

Maria Nathália de Carvalho Magalhães Moraes

Efeito da endotelina sobre a expressão gênica das melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) e do receptor de endotelina, subtipo ET_C , em melanóforo de *Xenopus laevis*

Effect of endothelin on the gene expression of melanopsins (*Opn4x* and *Opn4m*) and endothelin receptor subtype ET_C in melanophores of *Xenopus laevis*.

São Paulo

2010

Maria Nathália de Carvalho Magalhães Moraes

Efeito da endotelina sobre a expressão gênica das melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) e do receptor de endotelina, subtipo ET_C , em melanóforo de *Xenopus laevis*

Effect of endothelin on the gene expression of melanopsins (*Opn4x* and *Opn4m*) and endothelin receptor subtype ET_C in melanophores of *Xenopus laevis*.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci

São Paulo
2010

*Dedico a minha mãe, meu amor,
meu exemplo, minha inspiração!
Que me apresentou o caminho do
saber e me mostrou na vida o
valor maior de “ser” e
“conhecer”, antes de “ter”.*

*“... olhando todos os homens como irmão, sem acepção de raças, de castas, nem de seitas, perdoando aos seus inimigos, retribuindo o mal com o bem, a exemplo do divino modelo”
(KARDEC, 1868)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelas inúmeras oportunidades que colocou em meu caminho.

À minha mãe, meu maior exemplo de vida, minha guerreira, mulher forte, decidida, doce e encantadora. Ensinou-me tudo que eu deveria aprender para conseguir ir em frente sem medo, me amou sem limites e tornou possíveis os meus sonhos. Te amo Susu, você é tudo na minha vida!

À minha vó que sempre esteve ao meu lado, e junto de minha mãe me ensinou o valor da vida. A minha irmã Ana, que sempre esteve presente em todos os momentos de minha vida, nos felizes e nos tristes, dividindo todos os sentimentos. Apoiando meus acertos, e tentando entender as loucuras, e que sempre acreditou em mim. À minha querida família!

À professora Doutora Ana Maria de Lauro Castrucci pela orientação, pelos ensinamentos e pela oportunidade de tornar possível meu trabalho. À Ana, “mãe” paulistana que ganhei, pela amizade, infinita preocupação, pelas conversas, por ter me acolhido e me ajudado intensamente quando precisei.

In memoriam ao professor Doutor Rafael Martins-Neto que me apoiou e incentivou na busca pela pós-graduação. Que com sua amizade e carinho me mostrou que nem todos os caminhos são fáceis de serem percorridos, mas que sempre vale a pena tentar e

lutar pelo que queremos. Meu querido Rafa, você foi muito importante! Continue sempre olhando por nós. Obrigada por tudo!

Ao professor Doutor José Cipolla Neto pela colaboração com nosso laboratório.

Ao Léo, que com muita paciência e atenção me ensinou as técnicas necessárias para desenvolver meu trabalho e me incentivou a participar ativamente das atividades do departamento. Obrigada Léo, tudo foi importante!

À Luciane companheira de experimentos, obrigada pela amizade, pela companhia madrugadas a fora e pelas infinitas conversas. À Maristela, que chegou há pouco tempo mas conquistou um enorme lugar no coração. Que contribuiu pro meu crescimento profissional e pessoal. A todos os colegas e amigos de laboratório: Thiago, Jennifer, Bruno, Gláucia e Márcio pelo prazeroso convívio.

Aos anjos Beatriz (Bee) e Tia Aní, que Deus enviou para fazerem parte de minha vida. Obrigada por todo carinho, amor e preocupação. Vocês são mais que especiais, amo!!

Aos amigos que conquistei ao longo desses dois anos e que tornaram meus dias mais felizes: Camila Queiroz, Camila Petrílli, Claudinha, Leopoldo, Maísa, Marco, Patrícia, vocês foram incríveis, cada um a sua maneira! Amo vocês!

Aos amigos de anos e que mesmo de longe sempre me apoiaram e acreditaram em mim: Carolzinha, Daniellê, Eduardo, Karina, Luciana, João Victor, Michelle, Sônia. Apesar da distância sempre tive vocês no coração! Kelly, que sempre esteve presente em todos os momentos, dividindo as alegrias e tristezas, amiga de todas as horas.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia (IB-USP) pelos diversos auxílios e pela agradável convivência.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste projeto.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. Ritmos biológicos.....	1
1.1. Características gerais	1
1.2. Classificação dos ritmos.....	3
1.3. Mecanismos de controle do relógio biológico	3
2. Regulação neuro-humoral de genes do relógio periférico	7
3. Melanopsina.....	9
4. Endotelinas.....	13
4.1. Características gerais	13
4.2. Biossíntese, receptores e via de sinalização.....	15
5. Pigmentação nos animais.....	18
5.1. Características gerais da mudança de cor nos animais	18
5.2. Hormônios reguladores da pigmentação	22
5.3. Endotelinas e mudança de cor em vertebrados ectotérmicos.....	24
5.4. Endotelinas e células pigmentares de mamíferos.....	26
OBJETIVOS	32
1. Geral	32
2. Específico	32
MATERIAL E MÉTODOS	34
1. Cultura de células	34
2. Verificação do padrão temporal de expressão de (<i>Opn4x</i> e <i>Opn4m</i>) e do receptor de endotelina subtipo ET_C em melanóforos de <i>Xenopus laevis</i>	35
2.1. Protocolo de expressão de melanopsinas (<i>Opn4x</i> e <i>Opn4m</i>) e do receptor de endotelina subtipo ET_C em melanóforos de <i>Xenopus laevis</i> mantidos em escuro constante	36
2.2. Protocolo de expressão de melanopsinas (<i>Opn4x</i> e <i>Opn4m</i>) e do receptor de endotelina subtipo ET_C em melanóforos de <i>Xenopus laevis</i> mantidos em fotoperíodo 12C:12E	37

