *et al.*, 2004).

Em melanócitos humanos, ETs promovem a proliferação celular (YADA *et al.*, 1991; IMOKAWA *et al.*, 1992) e a melanogênese (YADA *et al.*, 1991; IMOKAWA *et al.*, 1995; TADA *et al.*, 1998) (FIGURA 2).

Ainda há controvérsia sobre as vias de sinalização envolvidas nos efeitos mitogênico e melanogênico das ETs sobre os melanócitos (FIGURA 2). Há evidências de ativação de uma proteína G_i (IMOKAWA *et al.*, 1996; 1997; 2000); aumento dos níveis de AMP_c (IMOKAWA *et al.*, 1996; 1997); aumento dos níveis intracelulares de IP_3 (YADA *et al.*, 1991; KOBAYASHI *et al.*, 2002) e Ca^{2+} (YADA *et al.*, 1991; IMOKAWA *et al.*, 1997; KANG *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 2002), assim como a manutenção da concentração de Ca^{2+} intracelular (IMOKAWA *et al.*,

2000); a ativação de proteína quinase A (dependente de AMP_c) (PKA) (IMOKAWA *et al.*, 1996; 1997), PKC (IMOKAWA *et al.*, 1996; 1997; 2000), PLC (KANG *et al.*, 1998, IMOKAWA *et al.*, 2000) e MAPKs (IMOKAWA *et al.*, 1996; 2000). PKC é capaz de fosforilar e ativar diretamente Raf-1 (KOLCH *et al.*, 1993; CACACE *et al.*, 1996; UEFFING *et al.*, 1997), que é um dos componentes da via de sinalização das MAPKs. Em melanócitos humanos, há indícios da ocorrência de conversa cruzada (*cross-talk*) entre a via de sinalização de PKC e de MAPKs, sendo PKC a provável responsável pela fosforilação de Raf-1 (IMOKAWA *et al.*, 1996; 2000).

FIGURA 2. Vias de sinalização intracelular participantes da estimulação da proliferação e melanogênese em melanócitos humanos. SCF, fator de células-tronco; c-Kit, receptor para a citocina SCF; SCFGM-CSF, fator estimulador de colônia granulócito-macrófago; HGF, fator de crescimento de hepatócitos; bFGF, fator básico de crescimento de fibroblastos; c-Met, receptor tirosina-quinase para GM-CSF, HGF e bFGF (Extraído de IMOKAWA *et al.* 1997).

Dados da literatura sugerem que o receptor ET_B seria o principal responsável pelos efeitos de endotelina em células pigmentares. São receptores deste tipo, por

exemplo, que induzem a agregação em melanóforos (HAYASHI *et al.*, 1996; RAMANZINI *et al.*, 2006) e a dispersão em leucóforos de teleósteos (FUJITA & FUJII, 1996), assim como a diferenciação de melanoblastos da crista neural de camundongos (BAYNASH *et al.*, 1994; OPDECAMP *et al.*, 1998). São eles também que modulam a proliferação de células da linhagem GEM-81 (FILADELFI *et al.*, 2004) e de melanócitos humanos normais (IMOKAWA *et al.*, 1997; IMOKAWA *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 1998; TADA *et al.*, 1998).

O receptor ET_A mostrou-se constante nos melanócitos de aves e mamíferos estudados por nosso laboratório (melanócitos de *Gallus gallus*, melanócitos B16, S-91 e Melan-A de *Mus musculus*, melanócitos SKMel-23 e SKMel-28 de *Homo sapiens*) (SCARPARO *et al.*, 2007), o qual poderia ter alguma participação, ainda não conhecida, na resposta às endotelinas nessas células. No entanto, um estudo em várias linhagens de melanoma humano sugeriu que, embora expressem ET_A, o principal receptor seria o ET_B, uma vez que a utilização de antagonista seletivo deste receptor inibiu a proliferação dessas células, mas não um antagonista seletivo para o ET_A (LAHAV *et al.*, 1999).

As ETs exercem várias funções fisiológicas, incluindo desenvolvimento celular da crista neural e neurotransmissão. No sistema vascular, a endotelina, através da ativação dos receptores ET_A, tem um papel vasoconstritor basal e contribui para o desenvolvimento de doença vascular na hipertensão e aterosclerose (SCHIFFRIN, 1999, BARTON, 2000). ETs contribuem para a contração do miocárdio (MAGUIRE & DAVENPORT, 2002), regulam o tônus dos brônquios pulmonares (UCHIDA *et al.*, 1988) e a proliferação dos vasos sangüíneos das vias aéreas, promovendo assim o desenvolvimento de hipertensão pulmonar (RUBIN *et al.* 2006). ETs também controlam a excreção de água e sódio e o balanço ácido-base nos rins sob condições fisiológicas (KOHAN, 2006). No cérebro, as ETs modulam centros cardio-

respiratórios e a liberação de hormônios (KEDZIERSKI & YANAGISAWA, 2001). Além disso, as ETs afetam a fisiologia e a patofisiologia do sistema imune (NETT *et al.*, 2006) e sistema reprodutor (MEIDAN & LEVY, 2007), fígado (BERTHIAUME *et al.*, 2005), osso (VON SCHROEDER *et al.*, 2003), próstata (NELSON *et al.*, 2003), tecido adiposo (BHATTACHARYA & ULLRICH, 2006; VAN HARMELEN *et al.*, 2008) e estão envolvidas na homeostase de glicose (BERTHIAUME *et al.*, 2005; LTEIF *et al.*, 2007).

ET-1 aumenta a expressão de genes para fatores de transcrição, incluindo *c-fos* e *c-myc* (SIMONSON & DUNN, 1990). Membros da família Fos formam heterodímeros com Jun, dando origem ao fator de transcrição AP-1 (*activator protein 1*). Em células mesangiais, obtidas a partir de explantes glomerulares de ratos, ET-1 induz a expressão de RNAm para c-Fos e c-Jun e aumenta a atividade transcricional conferida por elemento AP-1, dirigindo a expressão gênica de collagenase. ET-1 atua como elemento mitogênico nestas mesmas células (SIMONSON *et al.*, 1992).

As ETs podem regular a expressão de diversos genes em diferentes tipos celulares. Em adipócitos, ET-1 promove uma diminuição temporal e dose-dependente da expressão do RNAm para adiponectina, uma molécula relacionada com resistência à insulina e obesidade. Esse efeito ocorre através da ligação de ET-1 a receptores do tipo ET_A e ativação da via das MAPKs (JUAN *et al.*, 2007). ET-1 também é capaz de promover expressão de α -actina específica de musculatura lisa em células neurais isoladas do córtex cerebral (MORISHITA *et al.*, 2007).

Em corações murinos intactos, a ET-1 promove a expressão gênica do peptídeo natriurético do tipo B em resposta à sobrecarga induzida por aumento do fluxo coronariano, expressão esta relacionada ao processo de hipertrofia cardíaca (PIUHOLA *et al.*, 2007). ET-1 aumenta a atividade promotora do gene para β -MyHC (cadeia pesada de β -miosina) em cardiomiócitos, através da ativação da via das

MAPKs, promovendo hipertrofia cardíaca (CHENG *et al.*, 2005). ET-1 promove ainda um aumento na expressão do RNAm para cicloxigenase 2 (COX-2) em células endoteliais aórticas. O gene para COX-2 é reconhecido como tendo efeito pró-inflamatório sobre a vasculatura (SUGIYAMA *et al.*, 2004).

Em células musculares lisas A-10 e aortas intactas de ratos adultos, a ET-1 promove um rápido aumento dos níveis do RNAm para quinase-1 regulada por soro e glicocorticóides, molécula que participa na regulação da homeostase de sódio e pressão sangüínea por mineralocorticóides (WOLF *et al.*, 2006).

Em células da musculatura lisa vascular, a ET-1, através de sua ligação a receptores ET_A, aumenta os níveis do RNAm para o fator de crescimento do tecido conjuntivo, um mediador de fibrose superexpresso em lesões ateroscleróticas humanas, infarto do miocárdio e modelos experimentais de hipertensão (RODRIGUEZ-VITA *et al.*, 2005).

ET-1 promove aumento dos transcritos de RNAm para pró-colágeno $\alpha 1$, TGF β 1 e metaloproteinase de matriz, de forma dose-dependente, em células esteladas hepáticas (HSCs) de primeira passagem. As HSCs são células responsáveis pela produção de proteínas de matriz extracelular durante a injúria hepática (KODA *et al.*, 2006).

O tratamento de fibroblastos Rat-1 com ET-1 induz a expressão dos genes de relógio (*clock genes*) *Per1* e *Per2*, culminando com a sincronização dos padrões de expressão dos genes *Per1*, *Per2*, *Per3* e *dbp* (YAGITA *et al.*, 2001). ET-1 é considerada um agente sincronizador da expressão de genes de relógio (NAKAHATA *et al.*, 2006).

2) Rodopsina

2.1) Características gerais

O fotopigmento rodopsina é encontrado nos olhos dos vertebrados, em células especializadas denominadas bastonetes, que são neurônios altamente diferenciados responsáveis pela detecção de fótons. A rodopsina, assim como proteínas auxiliares são encontradas no segmento externo dos bastonetes (FIGURA 3).

FIGURA 3. a) Fotoativação da rodopsina. Alguns fotointermediários não foram incluídos. As escalas de tempo para as transformações, assim como λ_{max} de absorção para cada intermediário encontram-se indicados (Extraído de RIDGE & PALCZEWSKI, 2007). b) Resposta à luz de um fotorreceptor do tipo bastonete. Moléculas de rodopsina presentes no segmento externo dos discos absorvem os fótons, culminando com a hiperpolarização da membrana (Extraído de ALBERTS *et al.*, 2004a).

O segmento externo dos bastonetes é constituído por uma pilha de 1.000-2.000 discos distintos envolvidos pela membrana plasmática. Aproximadamente 50% da área da membrana dos discos são ocupados pela rodopsina, enquanto o espaço

remanescente é ocupado por fosfolípidos e colesterol (PALCZEWSKI, 2006). A rodopsina também está presente em uma menor densidade na membrana plasmática (MOLDAY & MOLDAY, 1987).

A rodopsina é constituída pela proteína transmembrânica denominada opsina que contém 348 resíduos de aminoácidos e pelo cromóforo 11-*cis*-retinal (FIGURA 4), sendo homóloga a outros membros de família de receptores acoplados à proteína G. A rodopsina constitui mais de 90% do componente protéico do sistema de membranas presente no segmento externo dos bastonetes dos vertebrados (PAPERMASTER & DREYER, 1974).

FIGURA 4. a) Modelo bidimensional da rodopsina. C-I, C-II e C-III: domínios citoplasmáticos. E-I, E-II, E-III e E-IV: domínios extracelulares. O cromóforo 11-*cis*-retinal (não apresentado) liga-se à proteína pela Lys²⁹⁶. b) Localização do cromóforo. A localização proposta da membrana é mostrada em cinza e a do cromóforo 11-*cis*-retinal é mostrada através da exclusão de fragmentos das hélices transmembrânicas. Dois lados da rodopsina são ilustrados (Extraído de PALCZEWSKI, 2006).

Ao absorver um fóton de luz, o 11-*cis*-retinal isomeriza-se para *all-trans*-retinal. A rodopsina ativada promove o desligamento do GDP (difosfato de guanosina) da subunidade α da proteína G transducina (G_t) e a sua substituição por GTP (trifosfato de guanosina). A subunidade α dissocia-se do complexo $\beta\gamma$, ativando a fosfodiesterase de GMP_c . A hidrólise de GMP_c faz com que seus níveis citossólicos caiam, reduzindo a quantidade de GMP_c ligado aos canais 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 (FIGURA 3 e FIGURA 5). Dessa forma, o sinal luminoso é convertido em sinal elétrico para o córtex visual do cérebro (ALBERTS *et al.*, 2004a).

FIGURA 5. Fototransdução em bastonetes (Extraído de PURVES *et al.*, 2000).

2.2) Regulação da transcrição em mamíferos e peixes teleósteos

A regulação transcricional da expressão da rodopsina envolve, pelo menos, duas regiões reguladoras distintas: região promotora proximal da rodopsina

(*rhodopsin proximal promoter region*, RPPR) (ZACK *et al.*, 1991; LEM *et al.*, 1991; CHEN & ZACK, 1996) e uma região distal que atua como um *enhancer* da rodopsina (*rhodopsin enhancer region* – RER) (NIE *et al.*, 1996).

A RPPR apresenta locais de acoplamento para fatores de transcrição (FIGURA 6). Dentre eles, pode-se citar o NRE (*neural retina leucine zipper response element*) (REHEMTULLA *et al.*, 1996), Ret-4/BAT-1 (CHEN & ZACK, 1996; CHEN *et al.*, 1997), Ret-1-PCE1 (MORABITO *et al.*, 1991; KIKUCHI *et al.*, 1993) e E(opsin)-1 (AHMAD, 1995). NRE e Ret-4/BAT-1 atuam como local de acoplamento para as proteínas NRL (*neural retina leucine zipper*) e CRX (*cone rod homeobox*), respectivamente (REHEMTULLA *et al.*, 1996; KUMAR *et al.*, 1996). Ret-1-PCE1 atua como local de acoplamento para as proteínas CRX (CHEN *et al.*, 1997), ERX (*empty-spiracles-related retinal homeobox*) (MARTINEZ & BARNSTABLE, 1998), RX (*retinal homeobox*) (KIMURA *et al.*, 2000) e QRX (*Q-50 type retinal homeobox*) (WANG *et al.*, 2004) *in vitro*, não sendo claro se também ocupariam esse elemento *in vivo*.

FIGURA 6. Modelo do complexo de iniciação da transcrição no promotor do gene da rodopsina. TBP = TATA *binding protein*; RNAP II = RNA polimerase II (Extraído de CHENG *et al.*, 2004).

O fator de transcrição NRL pertence à família bZIP de fatores de transcrição, apresentando um domínio bZIP de ligação ao DNA, rico em resíduos de aminoácidos básicos, adjacente a um *zipper* formado pela repetição de resíduos hidrofóbicos, geralmente de leucina, responsável pela homodimerização ou formação de dímeros com outros fatores bZIP. A proteína NRL apresenta grande homologia de sequência com o produto do oncogene *v-maf* que, por sua vez, contém um motivo *zipper* de leucina semelhante àquele encontrado em outras proteínas de ligação ao DNA, como os produtos dos oncogenes *fos*, *jun* e *myc* (NISHIZAWA *et al.*, 1989). NRL pode formar homodímeros, assim como heterodímeros com vários membros da família c-Fos e c-Jun (KATAOKA *et al.*, 1994; KERPPOLA *et al.*, 1994). O NRL pode ser agrupado a uma subfamília dentro da família de fatores de transcrição bZIP, denominada subfamília Maf. O conjunto das grandes proteínas Maf engloba c-Maf, MafB, L-Maf e o NRL (MOTOHASHI *et al.*, 2002; FRIEDMAN *et al.*, 2004).

NRE é um elemento AP-1, capaz de ligar heterodímeros de c-Fos e c-Jun. Contudo, é NRL quem preferencialmente transativa o NRE, quando comparado a c-Fos e c-Jun (KUMAR *et al.*, 1996).

A proteína de homeodomínio CRX possui a capacidade de ligar-se ao Ret-4 e/ou BAT-1, atuando como transativadora do promotor da rodopsina (CHEN *et al.*, 1997). NRL e CRX interagem entre si, sendo que ambas as proteínas agem transativando o promotor da rodopsina (MITTON *et al.*, 2000). Dois receptores nucleares órfãos, NR2E3 e NR1D1, parecem participar da ativação da transcrição de rodopsina, em conjunto com NRL e CRX (CHENG *et al.*, 2004).

Evidências indicam que uma proteína com dedos de zinco, denominada Fiz1, é capaz de interagir com o fator de transcrição NRL, podendo modular a sua função (MITTON *et al.*, 2003). Da mesma maneira, Baf (*barrier to autointegration factor*) foi

identificada como sendo uma proteína capaz de interagir com CRX, reprimindo sua função de transativação (WANG *et al.*, 2002).

Membros da família Sp de fatores de transcrição também parecem estar envolvidos na modulação da expressão do gene para rodopsina. Sp4 é capaz de ativar a transcrição deste gene, através de sua interação com CRX (LERNER *et al.*, 2005).

Os genes para rodopsina em vertebrados apresentam uma organização de exons e introns altamente conservada, contendo cinco exons e quatro introns (YOKOYAMA, 2000). Entretanto, em todos os peixes teleósteos já estudados, os genes que codificam para rodopsina não possuem introns (FITZGIBBON *et al.*, 1995; VENKATESH *et al.*, 1999). Apesar da ausência de introns, a expressão do gene parece ser modulada por elementos conservados. Em *Danio rerio*, foi caracterizado um gene homólogo ao gene para CRX de mamíferos (LIU *et al.*, 2001). Na RPPR, as seqüências BAT-1 e NRE estão conservadas em *Danio rerio*, enquanto Ret-1 e Ret-4 não estão (KENNEDY *et al.*, 2001). Contudo, a seqüência localizada entre BAT-1 e Ret-1, denominada IRB (*inter-Ret-1-BAT-1*), é capaz de ligar o CRX de *Danio* (KAWAMURA *et al.*, 2005).

Em carpa (*Cyprinus carpio*), foram identificadas três regiões no promotor do gene da rodopsina denominadas cBAT-1 (*carp BAT-1-like element*), cNRE (*carp NRE-like element*) (SU *et al.*, 2000) e CSE (*carp-specific element*) (MA *et al.*, 2001). cBAT-1 e CSE possuem a capacidade de ligar a mesma proteína nuclear, o CRX. cBAT-1 e CSE parecem atuar da mesma maneira que BAT-1 e Ret-4 atuam em mamíferos. Já cNRE parece ligar uma proteína nuclear que deve diferir antigenicamente da proteína NRL de mamíferos (MA *et al.*, 2001). Há indícios de que as proteínas de ligação ao CSE e cNRE interajam entre si, assim como ocorre com CRX e NRL em mamíferos (WANG *et al.*, 2002).

No peixe teleósteo *Fugu rubripes*, o promotor da rodopsina, apesar de não apresentar introns, é funcionalmente equivalente ao do gene para rodopsina em tetrápodes. A comparação do promotor da rodopsina desse peixe com o de tetrápodes indicou a presença de vários motivos conservados, incluindo o NRE (ZHANG *et al.*, 2003).

2.3) Síntese

Nos bastonetes, as moléculas de rodopsina são sintetizadas no segmento interno, mais especificamente, no retículo endoplasmático rugoso (RER), sendo então transportadas para o complexo de Golgi (PAPERMASTER *et al.*, 1978). O fato de a síntese de rodopsina ocorrer no RER, ao invés de polirribossomos livres no citoplasma, indica que esta proteína inicia sua vida como uma proteína de membrana (PAPERMASTER, 2002). De fato, a rodopsina liga-se à membrana tão logo é sintetizada (PAPERMASTER *et al.*, 1975). A molécula de rodopsina é glicosilada (HELLER, 1968), sendo que seus oligossacarídeos são modificados de forma pós-traducional no complexo de Golgi (PAPERMASTER *et al.*, 1978; FUKUDA *et al.*, 1979).

A rodopsina é então transportada em membranas que brotam da rede trans-Golgi, que posteriormente se fundem com a membrana plasmática próxima ao cílio conectivo (estrutura que conecta o segmento interno ao segmento externo dos bastonetes) (PAPERMASTER *et al.*, 1985; PAPERMASTER *et al.*, 1986; DERETIC & PAPERMASTER, 1991), mais especificamente, com uma região apical do segmento interno (PETERS *et al.*, 1983; PAPERMASTER *et al.*, 1986; PAPERMASTER, 2002; MAERKER *et al.*, 2008). A região apical do segmento interno possui um sistema de transporte ciliar (ROEPMAN & WOLFRUM, 2007) que transporta a carga para o segmento externo.

A região C-terminal da proteína é essencial para a interação com a maquinaria de transporte que entrega a carga de proteínas transmembrânicas e proteínas associadas a membranas através de vesículas membranosas ao segmento externo dos bastonetes (SUNG *et al.*, 1994; DERETIC *et al.*, 1998; TAM *et al.*, 2000). O motivo C-terminal de endereçamento da rodopsina liga-se à pequena GTPase ARF4, membro da família ARF de reguladores de brotamento de membrana e endereçamento de proteínas (DERETIC *et al.*, 2005), enquanto a proteína de endereçamento RAB8 é implicada na junção das membranas pós-Golgi contendo rodopsina (MORITZ *et al.*, 2001).

Em bastonetes da retina de sapo *in vivo*, o RER presente no segmento interno fica fortemente marcado logo após a exposição a aminoácidos marcados radioativamente. Após 30-60 minutos, o aparelho de Golgi localizado no segmento interno se torna o local com a maior presença de marcação. Após 1-2 horas adicionais, as proteínas recentemente sintetizadas são transportadas vetorialmente para a base do segmento externo dos bastonetes, embora algumas sejam transportadas para a sinapse na extremidade oposta da célula (FIGURA 7). Ainda em bastonetes de sapo, as moléculas de rodopsina recentemente sintetizadas chegam ao segmento externo após incorporação de isótopo radioativo *in vitro* em intervalo semelhante àquele dos estudos *in vivo* de transporte de proteínas radioativamente marcadas em bastonetes (YOUNG & DROZ, 1968; HALL *et al.*, 1969; YOUNG, 1976; PAPERMASTER *et al.*, 1975; PAPERMASTER *et al.*, 1985; PAPERMASTER *et al.*, 1986; DERETIC & PAPERMASTER, 1991).

FIGURA 7. Diagrama ilustrando a síntese protéica em bastonetes após a administração de aminoácidos radioativos. a) As proteínas encontram-se inicialmente concentradas no principal local de síntese, localizado no segmento interno. b) As moléculas protéicas então se difundem pela célula, muitas delas sendo exportadas pelo complexo de Golgi, organela na qual recebem a adição de carboidratos. c) A maior parte das proteínas atravessa o cílio conectivo e é incorporada às membranas localizadas na base do segmento externo. Parte das proteínas se difunde a partir das novas membranas para a membrana celular externa, com a qual são contíguas. d) Separação das membranas duplas em forma de disco da membrana externa prende as proteínas marcadas dentro dos discos. A formação repetida de novas membranas desloca os discos marcados ao longo do segmento externo. e) Os discos atingem o final da célula e são liberados. Os discos liberados são fagocitados pelo epitélio pigmentar (Extraído de YOUNG, 1976).

3) Células pigmentares e fotopigmentos não-visuais

Além das estruturas oculares convencionais, vertebrados e invertebrados utilizam sistemas fotorreceptores oculares e extraoculares para funções não-visuais (não formadoras de imagem). A informação fótica mediada por sistemas fotorreceptores não-visuais está envolvida na fisiologia temporal e comportamental do animal, por exemplo, fotoperiodismo na locomoção e reprodução, sincronização

de ritmos circadianos e mudanças de cor (SANTILLO *et al.*, 2006).

Os cromatóforos podem responder diretamente à luz incidente, promovendo a translocação dos grânulos de pigmentos ao longo dos processos dendríticos das células, permitindo que o animal efetue uma mudança de cor rápida ou fisiológica. A resposta dos cromatóforos diretamente à luz é observada principalmente nos estágios embrionários e larvais, quando os cromatóforos ainda não estão sob o controle nervoso e/ou endócrino, mas também pode ocorrer em cromatóforos desinervados ou em peixes cegos (FUJII, 2000).

No peixe *Oryzias latipes*, os xantóforos respondem à luz com agregação de seus pigmentos, não importando se são inervados ou não, sendo que esta resposta não é inibida por bloqueadores de adrenoceptores, sugerindo assim que a agregação não é promovida por norepinefrina, mas diretamente pela ação da luz (KAWAI, 1989). A luz pode agregar ou dispersar os grânulos de pigmento nos eritróforos do peixe *Oreochromis niloticus* (BAN *et al.*, 2005), cuja fotossensibilidade independe da idade do animal (OSHIMA & YOKOZEKI, 1999).

Em eritróforos de *Oreochromis niloticus*, a agregação pigmentar é causada por luz com comprimento de onda ao redor de 365, 400 ou 600nm, enquanto a dispersão ocorre em comprimento próximo a 500nm (SATO *et al.*, 2004). A presença de RNAm para opsina vermelha e opsina verde foi determinada nas guelras da tilápia, apenas na região onde eritróforos estão presentes (BAN *et al.*, 2005). Iridóforos de *Paracheirodon innesi* respondem diretamente à luz com comprimento de onda próximo a 500nm e expressam RNAm para rodopsina e dois tipos de opsinas de cones (Pi-green 1 e Pi-green2) (KASAI & OSHIMA, 2006).

Em melanóforos de girinos do anfíbio *Xenopus laevis*, a resposta de agregação de melanossomos à luz ocorre na região espectral compreendida entre 400-600nm, sendo a resposta máxima obtida em 500nm (MORIYA *et al.*, 1996). Este espectro de

ação é similar ao espectro de absorção da rodopsina (DANIOLOS *et al.*, 1990). Já a resposta de dispersão ocorre em 460nm através do fotopigmento melanopsina (*Opn4*) (ISOLDI *et al.*, 2005).

As respostas dos cromatóforos evocadas por luz parecem ser mediadas por moléculas fotorreceptoras expressas nestas células. A melanopsina, uma proteína identificada a partir de melanóforos dérmicos de *Xenopus leavis*, é um exemplo de proteína fotorreceptora que pode ser encontrada em cromatóforos de vertebrados ectotérmicos. Curiosamente, a descoberta da melanopsina ocorreu a partir da pesquisa do mecanismo de migração de grânulos de pigmento, em resposta à iluminação (PROVENCIO *et al.*, 1998), mas trata-se do fotopigmento presente em células ganglionares da retina de mamíferos, responsável pelo ajuste do relógio ao ciclo claro-escuro.

Fotopigmentos também são expressos em células pigmentares de mamíferos. A linhagem celular Melan A2 de melanócitos imortalizados do camundongo C57 *BL* 6*N* expressa a proteína rodopsina. RNAm para rodopsina é encontrado em amostras de pele desta mesma linhagem (MIYASHITA *et al.*, 2001).

O melanoma maligno é um tipo de tumor derivado de melanócitos cutâneos, localizados tanto em pele normal, quanto em nevi, que progride através de fases de crescimento radial e vertical, evoluindo então para metástases (HARTMANN *et al.*, 2005). Antígenos retina-câncer (*cancer-retina antigens* – CRAs) são proteínas envolvidas na fototransdução do sinal luminoso, cuja expressão está normalmente restrita a células fotorreceptoras e glândula pineal (BAZHIN *et al.*, 2008). Porém, CRAs podem encontrar-se expressos de maneira aberrante em células de melanoma (HARTMANN *et al.*, 2005; BAZHIN *et al.*, 2007) e em carcinomas de pulmão (POLANS *et al.*, 1995). É interessante mencionar que tanto células fotorreceptoras como os melanócitos têm a mesma origem embrionária (ectoderme

neural) (ARNHEITER, 1998).

Transcritos para rodopsina, proteína G_t , fosfodiesterase de GMP_c 6 (PDE6), canais dependentes de GMP_c , guanilil-ciclase 1 (GC1), quinase de rodopsina, recoverina (Rec) e arrestina (Arr) são encontrados em células de melanoma humano. As proteínas rodopsina, fosfodiesterase de GMP_c 6, guanilil-ciclase e recoverina estão presentes em melanomas, mas não em amostras de pele normal, nevi, melanócitos normais em cultura ou em queratinócitos (BAZHIN *et al.*, 2007).

Em células de melanoma humano, a luz visível causa uma diminuição nos níveis de RNAm para rodopsina, proteína G_t e PDE6 e promove um aumento nos níveis do RNAm para GC1, Rec e Arr. Foi observada uma diminuição nos níveis protéicos de rodopsina e transducina após a exposição à luz, o que não ocorreu com a proteína PDE6. Os níveis protéicos de GC1, Rec e Arr aumentaram após o tratamento com luz (BAZHIN *et al.*, 2008). Há indícios de que a modulação da expressão dos genes para rodopsina e PDE6 nas células de melanoma envolva membros da família Sp de fatores de transcrição (Sp1, Sp3 e Sp4) (BAZHIN *et al.*, 2008), que têm importante papel na expressão destes genes em fotorreceptores (LERNER *et al.*, 2005). Já o aumento dos níveis de RNAm para Rec e Arr parece envolver a via de sinalização das MAPKs (BAZHIN *et al.*, 2008).

BAZHIN e colaboradores (2008) sugerem que em células cancerígenas que expressam CRAs, a estimulação por luz levaria à ativação da rodopsina, podendo induzir a apoptose. Portanto, a regulação dos níveis protéicos de CRAs induzida por luz em células de melanoma poderia ser um mecanismo de prevenção de apoptose.

Em humanos, a expressão dos CRAs em células de melanoma pode gerar uma resposta autoimune (BAZHIN *et al.*, 2007; MAEDA *et al.*, 2001) que, por sua vez, pode eventualmente levar ao desenvolvimento de degeneração retiniana paraneoplásica (THIRKILL *et al.*, 1987; BAZHIN *et al.*, 2007).

4) O modelo biológico: linhagens GEM-81 de *Carassius auratus* e B16 de *Mus musculus*

A linhagem de células GEM-81 foi estabelecida a partir de tumores espontâneos (eritroforomas), que apareceram em animais adultos, de coloração vermelha, da espécie de peixe teleósteo *Carassius auratus* (MATSUMOTO *et al.*, 1980). Quando tratadas com DMSO 1,5% por 96h, essas células apresentam aumento da atividade tirosinásica, indicando assim, que o DMSO estimula a síntese e/ou a ativação da enzima responsável pela formação da melanina (MATSUMOTO *et al.*, 1981).

Células B16 foram obtidas a partir de melanoma do camundongo *Mus musculus*, linhagem C57 *black 6J*.

Em nosso laboratório foi demonstrada a expressão de rodopsina na linhagem de eritroforoma GEM-81 do peixe teleósteo *Carassius auratus* (IM *et al.*, 2006) e em melanócitos B16 do camundongo *Mus musculus* (CASTRUCCI *et al.*, dados ainda não publicados), ambas linhagens de células pigmentares. O fotopigmento rodopsina expresso nestas células parece ser funcional, já que a luz visível inibe a proliferação destas células (IM *et al.*, 2006; CASTRUCCI *et al.*, dados ainda não publicados).

Resultados do laboratório também demonstraram a presença de receptores para endotelina ET_B na linhagem GEM-81 (FILADELFI *et al.*, 2004) e ET_A em B16 (SCARPARO *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

1) Geral

Verificar se a expressão gênica e a tradução da rodopsina em célula pigmentar de vertebrados pode ser modulada por endotelinas e sarafotoxinas, quais são as vias de sinalização intracelular envolvidas e se esse sistema está conservado ao longo da evolução.

2) Específicos

Verificar os efeitos temporais e dose-dependentes de safarotoxina S6c sobre a expressão gênica de rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de teleósteo; verificar os efeitos temporais e dose-dependentes de endotelina-1 sobre a expressão gênica de rodopsina em células de melanoma B16 de camundongo.

Estabelecer quais as vias de sinalização intracelular envolvidas na modulação da expressão gênica de rodopsina por SRTX S6c na linhagem GEM-81 e por ET-1 na linhagem B16.

Verificar se a tradução de rodopsina é afetada por SRTX S6c na linhagem GEM-81 e por ET-1 na linhagem B16.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Manutenção das células

As células GEM-81 foram mantidas em meio F-10 de Ham (Cultilab, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell, Brasil), 14,3mM de NaHCO_3 e 15mM de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanolsulfônico), pH 7,2, na presença de 1% de solução antibiótica/antimicótica contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B (Sigma, E.U.A.), a 25°C.

As células B16 foram mantidas em meio F-10 de Ham (Cultilab, Brasil), suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Brasil), 14,3mM de NaHCO_3 e 15mM de HEPES, pH 7,2, na presença de 1% de solução antibiótica/antimicótica contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B (Sigma, E.U.A.), em atmosfera de 95% O_2 , 5% CO_2 , a 37°C.

O meio de cultura foi trocado sob fluxo laminar (modelo FLV, Trox, Brasil) e as células foram subcultivadas após atingirem a confluência. Para tanto foram removidas com TrypLE™ Express (Gibco, E.U.A.).

2) Quantificação do RNAm para rodopsina

2.1) Ensaios hormonais

2.1.1) Linhagem GEM-81

Após a semeadura (3×10^6 células/frasco de 25cm²), as células GEM-81 foram mantidas em escuro constante, em meio F-10 de Ham (Cultilab, Brasil), suplementado com 2% de SFB (Nutricell, Brasil), 14,3mM de NaHCO_3 e 15mM de HEPES, pH 7,2, na presença de 1% de solução antibiótica/antimicótica contendo

penicilina, estreptomicina e anfotericina B (Sigma, E.U.A.), 1,5% de DMSO, a 25°C. As células foram mantidas sob essa condição pelos 5 dias anteriores à adição do hormônio. O meio de cultura foi trocado sob fluxo laminar (modelo FLV, Trox, Brasil), sob luz vermelha proveniente de um iluminador Konex com lâmpada de 7W e com filtro Safe-Light GBX-2 (Kodak, E.U.A.), 24 horas após a semeadura e, posteriormente, a cada 48 horas.

Cinco dias após a semeadura, as células foram tratadas com SRTX S6c (Calbiochem, E.U.A.) em concentrações crescentes (10^{-11} a 10^{-7} M), por períodos crescentes (6, 12 e 24 horas; FIGURA 8), nas mesmas condições acima descritas, mas na ausência de DMSO. Ao final de cada período de tratamento, foi realizada a extração de RNA total, seguida por RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) e PCR em tempo real (quantitativo).

FIGURA 8. Protocolo experimental. Ensaios hormonais com células GEM-81.

2.1.2) Linhagem B16

Após a semeadura (10^6 células/frasco de 25cm^2), as células B16 foram mantidas em escuro constante, em meio F-10 de Ham (Cultilab, Brasil), suplementado com 2% de SFB (Cultilab, Brasil), 14,3mM de NaHCO_3 e 15mM de HEPES, pH 7,2, na presença de 1% de solução antibiótica/antimicótica contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B (Sigma, E.U.A.), em atmosfera de 95% O_2 , 5% CO_2 , a 37°C . As células foram mantidas sob essa condição pelos 5 dias anteriores à adição do hormônio e durante todo o período de tratamento. O meio de cultura foi trocado sob fluxo laminar (modelo FLV, Trox, Brasil), sob luz vermelha proveniente de um iluminador Konex com lâmpada de 7W e com filtro Safe-Light GBX-2 (Kodak, E.U.A.), 24 horas após a semeadura e, posteriormente, a cada 48 horas.

Cinco dias após a semeadura, as células foram tratadas com endotelina (ET-1, Calbiochem, E.U.A.) em concentrações crescentes (10^{-11} a 10^{-7}M), por períodos crescentes (6, 12, 24 e 48 horas; FIGURA 9), nas mesmas condições acima descritas. Ao final de cada período de tratamento, foi realizada a extração de RNA total, seguida por RT-PCR e PCR em tempo real.

FIGURA 9. Protocolo experimental. Ensaios hormonais com células B16.

2.2) Determinação das vias de sinalização intracelular envolvidas na modulação dos níveis do RNAm para rodopsina

2.2.1) Linhagem GEM-81

Após a semeadura (3×10^6 células/frasco de 25cm^2), as células GEM-81 foram mantidas em escuro constante, em meio F-10 de Ham (Cultilab, Brasil), suplementado com 2% de SFB (Nutricell, Brasil), 14,3mM de NaHCO_3 e 15mM de HEPES, pH 7,2, na presença de 1% de solução antibiótica/antimicótica contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B (Sigma, E.U.A.), 1,5% de DMSO, a 25°C . As células foram mantidas sob essa condição pelos 5 dias anteriores à adição do hormônio. O meio de cultura foi trocado sob fluxo laminar (modelo FLV, Trox, Brasil), sob luz vermelha proveniente de um iluminador Konex com lâmpada de 7W e com filtro Safe-Light GBX-2 (Kodak, E.U.A.), 24 horas após a semeadura e, posteriormente, a cada 48 horas.

Cinco dias após a semeadura, as células foram tratadas com SRTX S6c

(Calbiochem, E.U.A.) na concentração de 10^{-9} M, na presença ou ausência de inibidores/bloqueadores (TABELA III) das vias de sinalização por 24 horas (FIGURA 10), nas mesmas condições acima descritas, mas na ausência de DMSO. Ao final de cada período de tratamento, foi realizada a extração de RNA total, seguida por RT-PCR e PCR em tempo real.

2.2.2) Linhagem B16

Após a semeadura (10^6 células/frasco de 25cm^2), as células B16 foram mantidas em escuro constante, em meio F-10 de Ham (Cultilab, Brasil), suplementado com 2% de SFB (Cultilab, Brasil), 14,3mM de NaHCO_3 e 15mM de HEPES, pH 7,2, na presença de 1% de solução antibiótica/antimicótica contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B (Sigma, E.U.A.), em atmosfera de 95% O_2 , 5% CO_2 , a 37°C . As células foram mantidas sob essa condição pelos 5 dias anteriores à adição do hormônio e durante todo o período de tratamento. O meio de cultura foi trocado sob fluxo laminar (modelo FLV, Trox, Brasil), sob luz vermelha proveniente de um iluminador Konex com lâmpada de 7W e com filtro Safe-Light GBX-2 (Kodak, E.U.A.), 24 horas após a semeadura e, posteriormente, a cada 48 horas.

Cinco dias após a semeadura, as células foram tratadas com ET-1 (Calbiochem, E.U.A.) na concentração de 10^{-10} M, na presença ou ausência de inibidores/bloqueadores (TABELA III) das vias de sinalização por 24 horas (FIGURA 10), nas mesmas condições acima descritas. Ao final de cada período de tratamento, foi realizada a extração de RNA total, seguida por RT-PCR e PCR em tempo real.

TABELA III. Bloqueadores/inibidores das vias de sinalização

Inibidor/bloqueador	Especificidade	Fornecedor
U-73122 → 1-(6-((17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione	inibidor de PLC	BIOMOL, E.U.A.
BAPTA-AM → 1,2-bis-(o-aminophenoxy)-ethane-N,N,-N',N'-tetraacetic acid tetraacetoxymethyl ester	quelante de Ca ²⁺	Research Biochemicals International, E.U.A.
Calmidazolium Chloride → R 24571	antagonista para calmodulina	BIOMOL, E.U.A.
KN-93 → 2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine)	inibidor de proteína quinase dependente de Ca ²⁺ /calmodulina II	BIOMOL, E.U.A.
Ro31-8220 → 2-[1-(3-(amidinothio)propyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1-methylindol-3-yl)maleimide-methanesulfonate	inibidor de PKC	BIOMOL, E.U.A.
GW 5074 → 3-(3,5-dibromo-4-hydroxybenzylidene)-5-iodo-1,3-dihydroindol-2-one	inibidor de cRaf-1	BIOMOL, E.U.A.
PD-98059 → 2'-amino-3'-methoxyflavone	inibidor de MEK (MAP quinase quinase)	CALBIOCHEM, E.U.A.
5-iodotubercidin → 4-amino-5-iodo-7-(β -D-ribofuranosyl)-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine	inibidor de ERK2 (MAP quinase 1)	BIOMOL, E.U.A.

FIGURA 10. Protocolo experimental. Determinação das vias de sinalização intracelular.

2.3) Quantificação dos níveis do RNAm para rodopsina por PCR em tempo real (quantitativo)

2.3.1) Extração de RNA total e RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*)

O meio foi descartado e adicionou-se 1mL de *TRIzol Reagent* (Invitrogen, E.U.A.) diretamente sobre as células. O lisado celular foi transferido para um *eppendorf* e deixado em repouso por 5 min em temperatura ambiente. Ao lisado celular foram adicionados 200 μ L de BCP (1-bromo-3-cloropropano), seguido de agitação vigorosa por 15 seg e descanso de 10 min em temperatura ambiente. Após centrifugação a 12.000 x g por 15 min a 4°C, separou-se a fase superior que contém RNA (500 μ L). O RNA foi precipitado com a adição de 650 μ L de isopropanol, por 10 min em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000 x g por 35 min a

4°C. O sobrenadante foi removido, o RNA lavado com 1,3mL de etanol 75% (2x), evaporado em temperatura ambiente e ressuspendido em 20µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (H₂O DEPC, Ambion Inc., E.U.A.). Para remoção de eventual contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase (kit *turboDNA-free*TM, Ambion Inc., E.U.A.). Adicionou-se a cada amostra, 10% do volume do *10x Turbo DNase Buffer*, 1µL de *Turbo DNase*, seguindo-se incubação de 30 min, a 37°C. Logo após, foram acrescentados 3µL ou 10% do volume do reagente de inativação da *DNase*, seguindo-se incubação de 2 min em temperatura ambiente, período durante o qual as amostras foram agitadas por 2 a 3x. Após centrifugação a 10.000 x g por 2 min, o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo *eppendorf* e a concentração de RNA foi determinada por leitura a OD₂₆₀ e a qualidade pela razão OD₂₆₀/OD₂₈₀ em espectrofotômetro (GeneQuant Pro Spectrophotometer, Biochrom Ltd., Reino Unido ou NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop, E.U.A.). O RT-PCR foi realizado com 1µg de RNA total, utilizando 1µL de oligonucleotídeos randômicos (100ng/µL) e 1µL de dNTP mix (10mM), em reação com volume final de 13µL, corrigido com H₂O DEPC. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, as amostras foram incubadas por 5 min a 65°C e 1 min a 4°C. Imediatamente após a incubação, adicionou-se às amostras 4µL de tampão para PCR (5x), 1µL de DTT (0,1M), 1µL de inibidor de ribonuclease (40U/µL) e 1µL da enzima *Superscript III* (Invitrogen, E.U.A.), para um volume de 20µL. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada por 5 min a 25°C, 50 min a 50°C e 15 min a 70°C. O DNA complementar (cDNA) sintetizado foi utilizado na reação subsequente de PCR.