2.3. Protocolo de expressão de melanopsinas (<i>Opn4x</i> e <i>Opn4m</i>) e do receptor de endotelina subtipo <i>ET_C</i> em melanóforos de <i>Xenopus laevis</i> mantidos em escuro constante e tratados com endotelina	38
2.4. Protocolo de expressão de melanopsinas (<i>Opn4x</i> e <i>Opn4m</i>), receptor de endotelina subtipo <i>ET_C</i> em melanóforos de <i>Xenopus laevis</i> mantidos em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina	39
3. Extração de RNA total.....	41
4. RT-PCR (<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>)	42
5. PCR quantitativo.....	43
6. Análise dos resultados.....	46
RESULTADOS	50
Expressão gênica	50
1. Quantificação dos níveis de RNAm das melanopsinas (<i>Opn4m</i> e <i>Opn4x</i>) e do receptor de endotelina em resposta ao ciclo claro-escuro	50
1.1. <i>ET_C</i>	50
1.2. <i>Opn4m</i>	53
1.3. <i>Opn4x</i>	56
2. Quantificação dos níveis de RNAm das melanopsinas (<i>Opn4m</i> e <i>Opn4x</i>) e do receptor de endotelina em resposta a endotelina	59
2.1. <i>ET_C</i>	59
2.2. <i>Opn4m</i>	72
2.3. <i>Opn4x</i>	85
DISCUSSÃO	102
RESUMO	115
ABSTRACT	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 - Vias de sinalização intracelular participantes da estimulação da proliferação e melanogênese em melanócitos humanos (Modificado de IMOKAWA *et al.*, 1997). 29
- Figura 2 – Protocolo experimental: melanóforos de *Xenopus laevis* mantidos em escuro constante e sem adição de hormônio..... 36
- Figura 3 - Protocolo experimental: melanóforos de *Xenopus laevis* mantidos em fotoperíodo 12C:12E e sem adição de hormônio..... 37
- Figura 4 - Protocolo experimental: melanóforos de *Xenopus laevis* mantidos em escuro constante e tratados com endotelina. 39
- Figura 5 - Protocolo experimental: melanóforos de *Xenopus laevis* mantidos em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina. 40
- Figura 6 - PCR quantitativo para receptor de endotelina subtipo ET_C em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias antes do início da extração do RNA total, e não foram submetidas a troca de meio durante esse período. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene ET_C normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$). 51
- Figura 7 - PCR quantitativo para receptor de endotelina subtipo ET_C em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias antes do início da extração do RNA total, e não foram submetidas a troca de meio durante esse período. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene ET_C normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$). 52
- Figura 8 - PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias antes do início da extração do RNA total, e não foram submetidas a troca de meio durante esse período. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p = 0,0410$). 54
- Figura 9 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E

por 5 dias antes do início da extração do RNA total, e não foram submetidas a troca de meio durante esse período. Valores são a média \pm EPM (n=8) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0140$). 55

Figura 10 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias antes do início da extração do RNA total, e não foram submetidas a troca de meio durante esse período. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0376$). 57

Figura 11 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias antes do início da extração do RNA total, e não foram submetidas a troca de meio durante esse período. Valores são a média \pm EPM (n=8) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0251$). 58

Figura 12 – PCR quantitativo para *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início do sexto dia às 8 horas (ZT0) e uma segunda troca de meio após 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=8) do gene *ET_C* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0492$). 61

Figura 13 – PCR quantitativo para *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início da fase clara do 6º dia e uma segunda troca de meio após 6h. Valores são a média \pm EPM (n=8) do gene *ET_C* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0012$)..... 62

Figura 14 – PCR quantitativo para *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10^{-9} M por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=8) do gene *ET_C*

normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0005$). 64

Figura 15 – PCR quantitativo para ET_C em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 $10^{-8}M$ por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=6) do gene ET_C normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tempos. 65

Figura 16 – PCR quantitativo para ET_C em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina. As células permaneceram em regime de 12C:12E por 5 dias. No início da fase clara do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 $10^{-9}M$ por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=8) do gene ET_C normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tempos..... 66

Figura 17 – PCR quantitativo para ET_C em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina. As células permaneceram em regime de 12C:12E por 5 dias. No início da fase clara do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 $10^{-8}M$ por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=8) do gene ET_C normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tempos..... 67

Figura 18 – PCR quantitativo para ET_C em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina $10^{-9}M$. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina $10^{-9}M$ no início do 6º dia (ZT0, as 8 horas) por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=8-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene ET_C normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste t de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p<0,05$ 68

Figura 19 – PCR quantitativo para ET_C em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina $10^{-8}M$. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina $10^{-8}M$ no início do 6º dia (ZT0, as 8 horas) por 6 horas. Ao final

do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=8) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *ET_C* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%..... 69

Figura 20 – PCR quantitativo para *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-9} M. As células permaneceram em 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina 10^{-9} M no início da fase clara do 6º dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=8) do no grupo controle e (n=4) no grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *ET_C* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$ 70

Figura 21 – PCR quantitativo para *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-8} M. As células permaneceram em 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-8} M no início da fase clara do 6º dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=8) do no grupo controle e (n=4) no grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *ET_C* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$ 71

Figura 22 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início do 6º dia às 8 horas (ZT0) e uma segunda troca de meio após 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p = 0,0001$). 73

Figura 23 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em regime de fotoperíodo 12C:12E. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início da fase clara do 6º dia às 8 horas (ZT0) e uma segunda troca de meio após 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%.

Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0001$)..... 74

Figura 24 – Ajuste de curva pelo software COSANA da expressão temporal de *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis*. As células foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início da fase clara do 6º dia e uma segunda troca de meio após 6 horas. Análise por COSANA mostrou um padrão circadiano na expressão de *Opn4m*, probabilidade de ritmo circadiano de $R=92,82\%$ e $p=0,019$, para período de 21 horas..... 75

Figura 25– PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 $10^{-9}M$ por 6 horas. Valores são a média \pm EPM ($n=6$) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,005$)..... 76

Figura 26 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 $10^{-8}M$ por 6 horas. Valores são a média \pm EPM ($n=4$) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0368$)..... 77

Figura 27 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em regime de fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina $10^{-9}M$. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias. No início da fase clara do 6º dia, ZT0, as células foram tratadas com ET-3 $10^{-9}M$ por 6 horas. Valores são a média \pm EPM ($n=4$) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0260$). 79

Figura 28 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em regime de fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina $10^{-8}M$. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias. No início da fase clara do 6º dia, ZT0, as células foram tratadas com ET-3 $10^{-8}M$ por 6 horas. Valores são a média \pm EPM ($n=4$) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tempos ($p>0,05$). 80

Figura 29 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina 10^{-9} M. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-9} M no início do 6° dia (ZT0) por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=6) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$ 81

Figura 30 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina 10^{-8} M. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-8} M no início do 6° dia (ZT0) por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$ 82

Figura 31 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-9} M. As células permaneceram em 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-9} M no início da fase clara do 6° dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$ 83

Figura 32 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-8} M. As células permaneceram em 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-8} M no início da fase clara do 6° dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por

teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$ 84

Figura 33 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início do 6º dia às 8 horas (ZT0) e uma segunda troca de meio após 6 horas. Valores são a média \pm EPM ($n=10-12$) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0001$). 85

Figura 34 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início da fase clara do 6º dia às 8 horas (ZT0) e uma segunda troca de meio após 6 horas. Valores são a média \pm EPM ($n=10-12$) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0012$). 87