2.3.2) PCR em tempo real (quantitativo)

As reações de PCR em tempo real foram feitas com um par de *primers* específicos para rodopsina de cada espécie (desenhados pelo programa Primer Express, Applied Biosystems, U.S.A.) (TABELA IV), através da utilização do fluoróforo *SYBR Green*.

TABELA IV. Seqüências dos *primers* utilizados nos ensaios de PCR quantitativo

Primer	Seqüência	Seletividade
<i>forward</i>	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	RNA 18S
<i>reverse</i>	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	RNA 18S
<i>forward</i>	5'-TGCCACACTTGGAGGTGAAA-3'	rodopsina de <i>Mus musculus</i>
<i>reverse</i>	5'-ACCACGTAGCGCTCAATGG-3'	rodopsina de <i>Mus musculus</i>
<i>forward</i>	5'-CGCGTACATGTTCTTCTTGATTAT-3'	rodopsina de <i>C. auratus</i>
<i>reverse</i>	5'-TGCTCGATGGTGACGTACAGA-3'	rodopsina de <i>C. auratus</i>

Para evitar possíveis erros intra-ensaio (HEID *et al.*, 1996, BUSTIN, 2002), utilizou-se como normalizador o RNA ribossômico 18S, com *primers* desenhados em região altamente conservada que permite usá-los em ambas as linhagens celulares, GEM-81 e B16 (TABELA IV).

Para os ensaios, foram preparadas soluções contendo os *primers*, *iQ*TM *SYBR*[®] *Green Supermix 2x* (Bio-Rad Laboratories, E.U.A.) ou *SYBR*[®] *GreenER*TM *qPCR SuperMix for iCycler*[®] *2x* (Invitrogen, E.U.A.) e H₂O DNaseRNase-free (Ambion Inc., E.U.A.), obtendo-se uma concentração final de 300nM para os *primers* de rodopsina e 50nM para os *primers* do RNA 18S. Essa solução foi aliquoteada (48µL, sendo cada alíquota suficiente para 2 poços) em tubos *ependorf* e o cDNA de cada amostra foi adicionado (2µL/alíquota). As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa de experimento (23µL/poço). Controles negativos foram incluídos rotineiramente, feitos sem cDNA. Todos os ensaios foram

realizados em um termociclador iCycler[®] (Bio-Rad Laboratories, E.U.A.), nas seguintes condições: ciclo 1: 1x 95°C por 3 minutos; ciclo 2: 40x 95°C por 10 segundos, 55°C por 45 segundos; ciclo 3: 1x 95°C por 1 minuto; ciclo 4: 1x 55°C por 1 minuto; ciclo 5: 80x 55°C por 10 segundos, com aumento gradativo de 0,5°C (para o iQ[™] SYBR[®] Green Supermix 2x, Bio-Rad Laboratories, E.U.A.) ou ciclo 1: 1x 50°C por 2 minutos, ciclo 2: 1x 95°C por 8 minutos e 30 segundos; ciclo 3: 40x 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto; ciclo 4: 1x 95°C por 1 minuto, 1x 55°C por 1 minuto; ciclo 5: 80x 55°C por 10 segundos, com aumento gradativo de 0,5°C (para o SYBR[®] GreenER[™] qPCR SuperMix for iCycler[®] 2x, Invitrogen, E.U.A.).

O fluoróforo SYBR Green intercala-se ao DNA durante sua amplificação, promovendo um aumento da fluorescência (NATH *et al.*, 2000). O SYBR Green intercala-se a qualquer fita dupla de DNA que está sendo amplificada, não sendo específico. Para determinar se houve a amplificação de produtos inespecíficos, são obtidas *melting curves*. Durante essa fase, a temperatura é aumentada em 0,5°C a intervalos de tempo determinados e a fluorescência dos poços obtida em cada fase. As curvas ideais mostram apenas um pico de queda de fluorescência em cada poço, numa temperatura que coincide com a *melting temperature* do produto esperado (quando o produto se dissocia). Quando há produtos inespecíficos, eles formam outro(s) pico(s) de fluorescência em diferentes temperaturas, sendo esses poços imediatamente excluídos da análise.

A comparação entre número de cópias dos poços controle e experimentais é feita entre as porções de crescimento geométrico das curvas, passando-se uma reta denominada limiar, que cruza as curvas em determinados ciclos (C_T). Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (C_T), acha-se o ΔC_T que é a diferença entre esses valores para o gene de interesse (rodopsina) e para o RNA 18S. A seguir, são subtraídos os valores encontrados para os poços tratados daqueles dos

poços controle, obtendo-se o $\Delta\Delta C_T$. Colocando-se esse valor como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) é obtido o número de vezes que o gene está expresso após o tratamento em questão em relação ao controle. Os resultados são transformados, estabelecendo-se como 100% a expressão do gene no grupo controle.

3) Quantificação da proteína rodopsina

3.1) Linhagem GEM-81

Após a semeadura (9×10^6 células/frasco de 75cm^2), as células GEM-81 foram mantidas nas mesmas condições descritas no item 2.1.1 da seção Material e Métodos.

Cinco dias após a semeadura, as células foram tratadas com SRTX S6c na concentração de 10^{-9}M (Calbiochem, E.U.A.), nas mesmas condições descritas no item 2.1.1 da seção Material e Métodos. A proteína total das células de um terço dos frascos foi extraída 24h após o início do tratamento. Nos frascos restantes, o meio foi substituído por meio sem SRTX S6c e a proteína total foi extraída 3 ou 6h após o final das 24h de tratamento (FIGURA 11). Ao final foi realizado ensaio de *Western blotting*.

3.2) Linhagem B16

Após a semeadura (3×10^6 células/frasco de 75cm^2), as células B16 foram mantidas nas mesmas condições descritas no item 2.1.2 da seção Material e Métodos.

Cinco dias após a semeadura, as células foram tratadas com ET-1 na concentração de 10^{-10}M (Calbiochem, E.U.A.), nas mesmas condições descritas no

item 2.1.2 da seção Material e Métodos. A proteína total das células de um terço dos frascos foi extraída 24h após o início do tratamento. Nos frascos restantes, o meio foi substituído por meio sem ET-1 e a proteína total foi extraída 3 ou 6h após o final das 24h de tratamento (FIGURA 11). Ao final foi realizado ensaio de *Western blotting*.

FIGURA 11. Protocolo experimental. Quantificação da proteína rodopsina.

3.3) Quantificação da proteína rodopsina por *Western blotting*

Após a lise celular com 50µL de tampão de RIPA (*Radio Immuno Precipitation Assay buffer*; 150mM de cloreto de sódio, 1% de Triton X-100, 0,5% de deoxicolato de sódio, 0,1% de SDS, 50mM de Tris-HCl), contendo inibidor de protease (Roche, E.U.A.), a solução foi centrifugada a 14.000 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi removido para um *ependorf* e a concentração de proteínas foi determinada através

do kit BCA (*bicinchoninic acid method*) (Pierce, E.U.A.), de acordo com o protocolo do fabricante. As soluções contendo 60µg de proteína, 10µL de *NuPAGE® LDS Sample Buffer* 4x (Invitrogen, E.U.A.), 1,6µL de *NuPAGE® Sample Reducing Agent* 10x (Invitrogen, E.U.A.) foram completadas com água para 40µL. A proteína foi desnaturada aplicando-se 5% de 2-mercaptoetanol. A câmara interna da cuba de eletroforese foi preenchida com 200mL de tampão de corrida 1x (*NuPAGE® SDS MOPS Running Buffer*, 20x, Invitrogen, E.U.A.), contendo 500 µL de *NuPAGE® Antioxidant* (Invitrogen, E.U.A.). A câmara externa da cuba foi preenchida com 600mL de tampão de corrida 1x (*NuPAGE® SDS MOPS Running Buffer*, 20x, Invitrogen, E.U.A.). 10µL do marcador de peso molecular (*Novex® Sharp Protein Standard*, Invitrogen, E.U.A.) e 40µL de solução de proteína foram aplicados por poço em gel *NuPAGE® 10% Bis-Tris Gel* (1,5mm, 10 poços, Invitrogen, E.U.A.). A eletroforese foi realizada a 200V e 100-125mA por 30 min.

Após a eletroforese, foi realizada a transferência para membranas de PVDF (*Invitrolon™ PVDF/Filter Paper Sandwich*, 0,45µm pore size, Invitrogen, E.U.A.). O tampão de transferência foi preparado a partir de 50mL do *NuPAGE® Transfer Buffer*, 20x (Invitrogen, E.U.A.), 100mL de metanol, completando-se o volume para 1L com água MilliQ. As esponjas do conjunto foram molhadas em 700mL de tampão de transferência. A membrana de PVDF foi molhada em metanol por 30 segundos, lavada em água MilliQ e colocada em tampão de transferência por alguns minutos. O gel foi removido do cassete e posicionado entre dois papéis de filtro, entre esponjas, embebidos em tampão de transferência. O sanduíche foi posicionado na cuba, que teve sua câmara interna preenchida com tampão de transferência. A câmara externa foi preenchida com 650mL de água MilliQ. A transferência foi realizada a 30V e 170mA por 1h.

Os passos descritos a seguir foram realizados utilizando-se o *kit* de detecção

cromogênico *WesternBreeze® Chromogenic Kit–Anti-Rabbit* (Invitrogen, E.U.A.). A membrana foi lavada 2x em 20mL de água por 5 min, sob agitação. Os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados por 1h em 10mL da solução de bloqueio (2mL de *Blocker/Diluent part A* + 3mL *Blocker/Diluent part B* + 5mL de água MilliQ), sob agitação. A membrana foi lavada 2x em 20mL de água por 5 min, sob agitação. A solução de anticorpo primário foi preparada com 2mL de *Blocker/Diluent part A* + 1mL *Blocker/Diluent part B* + 7mL de água MilliQ + anticorpo contra beta-actina (1:1000, *beta actin antibody*, Abcam, E.U.A. ou Cell Signaling, E.U.A.) + anticorpo contra rodopsina (1:50 para GEM-81, 1:100 para B16, *rhodopsin H-100*, Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.). A membrana foi incubada *overnight* na solução de anticorpo primário, a 4°C, sob agitação.

A membrana foi então lavada 4x em 20mL da solução de lavagem (10mL de *Antibody Wash Solution* 16x + 150mL de água MilliQ) por 5 min, sob agitação e 3x em 20mL de água por 2 min, sob agitação. A membrana foi, a seguir, incubada em 10mL da solução de anticorpo secundário por 60 min, sob agitação, lavada 4x em 20mL da solução de lavagem por 5 min, sob agitação e 3x em 20mL de água por 2 min, sob agitação. A membrana foi incubada em 10mL do substrato cromogênico até o aparecimento das bandas roxas (aproximadamente 60 min, sob agitação) e depois lavada 3x em 20mL de água por 2 min. Após secagem sobre superfície plástica, a membrana foi escaneada e a imagem digitalizada foi analisada através do programa Scion Image (Scion Corporation, E.U.A.).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os níveis do RNAm para rodopsina na presença de concentrações crescentes de SRTX S6c e ET-1 nos diferentes períodos de tratamento foram comparados com o controle na ausência de hormônio por *One-way ANOVA*, seguida por teste de Tukey através do programa Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., E.U.A.). A diferença foi considerada significativa quando $P < 0,05$. Os resultados foram transformados, estabelecendo-se como 100% o nível de RNAm de rodopsina no grupo controle.

As respostas de expressão gênica de rodopsina a ET-1 ou SRTX S6c na presença ou na ausência de bloqueadores foram comparadas por *One-Way ANOVA* seguida por teste de Tukey através do programa Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., E.U.A.). A diferença foi considerada significativa quando $P < 0,05$. Os resultados foram transformados, estabelecendo-se como 100% o nível de RNAm de rodopsina no grupo controle.

Os níveis protéicos de rodopsina após o tratamento com SRTX S6c em células GEM-81 ou ET-1 em células B16 foram comparados com o controle na ausência de hormônio por teste *t* de Student através do programa Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., E.U.A.). A diferença foi considerada significativa quando $P < 0,05$. Os resultados foram transformados, estabelecendo-se como 100% o nível protéico de rodopsina no grupo controle.

RESULTADOS

1) Ensaios hormonais: quantificação dos níveis do RNAm para rodopsina

1.1) Linhagem GEM-81

Nos experimentos a seguir, foram utilizadas as seguintes passagens da linhagem GEM-81: P68, P86-88.

O tratamento das células GEM-81 com sarafotoxina S6c pelo período de 6 horas (FIGURA 12) não afetou significativamente os níveis do RNAm para rodopsina (n=3-5 garrafas).

Nas células submetidas ao tratamento com SRTX S6c pelo período de 12 horas (FIGURA 13), observou-se um aumento significativo da transcrição de rodopsina nas concentrações de 10^{-10} e 10^{-9} M, quando comparadas ao grupo controle (n=3-5 garrafas, $P<0,05$ e $P<0,01$, respectivamente). Nas concentrações de 10^{-11} , 10^{-8} e 10^{-7} M, a SRTX S6c não foi capaz de alterar significativamente os níveis do RNAm para rodopsina.

Nas células submetidas ao tratamento com SRTX S6c pelo período de 24 horas (FIGURA 14), observou-se um aumento significativo da transcrição de rodopsina apenas na concentração de 10^{-9} M, quando comparada ao grupo controle (n=3-6 garrafas, $P<0,001$). SRTX S6c nas concentrações mais baixas, 10^{-11} e 10^{-10} M, ou mais altas, 10^{-8} e 10^{-7} M, não promoveu alterações significativas nos níveis do RNAm para rodopsina.

FIGURA 12. PCR quantitativo para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO, tratadas com SRTX S6c em concentrações crescentes (10^{-11} a 10^{-7} M) por 6 horas, mantidas em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=3-5 garrafas).

FIGURA 13. PCR quantitativo para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO tratadas com SRTX S6c em concentrações crescentes (10^{-11} a 10^{-7} M) por 12 horas, mantidas em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=3-5 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,05$. ** Significativamente diferente do Controle, $P < 0,01$.

FIGURA 14. PCR quantitativo para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO, tratadas com SRTX S6c em concentrações crescentes (10^{-11} a 10^{-7} M) por 24 horas, mantidas em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=3-6 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,001$.

1.2) Linhagem B16

O tratamento das células B16 com endotelina-1 pelo período de 6 horas (FIGURA 15) não afetou significativamente os níveis do RNAm para rodopsina (n=3-5 garrafas).

Nas células B16 submetidas ao tratamento com ET-1 nas concentrações de 10^{-11} e 10^{-10} M pelo período de 12 horas (FIGURA 16), observou-se um aumento significativo da transcrição de rodopsina, quando comparadas ao grupo controle (n=6 garrafas, $P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente). Em concentrações mais altas (10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7} M), a ET-1 não foi capaz de promover uma resposta.

Nas células B16 submetidas ao tratamento com ET-1 pelo período de 24 horas (FIGURA 17), observou-se um aumento significativo da transcrição de rodopsina apenas na concentração de 10^{-10} M (n=3-4 garrafas, $P < 0,01$). As concentrações mais altas (10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7} M) não foram capazes de promover uma

resposta. ET-1 na concentração de 10^{-11} M também não afetou significativamente os níveis do RNAm para rodopsina.

Nas células B16 submetidas ao tratamento com ET-1 pelo período de 48 horas (FIGURA 18), observou-se um aumento significativo da transcrição de rodopsina apenas na concentração de 10^{-10} M ($n=3-5$ garrafas, $P<0,01$), semelhante ao observado com 24 horas de tratamento. Novamente, as concentrações mais altas (10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7} M) não foram capazes de promover uma resposta. ET-1 na concentração de 10^{-11} M também não afetou significativamente os níveis do RNAm para rodopsina.

FIGURA 15. PCR quantitativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus* tratados com ET-1 em concentrações crescentes (10^{-11} a 10^{-7} M) por 6 horas, mantidos em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM ($n=3-5$ garrafas).

FIGURA 16. PCR quantitativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus* tratados com ET-1 em concentrações crescentes (10^{-11} a 10^{-7} M) por 12 horas, mantidos em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=6 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P<0,05$. ** Significativamente diferente do Controle, $P<0,001$.

FIGURA 17. PCR quantitativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus* tratados com ET-1 em concentrações crescentes (10^{-11} a 10^{-7} M) por 24 horas, mantidos em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=3-4 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P<0,01$.

FIGURA 18. PCR quantitativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus* tratados com ET-1 em concentrações crescentes (10^{-11} a 10^{-7} M) por 48 horas, mantidos em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=3-5 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,01$.

2) Determinação das vias de sinalização intracelular envolvidas na modulação dos níveis do RNAm para rodopsina

2.1) Linhagem GEM-81

Nos experimentos a seguir, foram utilizadas passagens P48 a P60 da linhagem GEM-81.

A presença do inibidor de PLC (U73122, 3×10^{-6} M, n=4-5 garrafas; FIGURA 19) não bloqueou o aumento da transcrição de rodopsina promovido por SRTX S6c nas células GEM-81. U73122 não apresentou efeito *per se* sobre os níveis do RNAm para rodopsina, quando comparados ao controle.

De maneira similar, o tratamento desta linhagem com um quelante de cálcio (BAPTA-AM, 10^{-5} M, n=5-7 garrafas; FIGURA 20), com um antagonista de calmodulina (R24571, 10^{-6} M, n=5-7 garrafas; FIGURA 21) ou com um inibidor de proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II (Ca^{2+} /CaM quinase II) (KN-93,

$3 \times 10^{-6} \text{M}$, $n=4-7$ garrafas; FIGURA 22) não foi capaz de impedir o aumento dos níveis do RNAm para rodopsina promovido por SRTX S6c. BAPTA-AM, R24571 e KN-93 não apresentaram efeito *per se* sobre os níveis do RNAm para rodopsina, quando comparados aos respectivos controles.

O tratamento com o inibidor de PKC (Ro31-8220, $3 \times 10^{-6} \text{M}$; FIGURA 23) bloqueou significativamente o aumento da transcrição de rodopsina promovido por SRTX S6c ($n=6-8$ garrafas, $P<0,05$). Ro31-8220 não apresentou efeito *per se* sobre os níveis do RNAm para rodopsina, quando comparados ao controle.

O tratamento com o inibidor de cRaf-1 (GW 5074, 10^{-8}M ; FIGURA 24) aboliu significativamente o aumento dos níveis do RNAm para rodopsina promovido por SRTX S6c ($n=3-5$ garrafas, $P<0,01$). A presença de inibidor de MEK (MAP quinase quinase) (PD-98059, $2 \times 10^{-5} \text{M}$; FIGURA 25) e ERK2 (MAP quinase 1) (5-iodotubercidin, $5,3 \times 10^{-7} \text{M}$; FIGURA 26) também bloqueou significativamente o aumento da transcrição de rodopsina promovido por SRTX S6c ($n=4-7$ garrafas, $P<0,05$ e $n=3-6$ garrafas, $P<0,05$, respectivamente). Mais uma vez, os bloqueadores não apresentaram efeito *per se* sobre a expressão gênica de rodopsina, quando comparada à dos respectivos controles.

FIGURA 19. PCR quantitativo para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO, tratadas com SRTX S6c (10^{-9} M) na presença ou ausência de inibidor de PLC (U73122, 3×10^{-6} M) por 24 horas e mantidas em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=4-5 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,001$.

FIGURA 20. PCR quantitativo para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO, tratadas com SRTX S6c (10^{-9} M) na presença ou ausência de quelante de Ca^{2+} (BAPTA-AM, 10^{-5} M) por 24 horas e mantidas em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=5-7 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,05$. ** Significativamente diferente do Controle, $P < 0,001$.

FIGURA 21. PCR quantitativo para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO, tratadas com SRTX S6c (10^{-9} M) na presença ou ausência de antagonista para calmodulina (R24571, 10^{-6} M) por 24 horas e mantidas em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=5-7 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,05$.

FIGURA 22. PCR quantitativo para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO, tratadas com SRTX S6c (10^{-9} M) na presença ou ausência de inibidor de Ca^{2+} /CaM quinase II (KN-93, 3×10^{-6} M) por 24 horas e mantidas em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=4-7 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,05$.

FIGURA 23. PCR quantitativo para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO, tratadas com SRTX S6c (10^{-9} M) na presença ou ausência de inibidor de PKC (Ro31-8220, 3×10^{-6} M) por 24 horas e mantidas em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=6-8 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,05$. $\neq$ Significativamente diferente de SRTX S6c, $P < 0,05$.

FIGURA 24. PCR quantitativo para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO, tratadas com SRTX S6c (10^{-9} M) na presença ou ausência de inibidor de cRaf-1 (GW5074, 10^{-8} M) por 24 horas e mantidas em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=3-5 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,05$. $\neq$ Significativamente diferente de SRTX S6c, $P < 0,01$.

FIGURA 25. PCR quantitativo para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO, tratadas com SRTX S6c (10^{-9} M) na presença ou ausência de inibidor de MEK (MAP quinase quinase) (PD-98059, 2×10^{-5} M) por 24 horas e mantidas em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM ($n=4-7$ garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P<0,05$. ≠ Significativamente diferente de SRTX S6c, $P<0,05$.