Figura 35 – Ajuste de curva pelo software COSANA da expressão temporal de *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis*. As células foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início da fase clara do 6º dia e uma segunda troca de meio após 6 horas. Análise por COSANA mostrou um padrão circadiano na expressão de *Opn4x*, probabilidade de ritmo circadiano de $R=99,05\%$ e $p=0,001$, para período de 25 horas. 88

Figura 36 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina $10^{-9}M$. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 $10^{-9}M$ por 6 horas. Valores são a média \pm EPM ($n=6$) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0035$). 90

Figura 37 – Ajuste de curva pelo software COSANA da expressão temporal de *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis*. As células foram mantidas em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 $10^{-9}M$ no início do 6º dia por 6 horas. Análise por COSANA mostrou um padrão circadiano na expressão de *Opn4x*, probabilidade de ritmo circadiano de $R=89,57\%$ e $p=0,034$, para período de 20 horas. 91

Figura 38 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina 10^{-8} M. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10^{-8} M por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0069$)..... 92

Figura 39 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-9} M. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10^{-9} M por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0325$)..... 94

Figura 40 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-8} M. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias. No início da fase clara do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10^{-8} M por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0205$). 94

Figura 41 – Ajuste de curva pelo software COSANA da expressão temporal de *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis*. As células foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-8} M no início da fase clara do 6º dia. A análise por COSANA não mostrou probabilidade de ritmo circadiano, com $R=3,60\%$ com $p=0,947$, mas foi possível evidenciar um ritmo ultradiano, com $R= 92,64\%$ e $p=0,02$, com período de 11 horas..... 96

Figura 42 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina 10^{-9} M. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-9} M no início do 6º dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=6) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4x* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p<0,05$ 97

Figura 43 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina 10^{-8} M. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-8} M no início do 6º dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4x* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$ 98

Figura 44 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-9} M. As células permaneceram em 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-9} M no início da fase clara do 6º dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4x* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$ 99

Figura 45 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-8} M. As células permaneceram em 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-8} M no início da fase clara do 6º dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$ 100

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I. Seqüências de <i>primers</i> e sondas para PCR quantitativo.....	43
---	----

Introdução

INTRODUÇÃO

1. Ritmos biológicos

1.1. Características gerais

Os seres vivos, desde organismos unicelulares até vertebrados, estão estruturados no tempo e no espaço, podendo distinguir entre o tempo linear e o tempo cíclico (EDMUNDS, 1983). Os ritmos são evidentes na maioria dos seres vivos: floração das plantas, ciclos de atividade e repouso nos animais, batimentos cardíacos e muitos outros. Quando se observam os diversos ambientes, pode-se igualmente detectar suas características cíclicas, muito bem definidas. Assim, se o ambiente oscila, uma espécie para adaptar-se a ele precisa oscilar também e a adaptação temporal consiste na harmonização entre a ritmicidade biológica e os ciclos ambientais (MARQUES *et al.*, 2003). Um ritmo é então definido como um processo que varia periodicamente no tempo, a manifestação de um fenômeno que se repete com o mesmo período, sendo o período, o intervalo de tempo com que um ciclo se completa.

Muitos dos parâmetros metabólicos, fisiológicos e comportamentais exibidos pelos organismos apresentam variações ao longo do dia, e a maioria desses ritmos persiste em condições constantes apresentando um período de 24 horas aproximadamente, caracterizando o que conhecemos como ritmos circadianos. Ritmos

circadianos são características marcantes encontradas nos seres vivos, pois representam manifestações evidentes de adaptação. A ubiquidade da manifestação desses ritmos nos diferentes tipos de organização e a dependência de mecanismos de temporização para a viabilidade das espécies demonstra a importância da organização temporal nos seres vivos, e implica, portanto, em considerar o tempo como uma dimensão fundamental para as formas de vida (CEREJIDO, 1983).

Todas as alterações rítmicas são determinantes para a sobrevivência da espécie uma vez que elas prevêm que os ajustes internos coincidam com a fase mais propícia do ciclo ambiental, permitindo aos organismos a capacidade de sincronizar esses eventos internos com os ciclos ambientais (TUREK, 1988). Exemplos de ritmos circadianos incluem oscilações nas concentrações de vários hormônios, de modo que sua produção ou liberação ocorra em uma hora determinada do dia (PITTENDRIGH, 1960).

Os sinais fornecidos pelo ambiente para que os organismos ajustem seus ritmos são chamados de *zeitgebers* (doador do tempo em alemão). Muitos ritmos biológicos são claramente associados ao ciclo claro-escuro, sendo este ciclo de grande importância para as espécies que possuem algum tipo de pigmento fotossensível (MARQUES *et al.*, 2003). As flutuações diárias e sazonais de intensidade luminosa e de temperatura são fatores que sincronizam

os relógios biológicos internos. Os relógios biológicos responsáveis pelo controle temporal interno estão codificados no DNA (HALL & ROSBASH, 1987).

1.2. Classificação dos ritmos

Como dito anteriormente, muitos ritmos biológicos são associados a um ciclo geofísico, sendo o ciclo claro-escuro o mais evidente. Os ritmos biológicos associados ao ciclo claro-escuro são conhecidos como ritmos circadianos, cujo período varia de 20 a 28 horas de acordo com a espécie. Os ritmos não circadianos são agrupados em: infradianos, ritmos de baixa frequência, com períodos maiores que 28 horas, e ultradianos, oscilações de batimento rápido, com períodos menores que 20 horas.

1.3. Mecanismos de controle do relógio biológico

Para que o sistema funcione de forma adequada, há a necessidade de um marca-passo ou relógio que, por sua vez, precisa de um sistema de entrada e saída que forneça um sinal de forma rítmica. O marca-passo, junto com os sistemas de entrada e saída, constitui o sistema circadiano. Nos mamíferos, o sinal ocular surge de uma pequena população de células ganglionares que se projeta, via trato retino-hipotalâmico para o núcleo supraquiasmático, NSQ (MOORE *et al.*, 1995). Os olhos, NSQ e o órgão pineal são

componentes chave do sistema circadiano em vertebrados (COLLIN *et al.*, 1989; TAKAHASHI, 1995).

O relógio endógeno encontrado no NSQ dos mamíferos é formado pelo acoplamento das oscilações fisiológicas espontâneas de seus neurônios. O mecanismo responsável pelas oscilações espontâneas de cada neurônio do NSQ, por sua vez, é formado por um mecanismo molecular que consiste de duas alças de retroalimentação de controle de expressão gênica interligadas, uma negativa e a outra positiva (REPERT & WEAVER, 2001).

O funcionamento do relógio circadiano envolve mecanismos de retroalimentação positiva e negativa. Na primeira alça, estão os elementos da família de fatores de transcrição que apresentam o domínio bHLH-PAS (do inglês, *basic helix-loop-helix, Period-ARNT-Single-minded*) – *CLOCK* e *BMAL1*. Estas duas proteínas formam um heterodímero capaz de se ligar a promotores gênicos que contenham uma sequência E-box, funcionando como fator de transcrição para a expressão dos genes *Per* (period), *Cry* (cryptochrome) e o receptor órfão *Rev-Erb*.

O *feedback* negativo é realizado pelo heterodímero *PER:CRY* que se transloca ao núcleo e, após atingir determinada concentração, bloqueia sua própria transcrição ao interagir com o heterodímero *CLOCK:BMAL*, evitando então que esses últimos ativem mais transcrições gênicas. Como consequência, os níveis de RNAm e de

proteína de PER e CRY vão decrescendo até o ponto em que se tornam insuficientes para reprimir a atividade de *CLOCK:BMAL1*, reiniciando um novo ciclo (ALBRECHT & EICHELE, 2003).

Além disso, *CLOCK:BMAL1* inicia outra alça de *feedback*, ativando a transcrição de *Rev-erba* e *Rora*, cujas proteínas competem entre si pela ligação ao elemento responsivo ao ROR (ROREs) presente no promotor de *Bmal1*, onde terão ações antagônicas: ROR ativa a transcrição de *Bmal1* enquanto que REV-ERB a inibe (KO & TAKAHASHI, 2006). Todos esses ciclos em conjunto levam cerca de 24 horas para se completarem e a concentração dessas diferentes proteínas nas diferentes fases do dia é o que constitui a base molecular do relógio biológico. A proteína responsável pela sincronização ao ciclo claro-escuro ambiental no caso dos mamíferos parece ser a PER, pois os níveis de seu RNAm aumentam rapidamente após um pulso de luz, enquanto os outros componentes não são alterados (FIELD *et al.*, 2000). Assim, o ajuste diário do relógio é dado pelo aumento da transcrição de *Per* induzido pela luz. A proteína PER mantém-se em constante vaivém entre o núcleo e o citoplasma. Após sofrer hiperfosforilação pela ação da caseína quinase I (CKI), a estabilidade de PER diminui. Então ocorre sua degradação no citoplasma, enquanto CRY liga-se à PER no núcleo, impedindo sua saída, o que leva ao bloqueio de *CLOCK/BMAL1*, resultando no fim da transcrição de *Per* e *Cry*. Quando muita proteína

PER é degradada no citoplasma, a concentração de PER no núcleo torna-se muito baixa para manter a retroalimentação, levando ao início de um novo ciclo (ALBRECHT & EICHELE, 2003).

Em contraste com as informações já conhecidas sobre o NSQ, os relógios periféricos vêm sendo menos estudados, mas é sabido que ocorrem de peixes a mamíferos. A ritmicidade de expressão de genes de relógio em tecidos periféricos já foi observada em coração, rim e em linhagens celulares embrionárias de *Danio rerio* (WHITMORE *et al.*, 2000), e hepatócitos de camundongos (KORNMAN *et al.*, 2007). Estudos da região promotora do gene *Per* de *Drosophila* e de *Danio rerio* através de sondas bioluminescentes mostraram que existem osciladores periféricos independentes em diferentes tecidos desses organismos (WHITMORE *et al.*, 2000). A partir desses estudos, diversos outros laboratórios demonstraram a independência dos osciladores periféricos, os quais provavelmente devem conter elementos sincronizadores próprios. A expressão rítmica de genes de relógio foi encontrada mesmo em linhagens de células imortalizadas de mamíferos (BALSALOBRE *et al.*, 1998). Postulou-se, então, que osciladores periféricos de mamíferos dependem de sinais sincronizadores neurais ou humorais do oscilador dos NSQs para manter a homeostase do organismo (YAMAZAKI *et al.*, 2000), ao contrário do que ocorre em tecidos periféricos de *Drosophila* e *Danio*, fotossensíveis e capazes de se sincronizarem até mesmo quando

isolados (WHITMORE *et al.*, 2000). As primeiras evidências de que os relógios periféricos podem ser sincronizados por sinais humorais (choque de soro) surgiram junto com a descoberta de que culturas de fibroblastos de mamíferos expressam genes de relógio de forma rítmica (BALSALOBRE *et al.*, 1998).

2. Regulação neuro-humoral de genes do relógio periférico

Estudos em linhagens celulares fotossensíveis de *Danio rerio* (*zebrafish*) revelaram que estímulos luminosos são capazes de regular a transcrição de genes de relógio de forma fase-dependente (CARR & WHITMORE, 2005). Nestes estudos, os autores não conseguiram identificar qual, ou quais os fotorreceptores responsáveis por este efeito biológico.

Estudos de nosso laboratório revelaram que células da linhagem embrionária ZEM-2S de *Danio rerio* expressam tanto *Opn4x* como *Opn4m*, além de seis genes *Cry*. Quando submetidas a regime fotoperiódico de 12C:12E, essas células apresentam ritmos circadianos robustos na expressão de *Per1* e *Cry1b*, indicando que a presença de um fotorreceptor é capaz de sincronizar a expressão de genes de relógio neste modelo celular. Neste mesmo estudo foi analisada também a modulação desses genes por endotelina-1. Foi observada uma forte ativação da expressão de *Opn4x* nestas células, tratadas com endotelina-1 10^{-10} e 10^{-11} M, enquanto que em maiores

concentrações (10^{-8} e 10^{-9} M) houve inibição da expressão de *Opn4x* na maioria dos ZTs analisados. O tratamento com ET-1 10^{-11} M demonstrou uma capacidade em promover uma mudança de fase, estabelecendo um padrão de oscilação circadiana para *Opn4x*, enquanto que com as outras concentrações utilizadas não foi possível observar nenhuma oscilação significativa. A expressão de *Clock* foi aumentada em alguns ZTs em alguns tratamentos com endotelina, mas não com 10^{-8} M de ET-1. Nessas células, altas concentrações de endotelina-1 exerceram um efeito inibitório na expressão de *Per1* e *Cry1b* durante o período de luz, mas não no período de escuro, sem afetar sua oscilação circadiana (FARHAT *et al.*, 2010).

Ainda, em outro estudo em nosso laboratório, mostramos que células da retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E apresentam padrões rítmicos de transcrição para *Clock*, *Per2*, *Opn4m*, *N-Acetiltransferase* e *Tirosina Hidroxilase*. E que o tratamento com glutamato 100uM em escuro constante induz ritmo em *Clock*, e inibe drasticamente a expressão de *Tirosina Hidroxilase*. Dessa forma, foi demonstrado que as células de retina de embrião de 8 dias de galinha em cultura já contêm um relógio funcional, o qual necessita do ciclo claro-escuro ou de glutamato para sua sincronização (LIMA *et al.*, 2010).