FIGURA 26. PCR quantitativo para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO, tratadas com SRTX S6c (10^{-9} M) na presença ou ausência de inibidor de ERK2 (MAP quinase 1) (5-iodotubercidin, $5,3 \times 10^{-7}$ M) por 24 horas e mantidas em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=3-6 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,05$. $\neq$ Significativamente diferente de SRTX S6c, $P < 0,05$.

2.2) Linhagem B16

O tratamento com o inibidor de PLC (U73122, 3×10^{-6} M; FIGURA 27) impediu significativamente o aumento da transcrição do RNAm para rodopsina promovido por ET-1 nas células B16 (n=5-6 garrafas, $P < 0,001$). U73122 não apresentou efeito *per se* sobre os níveis do RNAm para rodopsina, quando comparados ao controle.

O tratamento desta linhagem com um quelante de cálcio (BAPTA-AM, 10^{-5} M, n=4-7 garrafas, $P < 0,05$; FIGURA 28), com um antagonista para calmodulina (R24571, 10^{-6} M, n=5-7 garrafas, $P < 0,001$; FIGURA 29) ou com um inibidor de Ca^{2+} /CaM quinase II (KN-93, 3×10^{-6} M, n=4-9 garrafas, $P < 0,001$; FIGURA 30) também bloqueou significativamente o aumento dos níveis do RNAm para rodopsina promovido pela ET-1. BAPTA-AM, R24571 e KN-93 não apresentaram efeito *per se* sobre a

expressão gênica de rodopsina, quando comparada aos respectivos controles.

A presença do inibidor de PKC (Ro31-8220, 3×10^{-6} M; FIGURA 31) bloqueou significativamente o aumento dos níveis do RNAm para rodopsina promovidos por ET-1 (n=4-8 garrafas, $P < 0,001$). Ro31-8220 não apresentou efeito *per se* sobre os níveis do RNAm para rodopsina, quando comparados ao controle.

O tratamento das células B16 com inibidor de cRaf-1 (GW 5074, 10^{-8} M, n=4-8 garrafas; FIGURA 32) não foi capaz de abolir o aumento dos níveis do RNAm para rodopsina promovidos por ET-1. GW5074 não apresentou efeito *per se* sobre os níveis do RNAm para rodopsina, quando comparados ao controle. Da mesma maneira, a presença de inibidor de MEK (MAP quinase quinase) (PD-98059, 2×10^{-5} M, n=5-6 garrafas; FIGURA 33) ou inibidor de ERK2 (MAP quinase 1) (5-iodotubercidin, $5,3 \times 10^{-7}$ M, n=5-7 garrafas; FIGURA 34) não foi capaz de abolir o aumento dos níveis do RNAm para rodopsina promovidos por ET-1. PD-98059 e 5-iodotubercidin não apresentaram efeito *per se* sobre os níveis do RNAm para rodopsina.

FIGURA 27. PCR quantitativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus*, tratados com ET-1 (10^{-10} M) na presença ou ausência de inibidor de PLC (U73122, 3×10^{-6} M) por 24 horas e mantidos em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=5-6 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,05$. $\neq$ Significativamente diferente de ET-1, $P < 0,001$.

FIGURA 28. PCR quantitativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus*, tratados com ET-1 (10^{-10} M) na presença ou ausência de quelante de Ca^{2+} (BAPTA-AM, 10^{-5} M) por 24 horas e mantidos em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=4-7 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,01$. $\neq$ Significativamente diferente de ET-1, $P < 0,05$.

FIGURA 29. PCR quantitativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus*, tratados com ET-1 (10^{-10} M) na presença ou ausência de antagonista para calmodulina (R24571, 10^{-6} M) por 24 horas e mantidos em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=5-7 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,001$. $\neq$ Significativamente diferente de ET-1, $P < 0,001$.

FIGURA 30. PCR quantitativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus*, tratados com ET-1 (10^{-10} M) na presença ou ausência de inibidor de Ca^{2+} /CaM quinase II (KN-93, 3×10^{-6} M) por 24 horas e mantidos em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=4-9 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,01$. $\neq$ Significativamente diferente de ET-1, $P < 0,001$.

FIGURA 31. PCR quantitativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus*, tratados com ET-1 (10^{-10} M) na presença ou ausência de inibidor de PKC (Ro31-8220, 3×10^{-6} M) por 24 horas e mantidos em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=4-8 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,01$. ≠ Significativamente diferente de ET-1, $P < 0,001$.

FIGURA 32. PCR quantitativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus*, tratados com ET-1 (10^{-10} M) na presença ou ausência de inibidor de cRaf-1 (GW5074, 10^{-8} M) por 24 horas e mantidos em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=4-8 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,05$.

FIGURA 33. PCR quantitativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus*, tratados com ET-1 (10^{-10} M) na presença ou ausência de inibidor de MEK (MAP quinase quinase) (PD-98059, 2×10^{-5} M) por 24 horas e mantidos em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=5-6 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,05$.

FIGURA 34. PCR quantitativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus*, tratados com ET-1 (10^{-10} M) na presença ou ausência de inibidor de ERK2 (MAP quinase 1) (5-iodotubercidin, $5,3 \times 10^{-7}$ M) por 24 horas e mantidos em escuro constante. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=5-7 garrafas). * Significativamente diferente do Controle, $P < 0,05$.

3) Quantificação da proteína rodopsina

3.1) Linhagem GEM-81

Nos experimentos a seguir, foi utilizada a passagem P69 da linhagem GEM-81.

Não foram observadas mudanças significativas dos níveis protéicos de rodopsina nas células GEM-81 ao final do tratamento de 24 horas com SRTX S6c na concentração de 10^{-9} M (FIGURA 35 e FIGURA 36), apesar da observação de que o mesmo tratamento é capaz de promover um aumento significativo do RNAm para essa proteína (FIGURA 14).

Da mesma maneira, não foram observadas mudanças significativas dos níveis protéicos de rodopsina nas células GEM-81 3 ou 6 horas após o fim do tratamento de 24h com SRTX S6c (FIGURA 35 e FIGURA 36).

FIGURA 35. *Western blotting* representativo para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO, controle e tratadas com SRTX S6c (10^{-9} M) por 24 horas, mantidas em escuro constante. A proteína total das células foi extraída ao final das 24h de tratamento, assim como 3 e 6h após o fim do tratamento. Linha 1, marcador de peso molecular *Novex® Sharp Protein Standard* (Invitrogen, E.U.A.); linha 2, controle 0h; linha 3, células tratadas com SRTX S6c, proteína extraída ao final das 24h de tratamento; linha 4, controle 3h; linha 5, células tratadas com SRTX S6c, proteína extraída 3h após o fim das 24h de tratamento; linha 6, controle 6h; linha 7, células tratadas com SRTX S6c, proteína extraída 6h após o fim das 24h de tratamento.

FIGURA 36. Histograma do *Western blotting* para rodopsina em células de eritroforoma GEM-81 de *Carassius auratus*, diferenciadas por DMSO, controle e tratadas com SRTX S6c (10^{-9} M) por 24 horas, mantidas em escuro constante. A proteína total das células foi extraída ao final das 24h de tratamento, assim como 3 e 6h após o fim do tratamento. Valores são as médias $\pm$ EPM (n=3-4 garrafas).

3.2) Linhagem B16

Não foram observadas mudanças significativas dos níveis protéicos de rodopsina nas células B16 ao final do tratamento de 24 horas com ET-1 na concentração de 10^{-10} M (FIGURA 37 e FIGURA 38), apesar da observação de que o mesmo tratamento é capaz de promover um aumento significativo do RNAm para essa proteína (FIGURA 17).

Nas células B16 extraídas 3 horas após o tratamento de 24h com ET-1, foi observada uma redução significativa dos níveis protéicos de rodopsina, quando comparado ao respectivo controle (n=3 garrafas, $P < 0,01$). Não foram observadas mudanças significativas dos níveis protéicos de rodopsina nas células B16 6 horas após o fim do tratamento de 24h com ET-1 (FIGURA 37 e FIGURA 38).

FIGURA 37. *Western blotting* representativo para rodopsina em melanócitos B16 de *Mus musculus*, controle e tratados com ET-1 (10^{-10} M) por 24 horas, mantidos em escuro constante. A proteína total das células foi extraída ao final das 24h de tratamento, assim como 3 e 6h após o fim do tratamento. Linha 1, marcador de peso molecular *Novex® Sharp Protein Standard* (Invitrogen, E.U.A.); linha 2, controle 0h; linha 3, células tratadas com ET-1, proteína total extraída ao final das 24h de tratamento; linha 4, controle 3h; linha 5, células tratadas com ET-1, proteína total extraída 3h após o fim das 24h de tratamento; linha 6, controle 6h; linha 7, células tratadas com ET-1, proteína total extraída 6h após o fim das 24h de tratamento.

FIGURA 38. Histograma do *Western blotting* para rodopsina melanócitos B16 de *Mus musculus*, controle e tratados com ET-1 (10^{-10} M) por 24 horas, mantidos em escuro constante. A proteína total das células foi extraída ao final das 24h de tratamento, assim como 3 e 6h após o fim do tratamento. Valores são as médias $\pm$ EPM ($n=3$ garrafas). * Significativamente diferente do respectivo Controle, $P<0,01$.

DISCUSSÃO

1) Modulação dos níveis do RNAm para rodopsina em células GEM-81 e B16

Endotelinas e sarafotoxinas constituem uma família homogênea de isopeptídeos (KLOOG *et al.*, 1988; KLOOG & SOKOLOVSKY, 1989) que, além de sua função vasoconstritora, atuam sobre células pigmentares, modulando a migração e/ou produção de pigmentos e sua proliferação.

Em peixes, acredita-se que as células endoteliais dos capilares sangüíneos existentes próximos aos cromatóforos sejam responsáveis pela síntese e liberação de endotelinas (MURATA & FUJII, 2000), que atuam como um fator de ação parácrina. Em mamíferos, os melanócitos produzem melanina e a transferem para os queratinócitos vizinhos que, por sua vez, produzem fatores de ação parácrina, tal como a ET-1, que pode então modular o funcionamento dos melanócitos.

O presente trabalho demonstrou que SRTX S6c e ET-1 modulam os níveis do RNAm para rodopsina nas linhagens de células pigmentares GEM-81 de *Carassius auratus* e B16 de *Mus musculus*, respectivamente, de maneira dose-dependente. Dependendo da dose utilizada e do período de tratamento, SRTX S6c e ET-1 promoveram um aumento da expressão gênica de rodopsina. De maneira similar, em corações murinos intactos, (PIUHOLA *et al.*, 2007), cardiomiócitos (CHENG *et al.*, 2005) células endoteliais aórticas (SUGIYAMA *et al.*, 2004), células musculares lisas A-10, aortas intactas de ratos adultos (WOLF *et al.*, 2006), células da musculatura lisa vascular (RODRIGUEZ-VITA *et al.*, 2005), células esteladas hepáticas (HSCs) de primeira passagem (KODA *et al.*, 2006) e fibroblastos Rat-1 (MULDOON *et al.*, 1989), ET-1 regula positivamente a transcrição de diversos

genes.

ET-1 estimula a transcrição do RNAm para receptores de melanocortina do tipo 1 (MCR1) em melanócitos humanos normais, de maneira dose-dependente (SCOTT *et al.*, 2002). ET-1 na concentração de 10 nM induz um aumento na atividade e nos níveis do RNAm para a enzima tirosinase em melanócitos humanos em cultura (IMOKAWA *et al.*, 1995), enzima-chave envolvida na síntese de melanina.

O tratamento das células GEM-81 com SRTX S6c e das células B16 com ET-1 por 6 horas (FIGURA 12 e FIGURA 15) não afetou significativamente os níveis do RNAm para rodopsina, indicando que esse período de tratamento não é suficiente para promover alterações na expressão gênica desse fotopigmento.

Nas células GEM-81 submetidas ao tratamento com SRTX S6c pelo período de 12 horas (FIGURA 13), observou-se um aumento significativo da transcrição de rodopsina nas concentrações de 10^{-10} e 10^{-9}M , o que não foi observado na concentração de 10^{-11}M . As concentrações mais altas 10^{-8} e 10^{-7}M também não promoveram uma resposta significativa, indicando uma dessensibilização por dose.

Nas células GEM-81 submetidas ao tratamento com SRTX S6c pelo período de 24 horas (FIGURA 14), observou-se um aumento significativo da transcrição de rodopsina apenas na concentração de 10^{-9}M . SRTX S6c nas concentrações mais baixas 10^{-11} e 10^{-10}M , assim como as concentrações mais altas 10^{-8} e 10^{-7} não foram capazes de promover uma resposta significativa, indicando uma dessensibilização temporal (na concentração de 10^{-10}M) e por dose (nas concentrações mais altas).

Em melanóforos de *Brachydanio rerio*, ET-1 promove a agregação pigmentar, sendo este efeito dose-dependente, observando-se dessensibilização do sistema em concentrações superiores a 10^{-6}M (FUJII *et al.*, 1993; HAYASHI *et al.*, 1996). Em melanóforos de *Zacco temminckii*, SRTX S6c e ET-1 também promovem agregação pigmentar de maneira dose-dependente, sendo que a dessensibilização do sistema

ocorre em concentrações acima de 10^{-7} M para ambos os peptídeos (HAYASHI *et al.*, 1996). Em *Oryzias latipes*, a dispersão pigmentar em leucóforos (FUJITA & FUJII, 1996), assim como a agregação pigmentar em xantóforos (MURATA & FUJII, 2000), promovidas por ET-1, são dose-dependentes, sendo as respostas máximas obtidas nas concentrações de 10^{-6} M e 10^{-8} M, respectivamente. Em melanóforos de *Synbranchus marmoratus*, as ETs induzem agregação pigmentar, sendo que esses peptídeos evocam auto-dessensibilização temporal e dose-dependente (RAMANZINI *et al.*, 2006).

A dessensibilização através da internalização dos receptores ET_B, que são expressos na linhagem GEM-81, é agonista-dependente, sendo que esse processo depende da atividade de quinases de receptores acoplados à proteína G (GRKs), em especial a GRK2 (FREEDMAN *et al.*, 1997), arrestina, dinamina e clatrina (PIERCE *et al.*, 2002). Após a internalização, o receptor ET_B é transportado para endossomos primários, seguindo então para lisossomos para sua degradação (BREMNES *et al.*, 2000; OKSCHE *et al.*, 2000). Esse processo pode ser responsável pela dessensibilização temporal e dose-dependente verificada nessa linhagem.

ET-1 apresenta efeito bifásico sobre a atividade da tirosinase em melanócitos humanos, estimulando-a em concentrações subnanomolares e inibindo-a em concentrações superiores a 1 nM (TADA *et al.*, 1998).

Nas células B16 submetidas ao tratamento com ET-1 nas concentrações 10^{-11} e 10^{-10} M pelo período de 12 horas (FIGURA 16), observou-se um aumento significativo da transcrição de rodopsina. Contudo, em concentrações mais altas (10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7} M), a ET-1 não foi capaz de promover uma resposta, sugerindo uma dessensibilização por dose e indicando que os efeitos da ET-1 sobre a expressão gênica de rodopsina são dose-dependentes.

Nas células B16 submetidas ao tratamento com ET-1 pelo período de 24

horas (FIGURA 17), observou-se um aumento significativo da transcrição de rodopsina apenas na concentração de 10^{-10} M ($n=3-4$, $P<0,01$). As concentrações mais altas (10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7} M) não foram capazes de promover uma resposta, sugerindo uma dessensibilização por dose. ET-1 na concentração de 10^{-11} M também não afetou significativamente os níveis do RNAm para rodopsina, indicando uma dessensibilização temporal em doses mais baixas.

Nas células B16 submetidas ao tratamento com ET-1 pelo período de 48 horas (FIGURA 18), observou-se um aumento significativo da transcrição de rodopsina apenas na concentração de 10^{-10} M ($n=3-5$, $P<0,01$), semelhante ao observado com 24 horas de tratamento. Novamente, as concentrações mais altas, 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-7} M, e a mais baixa, 10^{-11} M, não foram capazes de promover uma resposta.

O processo de dessensibilização de receptores do tipo ET_A , receptores estes expressos nas células B16, dá-se através de sua internalização, seguida por transporte para endossomos primários e reciclagem através do compartimento de reciclagem pericentriolar (BREMNES *et al.*, 2000). A presença de um agonista no sistema, que no caso é representado por ET-1, pode promover uma rápida internalização e reciclagem dos receptores ET_A expressos pela linhagem B16. Ao serem reciclados, os receptores ET_A são novamente internalizados devido à presença do agonista, promovendo a dessensibilização do sistema. Esse processo pode ser responsável pela dessensibilização tanto dose-dependente, como temporal, encontrada na linhagem B16.

Os resultados obtidos confirmam a ação das ETs/SRTXs sobre células pigmentares, ação essa que, nas linhagens estudadas, ocorre através da ligação destes agonistas aos receptores dos subtipos ET_B (GEM-81) e ET_A (B16). O efeito destes peptídeos sobre a expressão gênica de rodopsina ocorre de maneira dose-

dependente, sendo que há evidências da ocorrência de dessensibilização temporal e por dose no sistema.

Conforme já discutido, a regulação da expressão gênica de rodopsina parece ter sido conservada ao longo da evolução, sendo muito semelhante ao comparar-se peixes teleósteos e mamíferos. Em peixes teleósteos e mamíferos, a região promotora proximal da rodopsina apresenta locais de acoplamento para fatores de transcrição, como o NRE (REHEMTULLA *et al.*, 1996). O NRE atua como local de acoplamento para a proteína NRL (REHEMTULLA *et al.*, 1996). O fator de transcrição NRL apresenta grande homologia de seqüência com o produto do oncogene *v-maf* que, por sua vez, contém um motivo *zipper* de leucina semelhante àquele encontrado em outras proteínas de ligação ao DNA, como os produtos dos oncogenes *fos*, *jun* e *myc* (NISHIZAWA *et al.*, 1989). NRL pode formar homo e heterodímeros com vários membros da família c-Fos e c-Jun (KATAOKA *et al.*, 1994; KERPPOLA *et al.*, 1994). NRE é um elemento AP-1, capaz de ligar heterodímeros de c-Fos e c-Jun.

Nas linhagens GEM-81 e B16, a SRTX S6c e a ET-1, respectivamente, promoveram uma regulação positiva da expressão de rodopsina. A ligação desses agonistas a seus receptores (ET_B em GEM-81 e ET_A em B16) poderia ativar as vias de sinalização de PLC e PKC, além da própria via das MAPKs (através da fosforilação de Raf-1 por PKC), vias essas reconhecidamente envolvidas na sinalização por sarafotoxinas e endotelinas em células pigmentares.

A ativação dessas vias de sinalização poderia mobilizar fatores de transcrição, como c-Fos, c-Jun e c-Myc, além do próprio NRL. Esses fatores de transcrição, já ativados, poderiam ligar-se ao NRE presente na região promotora proximal da rodopsina, interagindo então com CRX e ativando o promotor da rodopsina.

É interessante mencionar que, embora o sistema ET/receptor seja

evolutivamente mais recente no controle da pressão intravascular, nossos resultados apresentam evidências preliminares de que esse sistema é, de fato, primitivo em sua função na regulação da pigmentação dos vertebrados.

2) Vias de sinalização intracelular envolvidas na modulação dos níveis do RNAm para rodopsina em células GEM-81 e B16

2.1) Via da PLC, PKC, Ca^{2+} e Ca^{2+} /CaM quinase

Os receptores para ETs são capazes de ativar diversas vias de sinalização intracelular, tais como da PLC (SOKOLOVSKY, 1993), da PLD (AMBAR & SOKOLOVSKY, 1993), da PLA_2 (ARAMORI & NAKANISHI, 1992) e de MAPKs (KASUYA *et al.*, 1994), podem promover aumento nos níveis de Ca^{2+} citosólico (KOIZUMI *et al.*, 1994), de produção de AMP_c (SOKOLOVSKY *et al.*, 1994) e GMP_c (SHRAGA-LEVINE *et al.*, 1994; SHRAGA-LEVINE & SOKOLOVSKY, 1996).

Em peixes teleósteos, há indícios de que a agregação pigmentar promovida por ETs envolva a produção de IP_3 , através da ativação da PLC, elevação da concentração intracelular de Ca^{2+} e da ativação de PKC (FUJII *et al.*, 1993; HAYASHI *et al.*, 1996; MURATA & FUJII, 2000). Contudo, nas células GEM-81, o tratamento com inibidor de PLC (U73122; FIGURA 19) ou com um quelante de cálcio (BAPTA-AM; FIGURA 20) não foi capaz de alterar o aumento da transcrição de rodopsina promovido por SRTX S6c. Estes resultados indicam que a modulação da expressão gênica de rodopsina nesta linhagem parece não envolver a ativação de PLC ou cálcio como mensageiro intracelular.

Na linhagem GEM-81, a presença de um antagonista para calmodulina (R24571; FIGURA 21) ou de Ca^{2+} /CaM quinase II (KN-93; FIGURA 22) também não foi capaz de impedir o aumento dos níveis do RNAm para rodopsina promovido por

SRTX S6c. Por outro lado, o tratamento com o inibidor de PKC (Ro31-8220; FIGURA 23) impediu significativamente o aumento da transcrição de rodopsina promovido por SRTX S6c.

A ineficácia de um antagonista para calmodulina ou de um inibidor de Ca^{2+} /CaM quinase II em bloquear o efeito da SRTX S6c sobre a expressão de rodopsina nestas células era esperado, pois a calmodulina é uma proteína de ligação ao Ca^{2+} , e os resultados obtidos com a utilização de BAPTA-AM indicam que o cálcio não participa da sinalização evocada por SRTX S6c. A calmodulina atua como transdutora do sinal de Ca^{2+} citosólico, passando para seu estado ativado quando ligada a ele. O complexo Ca^{2+} /calmodulina, por sua vez, pode ativar a quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina.

Há nove genes para PKC, que codificam para isoenzimas classificadas em três grupos: PKCs clássicas ou convencionais (PKC alfa (α), PKC beta I (β I), PKC beta II (β II) e PKC gama (γ)), que são dependentes de cálcio e ativadas por fosfatidilserina e diacilglicerol; novas PKCs (PKC delta (δ), epsilon (ϵ), eta (η), mi (μ) e teta (θ)), que são independentes de cálcio e ativadas por fosfatidilserina e diacilglicerol; PKCs atípicas (PKC lambda (λ), iota (ι) e zeta (ζ)), que são independentes de cálcio e não necessitam de diacilglicerol para sua ativação, embora fosfatidilserina possa modular sua atividade (MACKAY & TWELVES, 2007).

Nas células GEM-81, nas quais aparentemente não ocorre o envolvimento do íon cálcio na modulação dos níveis do RNAm para rodopsina por SRTX S6c, é possível que a isoforma de PKC efetivamente bloqueada por Ro31-8220 seja independente de cálcio, ou que conversas cruzadas com outras vias de sinalização levem à ativação da PKC. De fato, a linhagem GEM-81 expressa RNAm para PKC β I, PKC λ e PKC ι (ISOLDI *et al.*, 2003), sendo que as duas últimas são PKCs atípicas.

Células PC12 de feocromocitoma de ratos expressam PKC ζ , uma PKC

atípica, cuja atividade é modulada por PKA (HUANG *et al.*, 2001). Nesta linhagem celular, as vias de sinalização por PKA e PKC estão envolvidas na modulação dos níveis do RNAm para feniletanolamina *N*-metiltransferase, a enzima final na via biossintética das catecolaminas, que converte norepinefrina em epinefrina, sendo que a estimulação de PKC requer indução prévia da via da PKA (TAI & WONG, 2003), mas é independente de cálcio e diacilglicerol.

Em experimentos utilizando duas linhagens de fibroblastos obtidos a partir do pulmão de hamster chinês (CCL39), cada uma expressando um subtipo do receptor para endotelina humano, ET_A ou ET_B, demonstrou-se que SRTX S6c promoveu aumento no acoplamento de G_{i3}α ao ET_B. SRTX S6c também induziu um aumento muito maior no acoplamento de G_qα/G₁₁α ao ET_A do que ao ET_B (SHRAGA-LEVINE & SOKOLOVSKY, 2000). Desta forma, a presença do agonista SRTX S6c no sistema poderia modificar o acoplamento dos receptores ET_B expressos em GEM-81 às proteínas G, favorecendo a via de sinalização intracelular iniciada por G_{i3}α, por exemplo, em detrimento à via iniciada por ativação de G_qα/G₁₁α. Isso poderia explicar a ausência de efeito ao utilizar-se o inibidor de PLC ou o quelante de cálcio.

Já na linhagem B16, o tratamento com o inibidor de PLC (U73122; FIGURA 27), com um quelante de cálcio (BAPTA-AM; FIGURA 28), com um antagonista para calmodulina (R24571; FIGURA 29) ou com um inibidor de Ca²⁺/CaM quinase II (KN-93; FIGURA 30) impediu significativamente o aumento dos níveis do RNAm para rodopsina promovido pela ET-1. A presença do inibidor de PKC (Ro31-8220; FIGURA 31) também bloqueou significativamente o aumento dos níveis do RNAm para rodopsina promovidos por ET-1. Os resultados indicam o envolvimento da via de sinalização por PLC, PKC, calmodulina, Ca²⁺/CaM quinase, sendo que o cálcio atua como mensageiro intracelular.

Sabe-se que em melanócitos humanos em cultura, ET-1 promove a

proliferação celular e melanogênese, sendo que este efeito envolve a ativação de PLC (KANG *et al.*, 1998; IMOKAWA *et al.*, 2000) e aumento dos níveis intracelulares de IP₃ (YADA *et al.*, 1991; KOBAYASHI *et al.*, 2002) e Ca²⁺ (YADA *et al.*, 1991; IMOKAWA *et al.*, 1997; KANG *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 2002) e ativação de PKC (IMOKAWA *et al.*, 1996; 1997; 2000). Em fibroblastos 3T3, fibroblastos Rat-1 e células musculares lisas A10, ET-1 também atua como agente mitogênico, através da produção de IP₃, aumento dos níveis de cálcio intracelular e ativação de PKC (TAKUWA *et al.*, 1989; MULDOON *et al.*, 1989).

Em células ovarianas de hamster chinês (CHOs), os receptores para ETs do tipo ET_A encontram-se funcionalmente acoplados a proteínas G_q e G_s. Nesta linhagem celular, a ligação do agonista aos receptores ET_A estimula a proteína G_q que, por sua vez, ativa a PLC (ARAMORI & NAKANISHI, 1992), resultando na produção de IP₃, que se liga ao receptor para IP₃ no retículo endoplasmático, promovendo a liberação de cálcio para o citosol (KAWANABE *et al.*, 2002).

Em cardiomiócitos, foi demonstrada a presença de receptores do tipo ET_A e ET_B (HORI *et al.*, 1992). Em cardiomiócitos ventriculares de coelho, a resposta contrátil promovida por exposição aguda à ET-1 é mediada por receptores ET_A, promovendo a ativação da PLC (KELSO *et al.*, 2000).

Mitógenos que estimulam a hidrólise de fosfoinositídeos e ativam a PKC, induzem a expressão de protooncogenes celulares, incluindo *c-fos* e *c-myc* (KELLY *et al.*, 1983; KAIBUCHI *et al.*, 1986; PALUMBO *et al.*, 1986). Em fibroblastos 3T3, ET-1 induz a expressão de ambos os genes, que então estimulam a síntese de DNA (TAKUWA *et al.*, 1989).

Conforme já mencionado, ET-1 induz a transcrição de RNAm para c-Fos e c-Jun e aumenta a atividade transcricional conferida por elemento AP-1 em células mesangiais, obtidas a partir de explantes glomerulares de ratos, atuando como

elemento mitogênico (SIMONSON *et al.*, 1992). O efeito mitogênico promovido por ET-1 nestas células dá-se através de receptores para endotelinas do tipo ET_A, que sinalizam através de PKC (SIMONSON & HERMAN, 1993). Sabe-se que a ativação de AP-1 está envolvida na regulação de uma grande variedade de processos celulares, tais como proliferação, diferenciação e transformação (ANGEL *et al.*, 1987; BOHMANN *et al.*, 1987; LEE *et al.*, 1987; CHIU *et al.*, 1988; SASSONE-CORSI *et al.*, 1988).

Os resultados do presente trabalho indicam que a ligação de ET-1 aos receptores ET_A presentes nos melanócitos B16 leva à ativação de uma proteína G_q que, por sua vez, ativa a PLC. A PLC ativada cliva o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato em IP₃ e diacilglicerol (DAG). O IP₃ liga-se a canais de Ca²⁺ regulados por IP₃ presentes no retículo endoplasmático, que então permitem a passagem do Ca²⁺ estocado no retículo para o citosol. O Ca²⁺ liberado do retículo poderia então se ligar à proteína calmodulina, que atua como transdutora do sinal citosólico de Ca²⁺, sendo que o complexo Ca²⁺/calmodulina possui a capacidade de ligar-se a proteínas-alvo, tal como a quinase dependente de Ca²⁺/calmodulina. O aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular induzido por IP₃ faz com que a PKC se desloque do citosol para a face citoplasmática da membrana celular, onde é ativada por DAG.

Portanto, a ativação da PLC, a liberação de Ca²⁺ como mensageiro intracelular, sua ligação à proteína calmodulina e conseqüente ativação da Ca²⁺/CaM quinase II, assim como a ativação de PKC, poderia culminar com a promoção da transcrição e mobilização de fatores de transcrição, como c-Fos, c-Jun e c-Myc, além de NRL, fator que preferencialmente transativa o NRE (Kumar *et al.*, 1996). Esses fatores de transcrição já ativados poderiam ligar-se ao NRE presente na região promotora proximal do gene da rodopsina, interagindo com CRX, ativando seu promotor e, conseqüentemente, promovendo a transcrição do RNAm para rodopsina nos

melanócitos B16.

2.2) Via das MAPKs

O tratamento das células GEM-81 com o inibidor de cRaf-1 (GW 5074; FIGURA 24) impediu significativamente o aumento dos níveis do RNAm para rodopsina promovido por SRTX S6c, assim como a presença de inibidor de MEK (MAP quinase quinase) (PD-98059; FIGURA 25) e ERK2 (MAP quinase 1) (5-iodotubercidin; FIGURA 26).

A via de sinalização da MAPK está envolvida na proliferação, diferenciação e morte celular (STORK & SCHMITT, 2002; SUGDEN, 2003). Componentes desta via são fosforilados e ativados em resposta a diversos estímulos, promovendo a expressão gênica (KOLCH, 2000; SUDGEN, 2003). ET-1, via receptores ET_A e ET_B, ativa a via da MAPK através da fosforilação de ERK1/2 em diversos tipos celulares, tais como miócitos cardíacos, fibroblastos e astrócitos (NAICKER & BHOOLA, 2001; PETERS *et al.*, 2003; SUGDEN, 2003).

ET-1 está envolvida no processo de hipertrofia cardíaca, promovendo um aumento do tamanho celular e da síntese protéica (CHIEN *et al.*, 1991), efeito este mediado pela ativação de Raf-1, MEK e ERK (YAMAZAKI *et al.*, 1996; CHENG *et al.*, 2005; CHUNG & WALKER, 2007). Em células da musculatura lisa vascular de camundongos, ET-1 também ativa a via de sinalização intracelular das MAPKs, induzindo a fosforilação de MAPK através de uma via independente da tirosina-quinase c-Src, porém dependente de Ras-Raf (YOGI *et al.*, 2007).

ET-1 induz a expressão de colágeno do tipo I em miofibroblastos cardíacos (KATWA, 2003). Colágenos são proteínas estruturais associadas à remodelação fisiológica e patofisiológica de tecidos que sofreram injúria. Em miofibroblastos isolados a partir de infarto do miocárdio de ratos, foi verificada a participação das

vias de sinalização intracelular da PKC δ e ERK1/2 na indução da expressão de colágeno do tipo I (CHINTALGATTU & KATWA, 2004).

A via de sinalização das MAPKs também está envolvida na hiperalgesia (aumento da resposta a estímulos dolorosos) promovida por ET-1 em ratos. Este efeito envolve, além da via das MAPKs, PLC e PKC (MOTTA *et al.*, 2006).

Em células de coriocarcinoma humano, ET-1 e ET-3 promovem a expressão de *c-fos* e *c-jun* através do receptor ET_B, ativação de G_q e G_i, culminando com a ativação de ERK1/2 (também conhecidas como MAPK p42 e MAPK p44) (RAUH *et al.*, 2008). Em adipócitos 3T3-L1, a estimulação da transcrição do transportador de glicose Glut-1 por ET-1 também envolve a ativação das MAPKs p42 e p44, assim como a PKC ϵ (KAO & FONG, 2008).

Diferentemente do que ocorre com a linhagem GEM-81, o tratamento da linhagem B16 com o inibidor de cRaf-1 (GW 5074; FIGURA 32), com o inibidor de MEK (MAP quinase quinase) (PD-98059; FIGURA 33) ou com inibidor de ERK2 (MAP quinase 1; FIGURA 34) não foi capaz de impedir o aumento dos níveis do RNAm para rodopsina promovido por ET-1 nesta linhagem. Apesar de evidências do envolvimento da via das MAPKs nos efeitos mitogênico e melanogênico das ETs sobre os melanócitos (IMOKAWA *et al.*, 1996; 2000), a promoção da expressão gênica de rodopsina por ET-1 em melanócitos B16, através da ligação deste agonista a receptores ET_A, parece não envolver esta via de sinalização intracelular.

A atividade mitogênica mediada por ET_A dá-se predominantemente através da via da PKC e da PI3K (fosfoinositídeo 3-quinase) (MASAKI *et al.*, 1991; BISOTTO & FIXMAN, 2001; SHI-WEN *et al.*, 2004), vias estas que ativam MAPK. Os resultados obtidos com a linhagem B16 indicam que a ligação da ET-1 aos receptores ET_A, com conseqüente modulação dos níveis do RNAm para rodopsina, envolve a via da PKC, mas não a ativação da via das MAPKs.

Já ativação de ET_B parece utilizar preferivelmente a via da PKC (KOLCH, 2000; NAICKER & BHOOLA, 2001; ROBIN *et al.*, 2004; SUGDEN, 2003). Contudo, na linhagem GEM-81, o aumento dos níveis do RNAm para rodopsina, através da ligação da SRTX S6c aos receptores ET_B, parece envolver a via de sinalização por MAPKs, além de uma isoforma de PKC.

Na linhagem GEM-81, a ativação de uma isoforma de PKC independente de cálcio e diacilglicerol, que pode estar fosforilando diretamente c-Raf, leva à fosforilação de MEK e, conseqüentemente de ERK, culminando com a transcrição e mobilização de fatores de transcrição, como c-Fos, c-Jun e c-Myc, além de um fator de transcrição semelhante ao NRL dos mamíferos. Esses fatores de transcrição já ativados poderiam ligar-se ao NRE presente na região promotora proximal do gene da rodopsina, interagindo com CRX, ativando seu promotor e, conseqüentemente, promovendo a transcrição do RNAm para rodopsina.

3) Modulação dos níveis protéicos de rodopsina em células GEM-81 e B16

Em eucariotos, a transcrição é apenas uma das muitas etapas reguláveis que compreendem o processo de expressão gênica. Todos os aspectos relacionados à vida de um transcrito, desde o *splicing* até a poliadenilação, passando pela exportação do RNAm até a tradução, estão sujeitos a mecanismos elaborados de controle (GARNEAU *et al.*, 2007).

Nas células eucarióticas, as moléculas de RNAm são inicialmente sintetizadas no núcleo como pré-RNA mensageiros, que estão sujeitos a *capping* da extremidade 5' com 7-metilguanilato, *splicing*, quebra da extremidade 3' e poliadenilação da extremidade 3' (MOORE, 2005). O fator eucariótico de iniciação de tradução 4E (eIF4E) liga-se ao *capping* da extremidade 5' (ALBERTS *et al.*, 2004b), entregando

os RNAs mensageiros para o complexo de iniciação de tradução eIF4F. A formação do complexo eIF4F é limitante para o início da tradução e depende em grande parte da disponibilidade de eIF4E (GRAFF *et al.*, 2008).

A cauda poli(A) da extremidade 3' facilita a tradução do RNAm e sua interação com a proteína de ligação a poli(A) (BERNSTEIN *et al.*, 1989) protege o RNAm contra o ataque de ribonucleases. Desta forma, a cauda poli(A) tem papel importante no processamento nuclear do RNAm, exportação para o citoplasma e estabilidade citoplasmática do RNAm (GUHANIYOGI & BREWER, 2001).

Durante a transcrição gênica, os RNAs mensageiros são ligados por proteínas de ligação do RNA (*RNA binding proteins* – RBPs). RBPs podem afetar a estabilidade dos transcritos, ativar ou reprimir sua tradução ou recrutar os transcritos para os ribossomos ou corpos de processamento no citoplasma (KEENE & TENENBAUM, 2002).

Entre 40 e 50% das mudanças observadas na expressão gênica em resposta a sinais celulares parecem ocorrer no nível da estabilidade do RNAm (FAN *et al.*, 2002; CHEADLE *et al.*, 2005). Essas mudanças são geralmente induzidas por alterações na composição das ribonucleoproteínas mensageiras (complexo que compreende o RNAm e RBPs a ele associadas) que podem inibir ou facilitar o decaimento do RNAm. Determinantes da estabilidade do RNAm são encontrados predominantemente na região 3'UTR (3' *untranslated region*; segmento que segue o códon de término da transcrição), mas também nas regiões 5'UTR (5' *untranslated region*; segmento que precede o códon de início da transcrição) e codificadora (GARNEAU *et al.*, 2007).

Foram identificados vários elementos *cis* (*cis-acting elements*) na região 3'UTR de RNAs mensageiros que são importantes na regulação da estabilidade do RNAm (EBERHARDT *et al.*, 2007) através de sua interação com proteínas (*trans-acting*

factors) (GINGERICH et al., 2004). Os elementos *cis* mais comuns na região 3'UTR dos RNAs mensageiros de mamíferos são os elementos ricos em adenosina e uridina (*AU-rich elements* – AREs) (SHAW & KAMEN, 1986; CHEN & SHYU, 1995; BAKHEET et al., 2001). AREs são definidos pela sua habilidade em promover o rápido decaimento do RNAm dependente de desadenilação (XU et al., 1997). Em peixes foi demonstrado que os AREs também são responsáveis pela regulação da estabilidade do RNAm para determinadas moléculas, indicando que estas seqüências encontram-se conservadas ao longo da evolução (ROCA et al., 2007).

Em eucariotos, os RNAs mensageiros podem sofrer degradação através de uma via que é iniciada pelo encurtamento da cauda poli(A), processo este reversível, sendo que transcritos que possuam os sinais corretos podem ser novamente adenilados. No momento em que é decidido que a molécula de RNAm será realmente degradada, esta pode seguir por duas vias: remoção do *capping*, permitindo que o RNAm seja degradado na direção 5'→3' pela XRN1 exorribonuclease; a extremidade 3' que está desprotegida é atacada por um grande complexo de 3'→5' exonucleases, conhecido como exossomo (GARNEAU et al., 2007).

Nas células GEM-81, após 24 horas de tratamento com SRTX S6c 10^{-9} M (FIGURA 35 e FIGURA 36), não foram observadas alterações significativas nos níveis protéicos da rodopsina, apesar de ter-se observado um aumento significativo do nível do RNAm para rodopsina frente ao tratamento com SRTX S6c 10^{-9} M por 24h (FIGURA 14). Da mesma forma, não houve alterações significativas nos níveis protéicos de rodopsina nas células GEM-81 tratadas com SRTX S6c por 24h e cuja proteína total foi extraída 3 ou 6h após o fim do tratamento (FIGURA 35 e FIGURA 36).

Não foram observadas alterações significativas dos níveis protéicos de

rodopsina nas células B16 cuja proteína total foi extraída logo após o fim do tratamento de 24h com ET-1 10^{-10} M (FIGURA 37 e FIGURA 38), apesar de ter-se observado um aumento significativo do nível do RNAm para rodopsina frente ao tratamento com ET-1 10^{-10} M por 24h (FIGURA 17).

Nas células B16 extraídas 3h após o tratamento de 24h com ET-1, observou-se uma diminuição significativa dos níveis protéicos de rodopsina quando comparado ao respectivo controle (FIGURA 37 e FIGURA 38).

Não houve alterações significativas nos níveis protéicos de rodopsina nas células B16 tratadas com ET-1 por 24h e cuja proteína total foi extraída 6h após o fim do tratamento (FIGURA 37 e FIGURA 38).

A manutenção dos níveis protéicos de rodopsina em células GEM-81 tratadas por 24 horas com SRTX S6c, poderia ser explicada pelo lapso de tempo entre a síntese de RNAm e a síntese da proteína correspondente.

Mecanismos de desestabilização do RNAm para rodopsina e/ou de degradação protéica poderiam estar contribuindo para a manutenção e queda dos níveis protéicos de rodopsina nas células B16 tratadas por 24 horas com ET-1 e extraídas 3 ou 6 horas após o final do tratamento. Esses mecanismos podem estar exacerbados durante a janela de 3h entre o final do tratamento de 24h e a extração de proteína total das células, determinando a diminuição significativa nos níveis protéicos de rodopsina sob essa condição. Contudo, os mecanismos moleculares que regulam a estabilidade do RNAm para rodopsina nas linhagens celulares GEM-81 e B16 ainda são desconhecidos.

Como mencionado, a estabilidade dos RNAs mensageiros eucarióticos é determinada por diversos fatores, dentre eles a cauda poli(A) e elementos *cis* localizados na UTR e/ou na região codificadora. O tratamento por 24 horas das células GEM-81 e B16 com SRTX S6c ou ET-1, respectivamente, poderia estar

provocando alterações na atividade ou expressão de RBPs que interagem com seqüências específicas na 3'UTR deste RNAm, diminuindo sua estabilidade. Essa diminuição na estabilidade do RNAm para rodopsina poderia explicar a manutenção dos níveis protéicos deste fotopigmento nas células GEM-81, cuja proteína total foi extraída 0, 3 e 6h após o fim do tratamento de 24h com SRTX S6c e nos melanócitos B16, cuja extração de proteína total se deu 0 ou 6h após o fim do tratamento de 24h com ET-1.