3. Melanopsina

O ajuste entre o meio ambiente e o relógio biológico circadiano é feito através de via neural. No caso dos mamíferos, incluindo o homem, a principal oscilação ambiental percebida pelo relógio é a alternância claro-escuro. Existe uma via retino-hipotalâmica que informa os NSQs sobre tais alternâncias (ROLLAG *et al.*, 2003).

A melanopsina foi descoberta a partir da pesquisa de mecanismos de migração de grânulos de pigmento em cultura de melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis* em resposta à luz, ao final da década de 90 pelos pesquisadores Ignacio Provencio e Mark Rollag (PROVENCIO *et al.*, 1998). Desde então sequências relacionadas têm sido identificadas, sendo a melanopsina expressa na retina em todas as classes de vertebrados examinados até o momento (BELLINGHAM *et al.*, 2002; HANNIBAL *et al.*, 2001).

A fotorrecepção visual, em mamíferos, é feita na retina através de células especializadas, conhecidas como cones e bastonetes, que são capazes de traduzir o sinal luminoso em um sinal químico e com isso iniciar alterações elétricas no nervo óptico (GUYTON & HALL, 2002). O pigmento visual encontrado nos bastonetes é chamado de rodopsina, que é constituída pelo aldeído da vitamina A, 11- cis- retinal, ligado a uma proteína. Os cones possuem pigmentos visuais formados por 11- cis- retinal e uma opsina que pode assumir diferentes conformações isoméricas e, assim, conferir ao cone a

capacidade de absorver diferentes comprimentos de onda de luz (BALDO, 2007). Assim como as opsinas dos cones e bastonetes, a melanopsina de mamíferos absorve luz também através de retinaldeído, no entanto, diferentemente dos fotorreceptores visuais, sinaliza através de proteína Gq (ISOLDI *et al.*, 2005; KUMBALASIRI *et al.*, 2006; BELLINGHAM *et al.*, 2006).

Estudos anteriores à descoberta da melanopsina tinham como objetivo compreender o mecanismo da percepção luminosa através do sistema circadiano de mamíferos. O fato de a luz depender de fotorreceptores oculares para entrar no sistema circadiano dos mamíferos (YAMAZAKI *et al.*, 2000), e da presença de uma pequena população de células ganglionares contendo melanopsina, e sendo intrinsecamente fotossensível (BERSON *et al.*, 2002) sugeriu que a melanopsina poderia estar envolvida na percepção da iluminação pelo sistema circadiano. Utilizando camundongos *knock out* para melanopsina e *rdrd*, foi demonstrado que a melanopsina é essencial para o ajuste do relógio aos ciclos de claro-escuro (PANDA *et al.*, 2002, 2003). Dessa forma, além dos cones e bastonetes, as células ganglionares da retina (RGCs) enviam a informação luminosa capturada através da melanopsina para os NSQs, onde liberam glutamato e o neuropeptídeo ativador da adenil ciclase da pituitária (PACAP) (HANNIBAL *et al.*, 2001).

Em melanóforos de *Xenopus leavis*, a ativação da melanopsina por luz é máxima em um comprimento de onda de 470 nm, e inicia uma cascata de eventos que resulta na liberação de cálcio e IP₃, e na ativação de PKC β . Em última instância, leva ao aumento de GMPc (ISOLDI *et al.*, 2005).

A luz é um potente regulador de muitos processos fisiológicos em vertebrados, como a sincronização de ritmos circadianos para ciclos de 24h, além dos ritmos sazonais de reprodução que são fortemente influenciados pela luz ambiental. Entre os vertebrados não mamíferos, muitos desses processos persistem mesmo na ausência dos olhos (GROOS, 1982). Essa descoberta indica que muitos efeitos da luz são mediados através de fotorreceptores extra-oculares. Vários tecidos extra-oculares em vertebrados não mamíferos são diretamente fotossensíveis em cultura. Esses tecidos incluem a pineal (DEGUCHI, 1979), a íris (BARR & ALPEN 1963) e melanóforos dérmicos (SELDENRIJK *et al.*, 1979). A melanopsina está localizada em muitos desses tecidos extra-retinianos de anfíbios, incluindo melanóforos dérmicos, núcleos profundos fotorreceptores do cérebro e íris (PROVENCIO *et al.*, 1998).

Segundo BELLINGHAM & FOSTER (2002), membros de uma mesma família de opsinas apresentam 85% de semelhança em sua seqüência de aminoácidos, sendo assim, o fato da seqüência de aminoácidos dos domínios transmembrânicos da melanopsina de

camundongo ser apenas 58% idêntica à seqüência de *Xenopus*, e a de *Danio rerio* 68% idêntica à de camundongo e 56% idêntica à de *Xenopus* tornou-se um fato notável.

Levando em consideração essas informações estruturais da melanopsina, BELLINGHAM e colaboradores levantaram a hipótese de haver mais de um gene para essa opsina presente nas diferentes classes de vertebrados. Em 2006, foram identificados novos genes de melanopsina em galinhas, peixes ósseos e *Xenopus*. Essas seqüências revelam a existência de dois genes de melanopsina bastante distintos em diversos vertebrados não-mamíferos. Um desses genes, chamado de *Opn4m* (*mammal-like*) representa o verdadeiro ortólogo da melanopsina de mamíferos. As seqüências de melanopsinas de não-mamíferos são, na verdade, representantes de um gene diferente, *Opn4x* (*Xenopus-like*). Curiosamente, esse gene *Opn4x* não aparece no genoma dos mamíferos. Comparações realizadas entre as seqüências de aminoácidos das melanopsinas mostraram que a semelhança das seqüências entre as diferentes espécies analisadas era muito menor, aproximadamente 55%, quando comparada à de famílias de opsinas mais tradicionais como as encontradas em cones e bastonetes (85% de semelhança entre rodopsinas de humanos e *Xenopus*) (BELLINGHAM *et al.*, 2006). Confirmamos em nosso laboratório que tanto *Opn4x*, quanto *Opn4m* são expressos em melanóforos dérmicos de *X. laevis*.

A presença de dois distintos genes de melanopsina em três classes de vertebrados distintas sugere que essa divergência ocorreu cedo durante a evolução dos vertebrados, antes mesmo da emergência de vertebrados terrestres. Análises genômicas da sequência de *Opn4x* de galinhas com o locus *Opn4* de mamíferos não conseguiu identificar o gene *Opn4x* em nenhum membro dessa classe. Para investigar essa aparente falta de um ortólogo *Opn4x* em mamíferos, BELLINGHAM e colaboradores (2006) decidiram determinar uma detalhada localização genômica para *Opn4x* em galinhas para comparar com regiões homólogas do genoma humano. As análises revelaram diversas regiões que são homólogas com porções do cromossomo 4 de galinhas adjacente ao locus da *Opn4x*, no entanto, sua ordem foi alterada, indicando um significativo rearranjo intracromossômico nesta região. Estes dados sugerem que o locus ancestral *Opn4x* dos mamíferos tenha sido apagado durante essa reorganização cromossômica.

4. Endotelinas

4.1. Características gerais

Endotelinas (ET) são potentes peptídeos vasoconstritores, inicialmente isolados e identificados em cultura de células endoteliais de aorta porcina, sendo constituídos por 21 resíduos de aminoácidos (YANAGISAWA *et al.*, 1988).

Foram clonados três genes humanos distintos, endotelina-1 (ET-1) clássica, endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). Endotelina-2 e 3 diferem da endotelina-1 em 2 e 6 aminoácidos, respectivamente (BLOCH *et al.*, 1989, YANAGISAWA & MASAKI, 1989). Embora os três genes sejam relativamente distantes do ponto de vista evolutivo, certamente são provenientes de um ancestral comum, tendo estado sob forte pressão evolutiva para preservar tais sequências maduras de ETs (INOUE *et al.*, 1989). Neste mesmo estudo, foram demonstradas as diferenças estruturais e farmacológicas das três isoformas de endotelina humana, onde ET-1 exibe maior atividade constritora que ET-3 tanto *in vivo* quanto *in vitro*, ao passo que ET-3 exerce uma resposta depressora mais acentuada *in vivo*. Essas constatações levaram a hipótese de que estes peptídeos podem desempenhar papéis fisiológicos diferenciais, possivelmente por interagir com diferentes subtipos de receptores para endotelina.

Inicialmente acreditava-se que apenas as células endoteliais vasculares produzissem endotelina-1, no entanto atualmente sabe-se que ETs, em geral, podem ser sintetizadas por diversos outros tecidos incluindo, por exemplo, no homem, as células da musculatura lisa vascular, os queratinócitos, os macrófagos, as glândulas mamárias, a placenta, o endométrio, o sistema nervoso central e algumas glândulas endócrinas (RUBANYI & POLOKOFF, 1994). Da mesma forma como os locais de secreção, também são diversas as funções

desse hormônio, como aumento da proliferação de diferentes tipos celulares de mamíferos, controle da pressão sistêmica, da distribuição local de sangue, tônus da musculatura lisa das vias aéreas, formação e composição da urina, liberação de hormônios circulantes, função parcial de órgãos como rim, coração, adrenal, trato gastrointestinal e alguns órgãos que compõem o sistema nervoso central (BLOCH *et al.*, 1989).

Endotelinas são importantes também sob o ponto de vista patofisiológico. Várias espécies, incluindo o homem, apresentam quantidades significantes de endotelina plasmática (SAITO *et al.*, 1989), a qual varia na faixa de picomolar em indivíduos saudáveis, podendo aumentar de 2 a 30 vezes em várias condições patofisiológicas (MASAKI *et al.*, 1992). Altos níveis circulantes desse hormônio foram detectados em casos de doenças relacionadas ao sistema cardiovascular (STJERNQUIST, 1998).

4.2. Biossíntese, receptores e via de sinalização

A síntese de endotelinas envolve basicamente três passos: (i) uma clivagem proteolítica inicial de pré-pró-ET (212 aminoácidos) originando a pró-ET (195 aminoácidos), caracterizando-se pela remoção do peptídeo sinalizador, por endopeptidases; (ii) uma segunda clivagem da pró-ET, formando um intermediário inativo, a Big-ET (38 ou 39 aminoácidos dependendo da espécie), por uma

convertase ácida específica ou furina; (iii) o processamento da Big-ET a ET madura com 21 aminoácidos pela enzima conversora de ET (ECE) (INOUE *et al.*, 1989, KIDO *et al.*, 1998).

A última etapa da biossíntese das endotelinas é a etapa melhor caracterizada. Foram caracterizados dois tipos de ECE, ECE-1 e ECE-2 (YANAGISAWA *et al.*, 1998). ECE-1 parece agir no complexo de Golgi, em vesículas intracelulares ou na superfície celular, nas fases mais iniciais do processamento de Big-ET, enquanto ECE-2 parece atuar de preferência intracelularmente (EMOTO & YANAGASAWA, 1995).

Três subtipos de receptores para ETs foram identificados na década de 90. Apresentando as seguintes ordens de afinidade, são eles ET_A , $ET-1 \geq ET-2 > ET-3$ (ARAI *et al.*, 1990), ET_B , $ET-1 = ET-2 = ET-3$ (SAKURAI *et al.*, 1990) e ET_C , $ET-3 > ET-1 = ET-2$ (KARNE *et al.*, 1993). ET_A e ET_B foram clonados a partir de material genético de mamíferos (ARAI *et al.*, 1990; SAKURAI *et al.*, 1990), enquanto que ET_C foi caracterizado em melanóforos de *Xenopus laevis* (KARNE *et al.*, 1993). ET_A e ET_B humanos apresentam cerca de 63% de homologia (SAKURAI *et al.*, 1992). Já o receptor ET_C de *Xenopus laevis* apresenta 47% de homologia com ET_A e 52% com ET_B , ambos de mamíferos (KARNE *et al.*, 1993).

Todos os receptores para endotelinas apresentam sete alças transmembrânicas, pertencentes à família dos receptores acoplados à

proteína G (GPCRs) (ARAI *et al.*, 1990; SAKURAI *et al.*, 1992; KARNE *et al.*, 1993).

Receptores de ETs foram identificados em diferentes tecidos e tipos celulares de mamíferos. ET_A está presente em células da musculatura lisa vascular, vias aéreas, bexiga, musculatura lisa uterina, músculo cardíaco, osteoblastos. Os receptores ET_B podem ser encontrados em artéria mesentérica, estômago, córtex cerebral, miométrio, e astrócitos de ratos (SAKURAI *et al.*, 1992).

Da mesma forma que exercem uma variedade de efeitos fisiológicos em diferentes tecidos, ETs mobilizam uma ampla variedade de mensageiro intracelulares na mediação desses efeitos. Os receptores de ET mais amplamente estudados são os ET_A, os quais apresentam maior afinidade pela endotelina-1. Para estes receptores têm sido descritas, na literatura, diversas vias de sinalização intracelular, tais como da fosfolipase C (PLC) (SOKOLOVSKY, 1991), da fosfolipase D (PLD) (AMBAR & SOKOLOVSKY, 1993), da fosfolipase A₂ (PLA₂) (ARAMORI & NAKANISHI, 1992), da produção de monofostato cíclico de adenosina (AMP_c) (SOKOLOVSKY *et al.*, 1994) e de guanosina (GMP_c) (SHARAGA-LEVINE & SOKOLOVSKY, 1996), do aumento nos níveis de cálcio (Ca²⁺) citosólico (KOIZUMI *et al.*, 1994), e da cascata de sinalização por proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (KASUYA *et al.*, 1994).