Nos melanócitos B16 cuja proteína foi extraída 3h após o fim do tratamento com ET-1, a diminuição significativa dos níveis da proteína rodopsina poderia ser causada por uma maior atividade ou expressão de RBPs, ou ainda pela expressão de RBPs específicas, exclusivas desta janela temporal de 3h. Contudo, a existência de RBPs e seu local de acoplamento no RNAm para rodopsina ainda não foram estabelecidos.

Pequenas moléculas de RNA regulatórias, incluindo miRNAs (*microRNAs*) e siRNAs (*small interfering RNAs*), por exemplo, também estão associados a mecanismos de *turnover* do RNA (GARNEAU *et al.*, 2007). miRNAs regulam a expressão gênica através de pareamento imperfeito com a 3'UTR dos RNAs mensageiros alvo (FILIPOWICZ *et al.*, 2005), marcando o RNAm para degradação, reprimindo sua tradução e promovendo seu decaimento. siRNAs também podem marcar RNAs mensageiros homólogos para clivagem e degradação (VALENCIA-SANCHEZ *et al.*, 2006), mas ainda podem causar silenciamento da transcrição de seqüências de DNA homólogas (GREWAL & ELGIN, 2007; ZARATIEGUI *et al.*, 2007). Algum desses mecanismos poderia estar modulando o decaimento do RNAm para rodopsina em GEM-81 e B16 frente aos tratamentos com SRTX S6c e ET-1, respectivamente, e, conseqüentemente, os níveis da proteína rodopsina.

As células possuem mecanismos especializados, responsáveis pela

degradação intracelular de proteínas, tais como a degradação enzimática nos lisossomos e o sistema ubiquitina-proteossomo, sendo que em eucariotos a maior parte da degradação protéica controlada ocorre através deste segundo mecanismo (HOCHSTRASSER, 1996; HERSHKO & CIECHANOVER, 1998; PICKART & COHEN, 2004).

A primeira etapa da via de degradação através do sistema ubiquitina-proteossomo envolve a adição de polímeros da proteína ubiquitina, geralmente à cadeia lateral de um resíduo de lisina da proteína-alvo (RAVID & HOCHSTRASSER, 2008). Essa modificação covalente do substrato encaminha a proteína conjugada para um complexo de protease multicatalítico, o proteossomo 26S (PICKART & COHEN, 2004). O proteossomo 26S é um complexo protéico formado pelo proteossomo catalítico 20S e pela partícula reguladora 19S. Os numerosos proteossomos presentes no citoplasma clivam proteoliticamente as proteínas ligadas a ubiquitina em um processo dependente de ATP que tem como produto final peptídeos e moléculas de ubiquitina intactas (RAVID & HOCHSTRASSER, 2008).

Em proteínas, a seletividade de sua conjugação com ubiquitina e conseqüente encaminhamento para o proteossomo é determinada por sinais específicos de degradação (BACHMAIR *et al.*, 1986; BACHMAIR & VARSHAVSKY, 1989; CHAU *et al.* 1989; JOHNSON *et al.*, 1990; BARTEL *et al.*, 1990). Em alguns casos, esses sinais específicos de degradação também podem encaminhar proteínas-alvo para lisossomos (RAVID & HOCHSTRASSER, 2008).

Sinais de degradação podem ser criados em resposta a sinais intracelulares ou ambientais, promovendo a ubiquitinação de proteínas e sua degradação em proteossomos. Esses sinais podem ser criados através da fosforilação de um sítio específico de uma proteína, desmascarando um sinal de degradação oculto; dissociação regulada de uma subunidade protéica e exposição do sinal de

degradação; clivagem de uma ligação peptídica, desde que esta crie uma nova extremidade N-terminal que é reconhecida por uma E3 específica (proteínas acessórias que auxiliam enzimas conjugadoras de ubiquitina) como sendo um resíduo N-terminal desestabilizador (ALBERTS *et al.*, 2004b).

Proteínas modificadas covalentemente (através de fosforilação ou desfosforilação, por exemplo) ou mudanças conformacionais promovidas por ligantes podem levar à exposição de resíduos de lisina outrora inacessíveis, determinando a ubiquitinação de tais proteínas (CIECHANOVER & SCHWARTZ, 1994; HOU *et al.*, 1994).

Estudo utilizando retinas de boi indica que o segmento externo dos bastonetes possui uma via proteolítica dependente de ubiquitina ativa. Devido aos resultados obtidos no estudo, os autores sugerem que a rodopsina é passível de ubiquitinação *in vivo* (OBIN *et al.*, 1996).

Desta forma, outra hipótese para a inexistência de alterações significativas dos níveis protéicos de rodopsina frente ao tratamento de 24 horas das células GEM-81 com SRTX S6c poderia ser a criação de sinais de degradação nas moléculas de rodopsina recém-sintetizadas, promovendo sua ubiquitinação e possível degradação através do sistema ubiquitina proteossomo.

Nos melanócitos B16, a inexistência de alterações significativas dos níveis protéicos de rodopsina nas células cuja extração de proteína total foi realizada 0 ou 6 horas após o final do tratamento de 24h com ET-1 também poderia decorrer da criação de sinais de degradação nas moléculas de rodopsina recém-sintetizadas, que seriam então encaminhadas para degradação. Já nos melanócitos B16, cuja extração de proteína se deu 3h após o fim do tratamento, os níveis da proteína rodopsina encontram-se significativamente reduzidos. Essa redução significativa poderia se dar através da existência de sinais intracelulares ainda não identificados,

presentes apenas durante o período de 3h compreendido entre o fim do tratamento e a extração de proteína total, que exacerbariam o encaminhamento das moléculas de rodopsina para degradação.

No caso dos bastonetes, a extremidade N-terminal das moléculas de rodopsina, assim como o que ocorre em outras proteínas de membrana, se estende até o espaço extracitosólico, sendo conseqüentemente inacessível a uma E3 clássica. Desta forma, a ubiquitinação da rodopsina nos bastonetes parece não requerer E3 ou poderia ter a participação de uma E3 ainda não descrita. A ubiquitinação da rodopsina poderia modular as propriedades de transdução de sinal do receptor, já que sete das nove lisinas citoplasmáticas passíveis de ubiquitinação estão localizadas em regiões da molécula que participam da ligação e ativação da proteína G_t , dobramento, estabilização ou fosforilação do receptor e ligação de arrestina (OBIN *et al.*, 1996).

Nas células GEM-81 e B16, a extremidade N-terminal das moléculas de rodopsina poderia ser acessível a uma E3 clássica, ao contrário do que ocorre nos bastonetes, permitindo sua ubiquitinação nos resíduos de lisina, com conseqüente degradação em proteossomos. A fosforilação das moléculas de rodopsina também poderia contribuir para a exposição de resíduos de lisina outrora inacessíveis e ubiquitinação da proteína.

Um outro evento que deve ser lembrado é que a rodopsina somente se incorpora à membrana celular quando ligada ao retinal (HUBER *et al.*, 1994; RODIECK, 1998). Caso os níveis de retinal no soro e conseqüentemente citoplasmáticos nas células GEM-81 e B16 estejam insuficientes, a rodopsina será inevitavelmente conduzida à degradação, apesar de estímulos para a síntese de seu RNAm tenham efetivamente atingido também o nível de síntese da proteína.

BAZHIN e colaboradores (2008) sugerem que em células cancerígenas que

expressam CRAs, a estimulação por luz visível poderia levar à ativação da rodopsina, o que, por sua vez, poderia induzir a apoptose. Desta forma, não é interessante para as células tumorais apresentar altos níveis protéicos de rodopsina, já que a ativação desse fotopigmento por luz poderia induzir a apoptose nessas células. Portanto, a manutenção dos níveis protéicos de rodopsina nas células GEM-81 provenientes de eritroforoma de *Carassius auratus* frente ao tratamento de 24 horas com SRTX S6c, assim como a manutenção ou mesmo diminuição dos níveis protéicos de rodopsina nos melanócitos B16 de *Mus musculus* após o tratamento de 24 horas com ET-1 poderia ser um mecanismo de defesa contra apoptose.

CONCLUSÕES

- Os níveis do RNAm para rodopsina são moduláveis por sarafotoxina S6c na linhagem celular GEM-81 de *Carassius auratus*, de forma temporal e dose-dependente.
- Os níveis do RNAm para rodopsina são moduláveis por endotelina-1 em melanócitos B16 de *Mus musculus*, de forma temporal e dose-dependente.
- A modulação dos níveis do RNAm para rodopsina nas células GEM-81 parece envolver a ativação de uma isoforma de PKC independente de cálcio e a ativação da via de sinalização das MAPKs.
- Nos melanócitos B16, há indícios do envolvimento de PLC, cálcio como mensageiro intracelular, calmodulina, quinase dependente de cálcio e calmodulina e ativação de PKC na modulação dos níveis do RNAm para rodopsina.
- As vias de sinalização intracelular ativadas por ETs/sarafotoxinas na modulação da expressão gênica de rodopsina em células pigmentares não parecem ter sido conservadas evolutivamente.
- Na linhagem celular GEM-81, os níveis protéicos de rodopsina não são significativamente alterados por 24h de tratamento com SRTX S6c 10^{-9} M. O mesmo ocorre na linhagem B16, cuja proteína total foi extraída logo após ou 6

horas depois do fim do tratamento de 24h com ET-1 10^{-10} M. Nas células B16 cuja proteína total foi extraída 3 horas após o fim do tratamento houve uma diminuição significativa dos níveis protéicos de rodopsina. Esses resultados sugerem o envolvimento de mecanismos de controle pós-transcricional na modulação da expressão protéica de rodopsina.

- Embora o papel do sistema endotelina no controle da pressão intravascular seja recente, ele é, na verdade, mais antigo em termos de sua relação com células pigmentares e parece ter sido preservado durante a filogenia dos vertebrados.

RESUMO

Endotelinas (ETs) e sarafotoxinas (SRTXs) pertencem a uma família de peptídeos vasconstritores que podem regular a migração e/ou produção de pigmentos em células pigmentares de vertebrados (cromatóforos). Em peixes teleósteos, ETs/SRTXs induzem a migração de pigmentos. Em melanócitos humanos, as ETs promovem a melanogênese e mitogênese. ETs também regulam a transcrição de diversos genes. Esses efeitos são mediados por diferentes vias de sinalização intracelular, dentre elas a via da fosfolipase C (PLC), da proteína quinase C (PKC) e da cascata de sinalização por proteína quinases ativadas por mitógeno (MAPKs).

A rodopsina é um fotopigmento responsável pela detecção de fótons presente nos bastonetes dos olhos dos vertebrados. A modulação da transcrição do gene para rodopsina em peixes teleósteos e mamíferos parece ocorrer através de elementos conservados.

Cromatóforos podem responder diretamente à luz, resultando no deslocamento dos grânulos de pigmentos através dos processos dendríticos das células. Essas respostas evocadas por luz são provavelmente mediadas por moléculas fotorreceptoras expressas por essas células.

A linhagem celular GEM-81, proveniente de eritroforoma do peixe teleósteo *Carassius auratus*, assim como os melanócitos B16 de *Mus musculus* expressam rodopsina e receptores para ETs dos subtipos ET_B e ET_A, respectivamente.

O objetivo deste trabalho foi determinar se: 1) os níveis do RNAm para rodopsina poderiam ser modulados por SRTX S6c em GEM-81 e por ET-1 em B16 e quais os mecanismos de sinalização intracelular envolvidos nessa modulação; 2) os

níveis protéicos de rodopsina também poderiam ser modulados por SRTX S6c em GEM-81 e por ET-1 em B16.

Através de PCR em tempo real (quantitativo), demonstrou-se que SRTX S6c e ET-1 modulam os níveis do RNAm para rodopsina em GEM-81 e B16, respectivamente, de forma temporal e dose-dependente. Em GEM-81, essa modulação envolve a ativação de uma PKC e da cascata das MAPKs. Já em B16, há o envolvimento de PLC, cálcio como mensageiro intracelular, calmodulina, quinase dependente de cálcio/calmodulina e PKC.

Através de ensaios de *Western blotting*, foi demonstrado que na linhagem GEM-81 os níveis protéicos de rodopsina não são significativamente alterados por 24 horas de tratamento com SRTX 10^{-9} M S6c, sugerindo o envolvimento de mecanismos de controle pós-transcricional na modulação da expressão protéica de rodopsina.

Nas células B16 cuja extração de proteína total ocorreu 0 ou 6h após o fim do tratamento de 24h com ET-1 10^{-10} M, os níveis protéicos de rodopsina não são significativamente alterados. Já nas células cuja proteína total foi extraída 3h após o fim do tratamento com ET-1, observou-se uma diminuição significativa dos níveis da proteína rodopsina. Esses resultados sugerem o envolvimento de mecanismos de controle pós-transcricional na modulação da expressão protéica de rodopsina, mecanismos estes exacerbados nas células B16 cuja extração de proteína ocorreu 3h após o fim do tratamento.

ABSTRACT

Endothelins (ETs) and sarafotoxins (SRTXs) belong to a family of vasoconstrictor peptides, which can regulate pigment migration and/or production in vertebrate pigment cells (chromatophores). In teleostean fish, ETs/SRTXs induce pigment migration. In human melanocytes, ETs promote melanogenesis and mitogenesis. ETs also regulate the transcription of several genes. These effects are mediated by different intracellular signaling pathways, such as the phospholipase C (PLC), protein kinase C (PKC) and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade.

Rhodopsin is a photopigment responsible for photon detection, found in vertebrate rod cells. Rhodopsin gene transcription regulation in teleostean fish and mammals seems to occur through conserved elements.

Chromatophores can respond directly to light, promoting the migration of pigment granules along the cells' dendritic processes. These light-evoked responses are probably mediated by photoreceptive molecules expressed by these cells.

The teleost *Carassius auratus* erythrophoroma cell line, GEM-81 and *Mus musculus* B16 melanocytes express rhodopsin, as well as the ET receptors, ET_B and ET_A, respectively.

The aim of this study was to determine whether 1) rhodopsin mRNA levels could be modulated by SRTX S6c in GEM-81 cells and ET-1 in B16 cells and the intracellular signaling mechanisms involved; 2) rhodopsin protein levels could also be modulated by SRTX S6c in GEM-81 and ET-1 in B16 cells.

Using real time (quantitative) PCR, we demonstrated that SRTX S6c and ET-1 modulate rhodopsin mRNA levels in GEM-81 and B16, respectively, in a time and

dose-dependent way. In GEM-81, this modulation involves the activation of a PKC and the MAPK cascade. In B16, it involves PLC, calcium as a second messenger, calmodulin, a calcium/calmodulin dependent kinase and PKC.

The *Western blotting* assays demonstrated that in GEM-81 cells rhodopsin protein levels are not significantly altered by a 24-hour treatment with 10^{-9} M SRTX S6c, suggesting the involvement of post-transcriptional mechanisms in the modulation of rhodopsin expression.

In B16 cells, whose total protein was extracted 0 or 6 hours after the 24-hour treatment with 10^{-10} M ET-1, rhodopsin protein levels were not significantly altered. When the cells' total protein was extracted 3 hours after the 24-hour treatment with ET-1, a significant reduction in rhodopsin protein levels was observed. These results also suggest the involvement of post-transcriptional mechanisms in the modulation of rhodopsin expression in this cell line. These mechanisms could be somehow exacerbated in B16 cells whose protein was extracted 3 hours after the treatment.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I. Mash-1 is expressed during ROD photoreceptor differentiation and binds an E-box, E(opsin)-1 in the rat opsin gene. *Brain Res Dev Brain Res*, v. 90, n. 1-2, p. 184-9, Dez 1995.

ALBERTS, B. *et al.* Como as Células Lêem o Genoma: do DNA à Proteína. *Biologia Molecular da Célula*: Artmed, 2004a. Cap.6. p. 349; 361-2.

_____. Comunicação Celular. *Biologia Molecular da Célula*: Artmed, 2004b. Cap.15. p. 867-868.

AMBAR, I.; SOKOLOVSKY, M. Endothelin receptors stimulate both phospholipase C and phospholipase D activities in different cell lines. *Eur J Pharmacol*, v. 245, n. 1, p. 31-41, Mar 1993.

ANGEL, P. *et al.* Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, v. 49, n. 6, p. 729-39, Jun 1987.

ARAI, H. *et al.* Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, v. 348, n. 6303, p. 730-2, Dez 20-27 1990.

ARAMORI, I.; NAKANISHI, S. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, v. 267, n. 18, p. 12468-74, Jun 1992.

ARNHEITER, H. Evolutionary biology. Eyes viewed from the skin. *Nature*, v. 391, n. 6668, p. 632-3, Fev 1998.

ATTINÀ, T. *et al.* Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart*, v. 91, n. 6, p. 825-31, Jun 2005.

BACHMAIR, A. *et al.* In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, v. 234, n. 4773, p. 179-86, Out 1986.

BACHMAIR, A.; VARSHAVSKY, A. The degradation signal in a short-lived protein. *Cell*, v. 56, n. 6, p. 1019-32, Mar 1989.

BAGNARA, J. Cytology and cytophysiology of non-melanophore pigment cells. *Int Rev Cytol*, v. 20, p. 173-205, 1966.

BAKHEET, T. *et al.* ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res*, v. 29, n. 1, p. 246-54, Jan 2001.

BAN, E. *et al.* The signaling pathway in photoresponses that may be mediated by visual pigments in erythrophores of Nile tilapia. *Pigment Cell Res*, v. 18, n. 5, p. 360-9, Out 2005.

BARTEL, B. *et al.* The recognition component of the N-end rule pathway. *EMBO J*, v. 9, n. 10, p. 3179-89, Out 1990.

BARTON, M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics. *Curr Hypertens Rep*, v. 2, n. 1, p. 84-91, Fev 2000.

BAYNASH, A. *et al.* Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell*, v. 79, n. 7, p. 1277-85, Dez 1994.

BAZHIN, A. *et al.* Visible light modulates the expression of cancer-retina antigens. *Mol Cancer Res*, v. 6, n. 1, p. 110-8, Jan 2008.

_____. Photoreceptor proteins as cancer-retina antigens. *Int J Cancer*, v. 120, n. 6, p. 1268-76, Mar 2007.

BENIGNI, A. *et al.* Human placenta expresses endothelin gene and corresponding protein is excreted in urine in increasing amounts during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, v. 164, n. 3, p. 844-8, Mar 1991.

BERNSTEIN, P. *et al.* The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol*, v. 9, n. 2, p. 659-70, Fev 1989.

BERTHIAUME, N. *et al.* Endothelin antagonism improves hepatic insulin sensitivity associated with insulin signaling in Zucker fatty rats. *Metabolism*, v. 54, n. 11, p. 1515-23, Nov 2005.

BHATTACHARYA, I.; ULLRICH, A. Endothelin-1 inhibits adipogenesis: role of phosphorylation of Akt and ERK1/2. *FEBS Lett*, v. 580, n. 24, p. 5765-71, Out 2006.

BISOTTO, S.; FIXMAN, E. Src-family tyrosine kinases, phosphoinositide 3-kinase and Gab1 regulate extracellular signal-regulated kinase 1 activation induced by the type A endothelin-1 G-protein-coupled receptor. *Biochem J*, v. 360, n. Pt 1, p. 77-85, Nov 2001.

BKAILY, G. *et al.* G-protein-coupled receptors, channels, and Na⁺-H⁺ exchanger in nuclear membranes of heart, hepatic, vascular endothelial, and smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 84, n. 3-4, p. 431-41, Mar-Abr 2006.

BLOCH, K. *et al.* cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin 3. *J Biol Chem*, v. 264, n. 30, p. 18156-61, Out 1989.

_____. Structural organization and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J Biol Chem*, v. 264, n. 18, p. 10851-7, Jun 1989.

BOHMANN, D. *et al.* Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*, v. 238, n. 4832, p. 1386-92, Dez 1987.

BOISSY, R. The melanocyte: its structure, function and subpopulations in skin, eyes

and hair. *Dermatologic Clinics*: W.B. Saunders Co., 1988. p. 161-74.

BOULANGER, C.; LÜSCHER, T. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*, v. 85, n. 2, p. 587-90, Fev 1990.

BREMNES, T. *et al.* Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem*, v. 275, n. 23, p. 17596-604, Jun 2000.

BUSTIN, S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, v. 29, n. 1, p. 23-39, Ago 2002.

CACACE, A. *et al.* PKC epsilon functions as an oncogene by enhancing activation of the Raf kinase. *Oncogene*, v. 13, n. 12, p. 2517-26, Dez 1996.

CAMERON, I. *et al.* Endothelin-like immunoreactivity in human endometrium. *J Reprod Fertil*, v. 95, n. 2, p. 623-8, Jul 1992.

CHAU, V. *et al.* A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*, v. 243, n. 4898, p. 1576-83, Mar 1989.

CHEADLE, C. *et al.* Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC Genomics*, v. 6, n. 1, p. 75, 2005.

CHEN, C.; SHYU, A. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci*, v. 20, n. 11, p. 465-70, Nov 1995.