5. Pigmentação nos animais

5.1. Características gerais da mudança de cor nos animais

Os vertebrados possuem células pigmentares derivadas da crista neural embrionária, denominadas cromatóforos (BAGNARA & HADLEY, 1973). Os cromatóforos distribuem-se pela derme e epiderme, além de revestimentos de órgãos internos, e podem ser agrupados, de acordo com sua cor e os pigmentos que apresentam: melanóforos (contêm grânulos de melanina, os melanossomos, pretos ou pardos); eritróforos (contêm diferentes proporções de pigmentos carotenóides e pteridínicos, vermelhos); xantóforos (contêm pigmentos pteridínicos e carotenóides em proporções variadas, amarelos); leucóforos (contêm grânulos esféricos de purinas, brancos); iridóforos (contêm purinas depositadas sob a forma de placas cristalinas, os iridossomos, com coloração iridescente, podendo ser azul ou verde metálico) (FUJII & OSHIMA, 1986; FUJII, 1993; FUJII, 2000). Muitos vertebrados ectotérmicos ajustam suas cores corporais para serem confundidos com o ambiente, através da migração de pigmentos no interior dos cromatóforos, regulada por sistemas neurais e/ou hormonais (BAGNARA & HADLEY, 1973). As funções adaptativas desses processos de mudança de coloração relacionam-se frequentemente ao mimetismo, termorregulação via retenção ou dissipação de energia, comunicação social e

reconhecimento específico e expressão de estados comportamentais como excitação sexual, agressividade e medo (BAGNARA, 1957; BAGNARA & HADLEY, 1973; FUJII, 2000).

As alterações de coloração envolvem dois processos de mudança de cor nos animais: a) morfológica, por mecanismos que induzem a síntese de pigmentos e/ou proliferação de células pigmentares, ou b) fisiológica, envolvendo a translocação rápida de grânulos de pigmentos ao longo dos processos dendríticos destas células (FUJII, 2000). A migração de grânulos de pigmentos é característica de crustáceos e vertebrados ectotérmicos. Em aves e mamíferos a variedade de cromatóforos vista nos demais vertebrados foi perdida, nesses animais são encontradas somente células pigmentares que apresentam melanina, denominadas melanócitos (BAGNARA & HADLEY, 1973; FUJII, 2000).

Vertebrados ectotérmicos apresentam cromatóforos capazes de ajustar a cor do animal pela migração rápida de pigmentos dentro dessas células. Sabe-se que há diversos hormônios e neurotransmissores envolvidos na modulação de mudança de cor em animais, tais como α -MSH (hormônio estimulante de melanócitos) produzido na *pars intermedia* da glândula hipófise ou pela própria pele, MCH (hormônio concentrador de melanina) produzido por neurônios hipotalâmicos do núcleo *lateralis tuberalis*, melatonina a principal indolamina produzida pela glândula pineal, as catecolaminas

do sistema nervoso simpático e medula adrenal, prolactina sintetizada na *pars distalis* de vertebrados e em aves, na *pars tuberalis* da hipófise, e endotelinas, produzida pelas células endoteliais e pelos queratinócitos (BAGNARA & HADLEY, 1973; FUJII *et al.*, 1993; FILADELFI *et al.*, 1996; 2002; 2004; FUJITA & FUJII, 1997; CAMARGO *et al.*, 1999).

A mudança de cor fisiológica pode ser promovida por dois diferentes mecanismos. O primeiro mecanismo envolvido, mudança de cor secundária, é mediado através dos olhos e controlado pelo sistema neural e/ou endócrino. O outro tipo é a mudança de cor primária, onde os cromatóforos respondem diretamente à luz (OSHIMA, 2001). Em muitos invertebrados, incluindo ouriço do mar e crustáceos, a iluminação causa dispersão de pigmentos (MILLER & CAWTHON, 1974). Entretanto, estimulação com luz frequentemente leva à agregação de pigmentos, principalmente em cromatóforos de peixes e anfíbios (OSHIMA, 2001). Quando os cromatóforos apresentam independência do sistema nervoso e/ou endócrino em estágios embrionários e larvais de teleósteos, pode ocorrer resposta direta à luz incidente (OHTA, 1983). Com o desenvolvimento, essa resposta fica dependente do controle neuroendócrino e só reaparece, na maioria dos casos, se os cromatóforos forem desenergados ou colocados em cultura primária (FUJII, 2000). Porém, em alguns teleósteos, respostas fóticas foram observadas mesmo em

cromatóforos inervados de adultos. Em *Oryzias latipes*, por exemplo, os xantóforos (OSHIMA *et al.*, 1998) e leucóforos (OHTA & SUGIMOTO, 1980) respondem à luz com agregação de seus pigmentos, resposta que não é afetada por bloqueadores de adrenoreceptores, demonstrando assim que não é evocada via neurotransmissores catecolaminérgicos. A luz pode agregar ou dispersar os grânulos de pigmento nos eritróforos de *Oreochromis niloticus* (BAN *et al.*, 2005), fotossensibilidade que não depende do estágio de vida do animal (OSHIMA & YOKOZEKI, 1999). Em teleósteos, nos comprimentos de onda de 365, 400 ou 600nm, ocorre agregação, enquanto em 500nm a resposta é de dispersão (SATO *et al.*, 2004). A resposta de agregação da melanina à luz em melanóforos de girinos de *Xenopus laevis* 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 do pigmento visual, rodopsina (DANIOLOS *et al.*, 1990). Já a resposta de dispersão ocorre em 460nm através do ftopigmento melanopsina (ISOLDI *et al.*, 2005).

Os melanóforos dérmicos embrionários de *Xenopus laevis* apresentam duas melanopsinas, ambas ou uma delas podendo ser a molécula fotorreceptora, responsável por perceber a informação luminosa. Dessa forma, são iniciados os mecanismos de dispersão dos grânulos de pigmento pelo citoplasma em resposta a luz

(DANIOLOS *et al.*, 1990). Por apresentar tais características, essa linhagem celular torna-se um potencial modelo biológico para a investigação dos mecanismos envolvidos na percepção de luz e ritmos em relógios periféricos.

5.2. Hormônios reguladores da pigmentação

Diversos hormônios podem regular o processo de mudança de cor nos vertebrados. O α -MSH parece ser uma melanotropina fisiologicamente relevante no controle do processo de mudança de cor em praticamente todos os vertebrados. Além de provocar escurecimento rápido, α -MSH tem função no estabelecimento do padrão pigmentar de vertebrados ectotérmicos, através do recrutamento de melanoblastos e por estimular a proliferação de melanóforos (BAGNARA & FERNANDEZ, 1993).