CHEN, S. *et al.* Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron*, v. 19, n. 5, p. 1017-30, Nov 1997.

CHEN, S.; ZACK, D. Ret 4, a positive acting rhodopsin regulatory element identified using a bovine retina in vitro transcription system. *J Biol Chem*, v. 271, n. 45, p.

28549-57, Nov 1996.

CHENG, H. *et al.* Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors. *Hum Mol Genet*, v. 13, n. 15, p. 1563-75, Ago 2004.

CHENG, T. *et al.* Role of mitogen-activated protein kinase pathway in reactive oxygen species-mediated endothelin-1-induced beta-myosin heavy chain gene expression and cardiomyocyte hypertrophy. *J Biomed Sci*, v. 12, n. 1, p. 123-33, 2005.

CHIEN, K. *et al.* Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J*, v. 5, n. 15, p. 3037-46, Dez 1991.

CHINTALGATTU, V.; KATWA, L. Role of protein kinase Cdelta in endothelin-induced type I collagen expression in cardiac myofibroblasts isolated from the site of myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 311, n. 2, p. 691-9, Nov 2004.

CHIU, P. *et al.* Influence of C-ANF receptor and neutral endopeptidase on pharmacokinetics of ANF in rats. *Am J Physiol*, v. 260, n. 1 Pt 2, p. R208-16, Jan 1991.

CHIU, R. *et al.* The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell*, v. 54, n. 4, p. 541-52, Ago 1988.

CHUN, M. *et al.* Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, n. 24, p. 11728-32, Nov 1994.

CHUNG, K.; WALKER, J. Interaction and inhibitory cross-talk between endothelin and ErbB receptors in the adult heart. *Mol Pharmacol*, v. 71, n. 6, p. 1494-502, Jun 2007.

CIECHANOVER, A.; SCHWARTZ, A. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mechanisms of recognition of the proteolytic substrate and involvement in the degradation of native cellular proteins. *FASEB J*, v. 8, n. 2, p. 182-91, Fev 1994.

CODER, R. Identity of endothelin-converting enzyme and other targets for the therapeutic regulation of endothelin biosynthesis. In: WARNER, T. (Ed.). *Endothelin and its inhibitors*: Springer, 2001. p. 35-67.

CYBULSKY, A. *et al.* Glomerular epithelial cells produce endothelin-1. *J Am Soc Nephrol*, v. 3, n. 7, p. 1398-404, Jan 1993.

DANIOLOS, A. *et al.* Action of light on frog pigment cells in culture. *Pigment Cell Res*, v. 3, n. 1, p. 38-43, Jan-Fev 1990.

DAVENPORT, A. International Union of Pharmacology. XXIX. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, v. 54, n. 2, p. 219-26, Jun 2002.

DERETIC, D.; PAPERMASTER, D. Polarized sorting of rhodopsin on post-Golgi membranes in frog retinal photoreceptor cells. *J Cell Biol*, v. 113, n. 6, p. 1281-93, Jun 1991.

DERETIC, D. *et al.* Regulation of sorting and post-Golgi trafficking of rhodopsin by its C-terminal sequence QVS(A)PA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 18, p. 10620-5, Set 1998.

_____. Rhodopsin C terminus, the site of mutations causing retinal disease, regulates trafficking by binding to ADP-ribosylation factor 4 (ARF4). *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 9, p. 3301-6, Mar 2005.

DUCANCEL, F. The sarafotoxins. *Toxicon*, v. 40, n. 11, p. 1541-5, Nov 2002.

DUPUIS, J. *et al.* Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation*, v. 94, n. 7, p. 1578-84, Out 1996.

EBERHARDT, W. *et al.* Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther*, v. 114, n. 1, p. 56-73, Abr 2007.

EHRENREICH, H. *et al.* Endothelins belong to the assortment of mast cell-derived and mast cell-bound cytokines. *New Biol*, v. 4, n. 2, p. 147-56, Fev 1992.

EMORI, T. *et al.* Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension*, v. 18, n. 2, p. 165-70, Ago 1991.

EMOTO, N.; YANAGISAWA, M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem*, v. 270, n. 25, p. 15262-8, Jun 1995.

ENDO, T. *et al.* Regulation of endothelin-1 synthesis in cultured guinea pig airway epithelial cells by various cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 186, n. 3, p. 1594-9, Ago 1992.

ERDÖS, E.; SKIDGEL, R. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J*, v. 3, n. 2, p. 145-51, Fev 1989.

EVANS, H. *et al.* Modulation of myocardial relaxation by basal release of endothelin from endocardial endothelium. *Cardiovasc Res*, v. 28, n. 11, p. 1694-9, Nov 1994.

FAN, J. *et al.* Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 16, p. 10611-6, Ago 2002.

FILADELFI, A. *et al.* Phylogeny of purine and endothelin receptors in vertebrate integumentary melanocytes. *Pigment Cell Res*, v. 5 (Suppl.), p. 83, 1996.

_____. The endothelin/sarafotoxin-induced increase of the proliferation of undifferentiated and DMSO-differentiated GEM-81 goldfish erythrophoroma cells is mediated by ETB receptors. *Pigment Cell Res*, v. 17, n. 5, p. 480-7, Out 2004.

- FILIPOWICZ, W. *et al.* Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*, v. 15, n. 3, p. 331-41, Jun 2005.
- FINGERMAN, M. Comparative physiology: chromatophores. *Annu Rev Physiol*, v. 32, p. 345-72, 1970.
- FITZGIBBON, J. *et al.* The rhodopsin-encoding gene of bony fish lacks introns. *Gene*, v. 164, n. 2, p. 273-7, Out 1995.
- FOSTER, R. *et al.* Identification of vertebrate deep brain photoreceptors. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 18, n. 4, p. 541-6, 1994.
- FREEDMAN, N. *et al.* Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem*, v. 272, n. 28, p. 17734-43, Jul 1997.
- FRIEDMAN, J. *et al.* The minimal transactivation domain of the basic motif-leucine zipper transcription factor NRL interacts with TATA-binding protein. *J Biol Chem*, v. 279, n. 45, p. 47233-41, Nov 2004.
- FUJII, R. Cytophysiology of fish chromatophores. *Int Rev Cytol*, v. 143, p. 191-255, 1993.
- _____. The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell Res*, v. 13, n. 5, p. 300-19, Out 2000.
- FUJII, R.; OSHIMA, N. Control of chromatophores movements in teleost fishes. *Zool Sci*, v. 3, p. 13-47, 1986.
- FUJII, R. *et al.* Endothelin-1 causes aggregation of pigment in teleostean melanophores. *Zool Sci*, v. 10, p. 763-72, 1993.
- FUJITA, T.; FUJII, R. Endothelin disperses light-scattering organelles in leucophores of the medaka, *Oryzias latipes*. *Zool Sci*, v. 14, p. 559-69, 1996.

FUKUDA, M. *et al.* Rhodopsin carbohydrate. Structure of small oligosaccharides attached at two sites near the NH₂ terminus. *J Biol Chem*, v. 254, n. 17, p. 8201-7, Set 1979.

GARNEAU, N. *et al.* The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 8, n. 2, p. 113-26, Fev 2007.

GIAID, A. *et al.* Endothelin 1, an endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86, n. 19, p. 7634-8, Out 1989.

GINGERICH, T. *et al.* AU-rich elements and the control of gene expression through regulated mRNA stability. *Anim Health Res Rev*, v. 5, n. 1, p. 49-63, Jun 2004.

GRAFF, J. *et al.* Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Res*, v. 68, n. 3, p. 631-4, Fev 2008.

GREWAL, S.; ELGIN, S. Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*, v. 447, n. 7143, p. 399-406, Maio 2007.

GUHANIYOGI, J.; BREWER, G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*, v. 265, n. 1-2, p. 11-23, Mar 2001.

HALL, M. *et al.* Biosynthesis and assembly of the rod outer segment membrane system. Formation and fate of visual pigment in the frog retina. *J Mol Biol*, v. 45, n. 2, p. 397-406, Out 1969.

HARTMANN, T. *et al.* SEREX identification of new tumor antigens linked to melanoma-associated retinopathy. *Int J Cancer*, v. 114, n. 1, p. 88-93, Mar 2005.

HAYASHI, H. *et al.* The endothelin receptors that mediate aggregation of pigment in fish melanophores. *Comp Biochem Physiol B*, v. 115, p. 143-52, 1996.

HAYASHI, M. *et al.* Long-sarafotoxins: characterization of a new family of endothelin-like peptides. *Peptides*, v. 25, n. 8, p. 1243-51, Ago 2004.

HEID, C. *et al.* Real time quantitative PCR. *Genome Res*, v. 6, n. 10, p. 986-94, Out 1996.

HELLER, J. Structure of visual pigments. I. Purification, molecular weight, and composition of bovine visual pigment500. *Biochemistry*, v. 7, n. 8, p. 2906-13, Ago 1968.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, v. 67, p. 425-79, 1998.

HILLIER, C. *et al.* Effects of urotensin II in human arteries and veins of varying caliber. *Circulation*, v. 103, n. 10, p. 1378-81, Mar 2001.

HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, v. 30, p. 405-39, 1996.

HORI, S. *et al.* Distinct tissue distribution and cellular localization of two messenger ribonucleic acids encoding different subtypes of rat endothelin receptors. *Endocrinology*, v. 130, n. 4, p. 1885-95, Abr 1992.

HOU, D. *et al.* Activation-dependent ubiquitination of a T cell antigen receptor subunit on multiple intracellular lysines. *J Biol Chem*, v. 269, n. 19, p. 14244-7, Maio 1994.

HU, R. *et al.* Atrial natriuretic peptide inhibits the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. Mediation through the C receptor. *J Biol Chem*, v. 267, n. 24, p. 17384-9, Ago 1992.

HUANG, N. *et al.* Activation of protein kinase A and atypical protein kinase C by A(2A) adenosine receptors antagonizes apoptosis due to serum deprivation in PC12 cells. *J Biol Chem*, v. 276, n. 17, p. 13838-46, Abr 2001.

HUBER, A. *et al.* Opsin maturation and targeting to rhabdomeral photoreceptor membranes requires the retinal chromophore. *Eur J Cell Biol*, v. 63, n. 2, p. 219-29, Abr 1994.

IM, L. *et al.* Rhythmic expression, light entrainment and alpha-MSH modulation of rhodopsin mRNA in a teleost pigment cell line. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, v. 147, n. 3, p. 691-6, Jul 2007.

IMOKAWA, G. *et al.* The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res*, v. 10, n. 4, p. 218-28, Ago 1997.

_____. Intracellular signaling mechanisms leading to synergistic effects of endothelin-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes. Cross-talk via trans-activation of the tyrosine kinase c-kit receptor. *J Biol Chem*, v. 275, n. 43, p. 33321-8, Out 2000.

_____. Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. *J Invest Dermatol*, v. 105, n. 1, p. 32-7, Jul 1995.

_____. Signalling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochem J*, v. 314 (Pt 1), p. 305-12, Fev 1996.

_____. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J Biol Chem*, v. 267, n. 34, p. 24675-80, Dez 1992.

INOUE, A. *et al.* The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86, n. 8, p. 2863-7, Abr 1989.

ISOLDI, M. *et al.* Identification of protein kinase C (PKC) isoforms in teleostean, amphibian and avian pigment cells. *Pigment Cell Res*, v. 16, n. 6, p. 639-43, Dez

2003.

_____. Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 4, p. 1217-21, Jan 2005.

JOHNSON, E. *et al.* cis-trans recognition and subunit-specific degradation of short-lived proteins. *Nature*, v. 346, n. 6281, p. 287-91, Jul 1990.

JOUGASAKI, M. *et al.* Cardiotrophin-1 stimulates endothelin-1 via gp130 in vascular endothelial cells. *Peptides*, v. 23, n. 8, p. 1441-7, Ago 2002.

JUAN, C. *et al.* Endothelin-1 regulates adiponectin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes via distinct signaling pathways. *Endocrinology*, v. 148, n. 4, p. 1835-42, Abr 2007.

KAIBUCHI, K. *et al.* Possible involvement of protein kinase C and calcium ion in growth factor-induced expression of c-myc oncogene in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, v. 261, n. 3, p. 1187-92, Jan 1986.

KANG, H. *et al.* Endothelin-B receptor-mediated Ca^{2+} signaling in human melanocytes. *Pflugers Arch*, v. 435, n. 3, p. 350-6, Fev 1998.

KAO, Y.; FONG, J. Endothelin-1 induction of Glut1 transcription in 3T3-L1 adipocytes involves distinct PKCepsilon- and p42/p44 MAPK-dependent pathways. *Biochim Biophys Acta*, v. 1780, n. 2, p. 154-9, Fev 2008.

KARNE, S. *et al.* Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem*, v. 268, n. 25, p. 19126-33, Set 1993.

KASAI, A.; OSHIMA, N. Light-sensitive motile iridophores and visual pigments in the neon tetra, *Paracheirodon innesi*. *Zoolog Sci*, v. 23, n. 9, p. 815-9, Set 2006.

KASUYA, Y. *et al.* Endothelin-1 activates mitogen-activated protein kinases through

two independent signalling pathways in rat astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 204, n. 3, p. 1325-33, Nov 1994.

KATAOKA, K. *et al.* Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol*, v. 14, n. 1, p. 700-12, Jan 1994.

KATWA, L. Cardiac myofibroblasts isolated from the site of myocardial infarction express endothelin de novo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 285, n. 3, p. H1132-9, Set 2003.

KAWAI, I. Light sensitive response of the scale xanthophores of a teleost *Oryzias latipes*. *Medical Biology (Tokyo)*, v. 118, p. 93-7, 1989.

KAWAMURA, S. *et al.* Evolutionarily conserved and divergent regulatory sequences in the fish rod opsin promoter. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, v. 141, n. 4, p. 391-9, Ago 2005.

KAWANABE, Y. *et al.* Molecular mechanisms for the activation of voltage-independent Ca²⁺ channels by endothelin-1 in chinese hamster ovary cells stably expressing human endothelin(A) receptors. *Mol Pharmacol*, v. 62, n. 1, p. 75-80, Jul 2002.

KEDZIERSKI, R.; YANAGISAWA, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 41, p. 851-76, 2001.

KEENE, J.; TENENBAUM, S. Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell*, v. 9, n. 6, p. 1161-7, Jun 2002.

KELLY, K. *et al.* Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell*, v. 35, n. 3 Pt 2, p. 603-10, Dez 1983.

KELSO, E. *et al.* Endothelin(A) receptor subtype mediates endothelin-induced contractility in left ventricular cardiomyocytes isolated from rabbit myocardium. *J*

Pharmacol Exp Ther, v. 294, n. 3, p. 1047-52, Set 2000.

KENNEDY, B. *et al.* Isolation of a zebrafish rod opsin promoter to generate a transgenic zebrafish line expressing enhanced green fluorescent protein in rod photoreceptors. *J Biol Chem*, v. 276, n. 17, p. 14037-43, Abr 2001.

KERPPOLA, T.; CURRAN, T. Maf and Nrl can bind to AP-1 sites and form heterodimers with Fos and Jun. *Oncogene*, v. 9, n. 3, p. 675-84, Mar 1994.

KERR, M.; KENNY, A. The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J*, v. 137, n. 3, p. 489-95, Mar 1974a.

_____. The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J*, v. 137, n. 3, p. 477-88, Mar 1974b.

KIKUCHI, T. *et al.* The proximal promoter of the mouse arrestin gene directs gene expression in photoreceptor cells and contains an evolutionarily conserved retinal factor-binding site. *Mol Cell Biol*, v. 13, n. 7, p. 4400-8, Jul 1993.

KIMURA, A. *et al.* Both PCE-1/RX and OTX/CRX interactions are necessary for photoreceptor-specific gene expression. *J Biol Chem*, v. 275, n. 2, p. 1152-60, Jan 2000.

KLOOG, Y. *et al.* Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science*, v. 242, n. 4876, p. 268-70, Out 1988.

KLOOG, Y.; SOKOLOVSKY, M. Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Pharmacol Sci*, v. 10, n. 6, p. 212-4, Jun 1989.

KOBAYASHI, A. *et al.* Inhibitory mechanism of an extract of *Althaea officinalis* L. on endothelin-1-induced melanocyte activation. *Biol Pharm Bull*, v. 25, n. 2, p. 229-34, Fev 2002.

KOCHVA, E. *et al.* A new type of toxin in the venom of snakes of the genus *Atractaspis* (Atractaspidinae). *Toxicon*, v. 20, n. 3, p. 581-92, 1982.

KODA, M. *et al.* Endothelin-1 enhances fibrogenic gene expression, but does not promote DNA synthesis or apoptosis in hepatic stellate cells. *Comp Hepatol*, v. 5, p. 5, 2006.

KOHAN, D. The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v. 15, n. 1, p. 34-40, Jan 2006.

KOIZUMI, S. *et al.* Endothelin increased $[Ca^{2+}]_i$ in cultured neurones and slices of rat hippocampus. *Neuroreport*, v. 5, n. 9, p. 1077-80, Maio 1994.

KOLCH, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*, v. 351 Pt 2, p. 289-305, Out 2000.

KOLCH, W. *et al.* Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, v. 364, n. 6434, p. 249-52, Jul 1993.

KUMAR, R. *et al.* The bZIP transcription factor Nrl stimulates rhodopsin promoter activity in primary retinal cell cultures. *J Biol Chem*, v. 271, n. 47, p. 29612-8, Nov 1996.

LAHAV, R. *et al.* An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, n. 20, p. 11496-500, Set 1999.

LEE, M. *et al.* Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J Clin Invest*, v. 86, n. 1, p. 141-7, Jul 1990.

LEE, W. *et al.* Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature*, v. 325, n. 6102, p. 368-72, Jan 22-28 1987.

LEM, J. *et al.* Tissue-specific and developmental regulation of rod opsin chimeric genes in transgenic mice. *Neuron*, v. 6, n. 2, p. 201-10, Fev 1991.

LERMAN, A. *et al.* Endothelin has biological actions at pathophysiological concentrations. *Circulation*, v. 83, n. 5, p. 1808-14, Maio 1991.

LERNER, L. *et al.* Sp4 is expressed in retinal neurons, activates transcription of photoreceptor-specific genes, and synergizes with Crx. *J Biol Chem*, v. 280, n. 21, p. 20642-50, Maio 2005.

LEVIN, E. Endothelins. *N Engl J Med*, v. 333, n. 6, p. 356-63, Ago 1995.

LIU, Y. *et al.* Isolation and characterization of a zebrafish homologue of the cone rod homeobox gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 42, n. 2, p. 481-7, Fev 2001.

LOVE, M.; MCMURRAY, J. Endothelin in chronic heart failure: current position and future prospects. *Cardiovasc Res*, v. 31, n. 5, p. 665-74, Maio 1996.

LTEIF, A. *et al.* Endothelin limits insulin action in obese/insulin-resistant humans. *Diabetes*, v. 56, n. 3, p. 728-34, Mar 2007.

LÓPEZ-FARRÉ, A. *et al.* Renal effects and mesangial cell contraction induced by endothelin are mediated by PAF. *Kidney Int*, v. 39, n. 4, p. 624-30, Abr 1991.

LÜSCHER, T.; BARTON, M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*, v. 102, n. 19, p. 2434-40, Nov 2000.

MA, G. *et al.* Retina-specific cis-elements and binding nuclear proteins of carp rhodopsin gene. *FEBS Lett*, v. 508, n. 2, p. 265-71, Nov 2001.

MACCUMBER, M. *et al.* Ocular effects of the endothelins. Abundant peptides in the eye. *Arch Ophthalmol*, v. 109, n. 5, p. 705-9, Maio 1991.

_____. Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86, n. 18, p. 7285-9, Set 1989.

MACKAY, H.; TWELVES, C. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer*, v. 7, n. 7, p. 554-62, Jul 2007.

MAEDA, A. *et al.* Identification of human antitumor cytotoxic T lymphocytes epitopes of recoverin, a cancer-associated retinopathy antigen, possibly related with a better prognosis in a paraneoplastic syndrome. *Eur J Immunol*, v. 31, n. 2, p. 563-72, Fev 2001.

MAERKER, T. *et al.* A novel Usher protein network at the periciliary reloading point between molecular transport machineries in vertebrate photoreceptor cells. *Hum Mol Genet*, v. 17, n. 1, p. 71-86, Jan 2008.

MAGUIRE, J.; DAVENPORT, A. Is urotensin-II the new endothelin? *Br J Pharmacol*, v. 137, n. 5, p. 579-88, Nov 2002.

MARGULIES, K. *et al.* Neutral endopeptidase inhibition potentiates the renal actions of atrial natriuretic factor. *Kidney Int*, v. 38, n. 1, p. 67-72, Jul 1990.

MARTINEZ, J.; BARNSTABLE, C. Erx, a novel retina-specific homeodomain transcription factor, can interact with Ret 1/PCEI sites. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 250, n. 1, p. 175-80, Set 1998.

MASAKI, T. *et al.* Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function. *Circulation*, v. 84, n. 4, p. 1457-68, Out 1991.

MASAKI, T. Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci*, v. 25, n. 4, p. 219-24, Abr 2004.

MATSAS, R. *et al.* Substance P and [Leu]enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney

microvilli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 80, n. 10, p. 3111-5, Maio 1983.

MATSUMOTO, J. *et al.* Permanent cell lines from erythrophoromas in goldfish (*Carassius auratus*). *J Natl Cancer Inst*, v. 64, n. 4, p. 879-90, Abr 1980.

_____. Multiplicity in phenotypic expression of fish erythrophoroma and irido-melanophoroma cells in vitro. In: DAWE, C. (Ed.). *Phyletic Approaches to Cancer*. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press, 1981. p. 253-66.

MEIDAN, R.; LEVY, N. The ovarian endothelin network: an evolving story. *Trends Endocrinol Metab*, v. 18, n. 10, p. 379-85, Dez 2007.

MITTON, K. *et al.* The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation. *J Biol Chem*, v. 275, n. 38, p. 29794-9, Set 2000.

_____. Interaction of retinal bZIP transcription factor NRL with Flt3-interacting zinc-finger protein Fiz1: possible role of Fiz1 as a transcriptional repressor. *Hum Mol Genet*, v. 12, n. 4, p. 365-73, Fev 2003.

MIYASHITA, Y. *et al.* Expression of opsin molecule in cultured murine melanocyte. *J Investig Dermatol Symp Proc*, v. 6, n. 1, p. 54-7, Nov 2001.

MOLDAY, R.; MOLDAY, L. Differences in the protein composition of bovine retinal rod outer segment disk and plasma membranes isolated by a ricin-gold-dextran density perturbation method. *J Cell Biol*, v. 105, n. 6 Pt 1, p. 2589-601, Dez 1987.

MOORE, M. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science*, v. 309, n. 5740, p. 1514-8, Set 2005.

MORABITO, M. *et al.* Characterization of developmentally regulated and retina-specific nuclear protein binding to a site in the upstream region of the rat opsin gene. *J Biol Chem*, v. 266, n. 15, p. 9667-72, Maio 1991.

MORISHITA, R. *et al.* Expression of smooth muscle cell-specific proteins in neural progenitor cells induced by agonists of G protein-coupled receptors and transforming growth factor-beta. *J Neurochem*, v. 101, n. 4, p. 1031-40, Maio 2007.

MORITZ, O. *et al.* Mutant rab8 Impairs docking and fusion of rhodopsin-bearing post-Golgi membranes and causes cell death of transgenic *Xenopus* rods. *Mol Biol Cell*, v. 12, n. 8, p. 2341-51, Ago 2001.

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, n. 1, p. 11-8, Set 1996.

MOTOHASHI, H. *et al.* Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene*, v. 294, n. 1-2, p. 1-12, Jul 2002.

MOTTA, E. *et al.* Mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in rats is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and MAP kinases. *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 231, n. 6, p. 1141-5, Jun 2006.

MULDOON, L. *et al.* Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, diacylglycerol release, and gene expression in response to endothelin, a potent new agonist for fibroblasts and smooth muscle cells. *J Biol Chem*, v. 264, n. 15, p. 8529-36, Maio 1989.

MURATA, N.; FUJII, R. Pigment-aggregating action of endothelins on medaka xanthophores. *Zool Sci*, v. 17, p. 853-62, 2000.

NAICKER, S.; BHOOLA, K. Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease. *Pharmacol Ther*, v. 90, n. 1, p. 61-88, Abr 2001.

NAKAHATA, Y. *et al.* The in vitro real-time oscillation monitoring system identifies potential entrainment factors for circadian clocks. *BMC Mol Biol*, v. 7, p. 5, 2006.

NATH, K. *et al.* Effects of ethidium bromide and SYBR Green I on different polymerase chain reaction systems. *J Biochem Biophys Methods*, v. 42, n. 1-2, p. 15-29, Jan 2000.

NELSON, J. *et al.* The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*, v. 3, n. 2, p. 110-6, Fev 2003.

NETT, P. *et al.* Recent developments on endothelin antagonists as immunomodulatory drugs--from infection to transplantation medicine. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov*, v. 1, n. 3, p. 265-76, Nov 2006.

NIE, Z. *et al.* RER, an evolutionarily conserved sequence upstream of the rhodopsin gene, has enhancer activity. *J Biol Chem*, v. 271, n. 5, p. 2667-75, Fev 1996.

NISHIZAWA, M. *et al.* v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 86, n. 20, p. 7711-5, Out 1989.

OBIN, M. *et al.* Ubiquitinylation and ubiquitin-dependent proteolysis in vertebrate photoreceptors (rod outer segments). Evidence for ubiquitinylation of Gt and rhodopsin. *J Biol Chem*, v. 271, n. 24, p. 14473-84, Jun 1996.

OKSCHE, A. *et al.* Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Mol Pharmacol*, v. 57, n. 6, p. 1104-13, Jun 2000.

OPDECAMP, K. *et al.* Endothelin signalling in the development of neural crest-derived melanocytes. *Biochem Cell Biol*, v. 76, n. 6, p. 1093-9, 1998.

OSHIMA, N.; YOKOZEKI, A. Direct control of pigment aggregation and dispersion in *Tilapia erythrophores* by light. *Zoological Science*, v. 16, p. 51-4, 1999.

OTA, S. *et al.* Endothelin-1 secretion from cultured rabbit gastric epithelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 17 Suppl 7, p. S406-7, 1991.

PALCZEWSKI, K. G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem*, v. 75, p. 743-67, 2006.

PALUMBO, A. *et al.* Bombesin stimulation of c-fos and c-myc gene expression in cultures of Swiss 3T3 cells. *Exp Cell Res*, v. 167, n. 1, p. 276-80, Nov 1986.

PAPERMASTER, D. The birth and death of photoreceptors: the Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 43, n. 5, p. 1300-9, Maio 2002.

PAPERMASTER, D. *et al.* Membrane biosynthesis in the frog retina: opsin transport in the photoreceptor cell. *Biochemistry*, v. 14, n. 7, p. 1343-52, Abr 1975.

PAPERMASTER, D.; DREYER, W. Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods. *Biochemistry*, v. 13, n. 11, p. 2438-44, Maio 1974.

PAPERMASTER, D. *et al.* Vesicular transport of newly synthesized opsin from the Golgi apparatus toward the rod outer segment. Ultrastructural immunocytochemical and autoradiographic evidence in *Xenopus* retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 26, n. 10, p. 1386-404, Out 1985.

_____. Biosynthesis and vectorial transport of opsin on vesicles in retinal rod photoreceptors. *J Histochem Cytochem*, v. 34, n. 1, p. 5-16, Jan 1986.

_____. Immunocytochemical localization of opsin in outer segments and Golgi zones of frog photoreceptor cells. An electron microscope analysis of cross-linked albumin-embedded retinas. *J Cell Biol*, v. 77, n. 1, p. 196-210, Abr 1978.

PARKER, J. *et al.* Human endothelin-1 clearance kinetics revealed by a radiotracer technique. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 289, n. 1, p. 261-5, Abr 1999.

PERNOW, J. *et al.* Comparable potent coronary constrictor effects of endothelin-1 and big endothelin-1 in humans. *Circulation*, v. 94, n. 9, p. 2077-82, Nov 1996.

PETERS, C. *et al.* Endothelin receptor expression in the normal and injured spinal cord: potential involvement in injury-induced ischemia and gliosis. *Exp Neurol*, v. 180, n. 1, p. 1-13, Mar 2003.

PETERS, K. *et al.* Fine structure of a periciliary ridge complex of frog retinal rod cells revealed by ultrahigh resolution scanning electron microscopy. *J Cell Biol*, v. 96, n. 1, p. 265-76, Jan 1983.

PICKART, C.; COHEN, R. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 5, n. 3, p. 177-87, Mar 2004.

PIERCE, K. *et al.* Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 3, n. 9, p. 639-50, Set 2002.

PIUHOLA, J. *et al.* Endothelin-1 and angiotensin II contribute to BNP but not c-fos gene expression response to elevated load in isolated mice hearts. *Biochim Biophys Acta*, v. 1772, n. 3, p. 338-44, Mar 2007.

POLANS, A. *et al.* Recoverin, a photoreceptor-specific calcium-binding protein, is expressed by the tumor of a patient with cancer-associated retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, n. 20, p. 9176-80, Set 1995.

PRINS, B. *et al.* Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, v. 269, n. 16, p. 11938-44, Abr 1994.

PROVENCIO, I. *et al.* Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 1, p. 340-5, Jan 1998.

PURVES, D. *et al.* Sensation and Sensory Processing. *Neuroscience*. Sunderland: Sinauer Associates, 2001. Cap.II. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=rhodopsin&rid=neurosci.figgrp.750>. Acesso em: 14 de Fevereiro de 2009.

RAMANZINI, G. *et al.* Chromatic effects of endothelin family peptides in non-innervated fish, *Synbranchus marmoratus*, melanophores. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*, v. 305, n. 7, p. 551-8, Jul 2006.

RAUH, A. *et al.* Endothelin (ET)-1 and ET-3 promote expression of c-fos and c-jun in human choriocarcinoma via ET(B) receptor-mediated G(i)- and G(q)-pathways and MAP kinase activation. *Br J Pharmacol*, v. 154, n. 1, p. 13-24, Maio 2008.

RAVID, T.; HOCHSTRASSER, M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 9, n. 9, p. 679-90, Set 2008.

REHEMTULLA, A. *et al.* The basic motif-leucine zipper transcription factor Nrl can positively regulate rhodopsin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, n. 1, p. 191-5, Jan 1996.

RIDGE, K.; PALCZEWSKI, K. Visual rhodopsin sees the light: structure and mechanism of G protein signaling. *J Biol Chem*, v. 282, n. 13, p. 9297-301, Mar 2007.

RIEDER, H. *et al.* Sinusoidal endothelial liver cells in vitro release endothelin--augmentation by transforming growth factor beta and Kupffer cell-conditioned media. *Klin Wochenschr*, v. 69, n. 9, p. 387-91, Jun 1991.

ROBIN, P. *et al.* Contribution of PKC-dependent and -independent processes in temporal ERK regulation by ET-1, PDGF, and EGF in rat myometrial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 286, n. 4, p. C798-806, Abr 2004.

ROCA, F. *et al.* Post-transcriptional regulation of cytokine genes in fish: A role for conserved AU-rich elements located in the 3'-untranslated region of their mRNAs. *Mol Immunol*, v. 44, n. 4, p. 472-8, Jan 2007.

RODIECK, R. W. *The First Steps in Seeing*. Sinauer Associates, 1998. 546 p.

RODRIGUEZ-VITA, J. *et al.* Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in

vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, v. 97, n. 2, p. 125-34, Jul 2005.

ROEPMAN, R.; WOLFRUM, U. Protein networks and complexes in photoreceptor cilia. *Subcell Biochem*, v. 43, p. 209-35, 2007.

RUBIN, L. *et al.* Current and future management of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: from diagnosis to treatment responses. *Proc Am Thorac Soc*, v. 3, n. 7, p. 601-7, Set 2006.

SAKURAI, T. *et al.* Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci*, v. 13, n. 3, p. 103-8, Mar 1992.

_____. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, v. 348, n. 6303, p. 732-5, Dez 20-27 1990.

SANTILLO, S. *et al.* Evolving visual pigments: hints from the opsin-based proteins in a phylogenetically old "eyeless" invertebrate. *Biosystems*, v. 86, n. 1-3, p. 3-17, Out-Dez 2006.

SASSONE-CORSI, P. *et al.* fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell*, v. 54, n. 4, p. 553-60, Ago 1988.

SATO, M. *et al.* Direct effects of visible and UVA light on pigment migration in erythrophores of Nile tilapia. *Pigment Cell Res*, v. 17, n. 5, p. 519-24, Out 2004.

SCARPARO, A. *et al.* Expression of endothelin receptors in frog, chicken, mouse and human pigment cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, v. 147, n. 3, p. 640-6, Jul 2007.

SCHIFFRIN, E. State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension*, v. 34, n. 4 Pt 2, p. 876-81, Out 1999.

SCOTT, M. *et al.* Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet

radiation. *Pigment Cell Res*, v. 15, n. 6, p. 433-9, Dez 2002.

SHAW, G.; KAMEN, R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, v. 46, n. 5, p. 659-67, Ago 1986.

SHERBROOKE, W. *et al.* Melanotropic peptides and receptors: an evolutionary perspective in vertebrate physiological color change. In: HADLEY, M. (Ed.). *The Melanotropic Peptides*: CRC Press, 1988. p. 175-90.

SHI-WEN, X. *et al.* Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell*, v. 15, n. 6, p. 2707-19, Jun 2004.

SHRAGA-LEVINE, Z. *et al.* Cyclic GMP formation in rat cerebellar slices is stimulated by endothelins via nitric oxide formation and by sarafotoxins via formation of carbon monoxide. *Biochemistry*, v. 33, n. 49, p. 14656-9, Dez 1994.

SHRAGA-LEVINE, Z.; SOKOLOVSKY, M. cGMP formation in rat atrial slices is ligand and endothelin receptor subtype specific. *Circ Res*, v. 78, n. 3, p. 424-30, Mar 1996.

_____. Functional coupling of G proteins to endothelin receptors is ligand and receptor subtype specific. *Cell Mol Neurobiol*, v. 20, n. 3, p. 305-17, Jun 2000.

SIMONSON, M.; DUNN, M. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J*, v. 4, n. 12, p. 2989-3000, Set 1990.

SIMONSON, M.; HERMAN, W. Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src. *J Biol Chem*, v. 268, n. 13, p. 9347-57, Maio 1993.

SIMONSON, M. *et al.* Differential regulation of fos and jun gene expression and AP-1

cis-element activity by endothelin isopeptides. Possible implications for mitogenic signaling by endothelin. *J Biol Chem*, v. 267, n. 12, p. 8643-9, Abr 1992.

SKOLOVSKY, M. *et al.* Endothelins are more sensitive than sarafotoxins to neutral endopeptidase: possible physiological significance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 87, n. 12, p. 4702-6, Jun 1990.

SOKOLOVSKY, M. Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Trends Biochem Sci*, v. 16, n. 7, p. 261-4, Jul 1991.

_____. Endothelin receptors in rat cerebellum: activation of phosphoinositide hydrolysis is transduced by multiple G-proteins. *Cell Signal*, v. 5, n. 4, p. 473-83, Jul 1993.

SOKOLOVSKY, M. *et al.* Ligand-specific stimulation/inhibition of cAMP formation by a novel endothelin receptor subtype. *Biochemistry*, v. 33, n. 38, p. 11417-9, Set 1994.

SONNENBERG, J. *et al.* Identification of protease 3.4.24.11 as the major atrial natriuretic factor degrading enzyme in the rat kidney. *Peptides*, v. 9, n. 1, p. 173-80, 1988.

STORK, P. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol*, v. 12, n. 6, p. 258-66, 2002.

SU, C. Structural characterization and transcriptional pattern of two types of carp rhodopsin gene. *Comp Biochem Physiol*, v. 125B, n. 1, p. 37-45, 2000.

SUGDEN, P. An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol*, v. 35, n. 8, p. 871-86, Ago 2003.

SUGIYAMA, T. *et al.* Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression and generation of reactive oxygen species in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*,

v. 44 Suppl 1, p. S332-5, Nov 2004.

SUNG, C. *et al.* A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment. *J Neurosci*, v. 14, n. 10, p. 5818-33, Out 1994.

SUZUKI, T. *et al.* Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 191, n. 3, p. 823-30, Mar 1993.

TADA, A. *et al.* Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ*, v. 9, n. 7, p. 575-84, Jul 1998.

TAI, T.; WONG, D. Protein kinase A and protein kinase C signaling pathway interaction in phenylethanolamine N-methyltransferase gene regulation. *J Neurochem*, v. 85, n. 3, p. 816-29, Maio 2003.

TAKASAKI, C. *et al.* Sarafotoxins S6: several isotoxins from *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp) venom that affect the heart. *Toxicon*, v. 26, n. 6, p. 543-8, 1988.

TAKASHIMA, N. *et al.* Gq/11-induced intracellular calcium mobilization mediates Per2 acute induction in Rat-1 fibroblasts. *Genes Cells*, v. 11, n. 9, p. 1039-49, Set 2006.

TAKUWA, N. *et al.* A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, v. 264, n. 14, p. 7856-61, Maio 1989.

TAM, B. *et al.* Identification of an outer segment targeting signal in the COOH terminus of rhodopsin using transgenic *Xenopus laevis*. *J Cell Biol*, v. 151, n. 7, p. 1369-80, Dez 2000.

THIRKILL, C. *et al.* Cancer-associated retinopathy. *Arch Ophthalmol*, v. 105, n. 3, p. 372-5, Mar 1987.

TURNER, A. *et al.* The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays*, v. 23, n. 3, p. 261-9, Mar 2001.

UCHIDA, Y. *et al.* Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. *Eur J Pharmacol*, v. 154, n. 2, p. 227-8, Set 1988.

UEFFING, M. *et al.* Protein kinase C-epsilon associates with the Raf-1 kinase and induces the production of growth factors that stimulate Raf-1 activity. *Oncogene*, v. 15, n. 24, p. 2921-7, Dez 1997.

VALENCIA-SANCHEZ, M. *et al.* Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*, v. 20, n. 5, p. 515-24, Mar 2006.

VAN HARMELEN, V. *et al.* Vascular peptide endothelin-1 links fat accumulation with alterations of visceral adipocyte lipolysis. *Diabetes*, v. 57, n. 2, p. 378-86, Fev 2008.

VENKATESH, B. *et al.* Late changes in spliceosomal introns define clades in vertebrate evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, n. 18, p. 10267-71, Ago 1999.

VIERHAPPER, H. *et al.* Effect of endothelin-1 in man. *Circulation*, v. 81, n. 4, p. 1415-8, Abr 1990.

VON SCHROEDER, H. *et al.* Endothelin-1 promotes osteoprogenitor proliferation and differentiation in fetal rat calvarial cell cultures. *Bone*, v. 33, n. 4, p. 673-84, Out 2003.

WANG, Q. *et al.* QRX, a novel homeobox gene, modulates photoreceptor gene expression. *Hum Mol Genet*, v. 13, n. 10, p. 1025-40, Maio 2004.

WANG, T. *et al.* Functional analysis of the proximal promoter regions of fish rhodopsin and myf-5 genes using transgenesis. *Mar Biotechnol (NY)*, v. 4, n. 3, p. 247-55, Jun 2002.

WANG, X. *et al.* Barrier to autointegration factor interacts with the cone-rod homeobox and represses its transactivation function. *J Biol Chem*, v. 277, n. 45, p. 43288-300, Nov 2002.

WEITZBERG, E. *et al.* Long-lasting vasoconstriction and efficient regional extraction of endothelin-1 in human splanchnic and renal tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 180, n. 3, p. 1298-303, Nov 1991.

WILLIAMS, D. J. *et al.* Sarafotoxin S6c: an agonist which distinguishes between endothelin receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 175, n. 2, p. 556-61, Mar 1991.

WOLF, S. *et al.* Stimulation of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 gene expression by endothelin-1. *Biochem Pharmacol*, v. 71, n. 8, p. 1175-83, Abr 2006.

XU, D. *et al.* ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*, v. 78, n. 3, p. 473-85, Ago 1994.

XU, N. *et al.* Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol Cell Biol*, v. 17, n. 8, p. 4611-21, Ago 1997.

YADA, Y. *et al.* Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J Biol Chem*, v. 266, n. 27, p. 18352-7, Set 1991.

YAGITA, K. *et al.* Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*, v. 292, n. 5515, p. 278-81, Abr 2001.

YAMAZAKI, T. *et al.* Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*, v. 271, n. 6, p. 3221-8, Fev 1996.

YANAGISAWA, M. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, v. 332, n. 6163, p. 411-5, Mar 1988.

YOGI, A. *et al.* Endothelin-1, but not Ang II, activates MAP kinases through c-Src independent Ras-Raf dependent pathways in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 27, n. 9, p. 1960-7, Set 2007.

YOHN, J. *et al.* Cultured human keratinocytes synthesize and secrete endothelin-1. *J Invest Dermatol*, v. 100, n. 1, p. 23-6, Jan 1993.

YOKOKAWA, K. *et al.* Heparin regulates endothelin production through endothelium-derived nitric oxide in human endothelial cells. *J Clin Invest*, v. 92, n. 4, p. 2080-5, Out 1993.

YOKOYAMA, S. Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Prog Retin Eye Res*, v. 19, n. 4, p. 385-419, Jul 2000.

YOUNG, R. Visual cells and the concept of renewal. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v. 15, n. 9, p. 700-25, Set 1976.

YOUNG, R.; DROZ, B. The renewal of protein in retinal rods and cones. *J Cell Biol*, v. 39, n. 1, p. 169-84, Out 1968.

ZACK, D. *et al.* Unusual topography of bovine rhodopsin promoter-lacZ fusion gene expression in transgenic mouse retinas. *Neuron*, v. 6, n. 2, p. 187-99, Fev 1991.

ZARATIEGUI, M. *et al.* Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell*, v. 128, n. 4, p. 763-76, Fev 2007.

ZHANG, T. *et al.* The regulation of retina specific expression of rhodopsin gene in vertebrates. *Gene*, v. 313, p. 189-200, Ago 2003.