O hormônio concentrador de melanina, MCH, atua como um potente agonista da agregação pigmentar em peixes neopterígeos (holósteos e teleósteos), mas parece não exercer ação pigmentar alguma nos tetrápodes (CASTRUCCI *et al.*, 1987).

Melatonina, produzida pela glândula pineal durante a fase de escuro do dia, é um importante fator agregador de melanossomos em vertebrados ectotérmicos. Dessa forma, promove clareamento dos animais e constitui um importante mensageiro químico mediando a

influência do comprimento do fotoperíodo sobre a coloração dos vertebrados (REITER, 1991).

As catecolaminas do sistema nervoso simpático e medula adrenal são potentes agonistas em melanóforos de vertebrados ectotérmicos (FUJII & OSHIMA, 1986). A ativação de adrenocetores, sendo que a ativação de adrenocetores α leva à agregação pigmentar, portanto o clareamento dos animais, e a ativação de adrenocetores β leva a dispersão pigmentar ou ao escurecimento (RUFFOLO *et al.*, 1991).

Em teleósteos, a prolactina, promove agregação de melanossomos (KITTA *et al.*, 1993). Esse sistema de controle através da prolactina parece ser filogeneticamente antigo, pois prolactina é um potente agente escurecedor da pele de elasmobrânquios (VISCONTI *et al.*, 1999) e de anfíbios (CAMARGO *et al.*, 1999). É bem conhecida a influência da prolactina na mudança de cor da pelagem de mamíferos durante o período reprodutivo e/ou sazonal (CAMARGO *et al.*, 2006). Níveis aumentados de prolactina levam ao escurecimento da pelagem e a manutenção da pelagem escura (GOWER *et al.*, 1994).

Além desses hormônios já mencionados, as endotelinas, nosso foco de investigação, também afetam o processo de mudança de cor dos vertebrados e serão detalhadas a seguir.

5.3. Endotelinas e mudança de cor em vertebrados ectotérmicos

As ETs têm sido reconhecidas como participantes da regulação da migração e/ou produção de pigmentos em cromatóforos de vertebrados. Em várias espécies de peixes teleósteos, as ETs induzem a agregação pigmentar em melanóforos (FUJII *et al.*, 1993; 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 (IP₃) através da ativação da PLC, a elevação da concentração intracelular de Ca²⁺ e a ativação de uma proteína quinase C dependente de cálcio (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, 1997). Dados da literatura sugerem que o receptor ET_B seria o principal responsável pelos efeitos de endotelina em células pigmentares. (HAYASHI *et al.*, 1996; RAMANZINI *et al.*, 2006).

As três isoformas de endotelinas (ET-1, -2, -3) atuam promovendo agregação pigmentar em teleósteos. ET-1 atua em: *Brachydanio rerio*, *Oryzias latipes*, *Oxyleoris marmoratus* (FUJII *et al.*, 1993) e *Synbranchus marmoratus* (RAMANZINI, 2006); e por ET-2 e -3 em: *Zacco temmincki*, *Oreochromis niloticus*, *Brachydanio rerio*

(HAYASHI *et al.*, 1996).

Aparentemente, são as células endoteliais dos capilares dérmicos a fonte de secreção de ETs que regulariam de maneira parácrina as células pigmentares dos teleósteos. Foi detectada a secreção desse hormônio por células da epiderme do teleósteo *Carassius auratus*, contudo a maior parte dos cromatóforos parece estar na derme e na lâmina basal (FUJII, 2000).

Em anfíbios, embora ET-1 atue como agonista parcial ao desencadear o escurecimento da pele dos anfíbios *Rana catesbeiana* e *Bufo ictericus* (FILADEFI *et al.*, 1996), ET-2 e -3 são agonistas totais em peles de *Rana catesbeiana*, sendo ET-3 a mais potente. A resposta parcial de ET-1 sugere que talvez esta isoforma não seja o agonista nativo das espécies em questão e que possivelmente um receptor diferente dos clássicos ET_A e ET_B de mamíferos seja ativado pelas ETs neste caso (CAMARGO *et al.*, 1999). De fato, o receptor ET_C, clonado em *Xenopus laevis*, é ativado preferencialmente por ET-3, a qual desencadeia escurecimento ou dispersão de melanossomos dependente da dose (KARNE *et al.*, 1993; CAMARGO *et al.*, 1999; FUJII, 2000).

Em células GEM-81 de eritroforoma do teleósteo *Carassius auratus*, que expressam rodopsina e receptor para endotelina subtipo ET_A, foi demonstrado que SRTX S6c, análogo de ETs, modula os níveis de RNAm para rodopsina de forma temporal e dose

dependente. Essa modulação envolve a ativação de uma PKC e da cascata de MAP-quinases (MAPKs). Os ensaios de *Western blotting* não demonstraram variações significantes nos níveis protéicos no tratamento de 24 horas na concentração 10^{-9} M, sugerindo o envolvimento de mecanismos de controle pós-transcricionais na modulação da expressão protéica de rodopsina (LOPES *et al.*, 2010).

Em vários estudos observou-se dessensibilização da resposta a ETs em células pigmentares. Em melanóforos de *Brachydanio rerio* (FUJII, 1993), de *Synbranchus marmoratus* (RAMANZINI *et al.*, 2006) e de *Xenopus laevis* (KARNE, *et al.*, 1993) houve redução na resposta evocada por ETs após um determinado tempo de exposição a este hormônio, variável em função da espécie considerada. Comumente o processo de dessensibilização está associado a uma redução no número de receptores hormonais e no caso é específico para o sistema ET/receptor.

5.4. Endotelinas e células pigmentares de mamíferos

Queratinócitos humanos sintetizam e secretam ET-1, a qual atua sobre os melanócitos (IMOKAWA *et al.*, 1992), de maneira parácrina. A radiação UV estimula os melanócitos via secreção de α -MSH e de endotelina, os quais podem atuar paracrinamente como agentes mitogênicos e melanogênicos em melanócitos humanos (YADA *et al.*, 1991; IMOKAWA *et al.*, 1992; 1995).

Na epiderme humana, os melanócitos produzem melanina dentro de organelas especializadas denominadas melanossomos, através da ação da enzima tirosinase. Os melanossomos melanizados são transferidos para os queratinócitos vizinhos que, por sua vez, produzem fatores que regulam o funcionamento dos melanócitos, tal como a própria ET-1 (IMOKAWA *et al.*, 1986).

Queratinócitos humanos em cultura expressam RNAm para pré-proendotelina e secretam ET-1 madura (YOHN *et al.*, 1993). Os queratinócitos podem também produzir o precursor Big-ET, cuja produção, juntamente com a de ET-1 é aumentada de maneira dependente da dose e do tempo de exposição das células a radiação ultravioleta tipo B (UVB). Tal efeito é também acompanhado de significativo aumento da secreção de interleucina 1 α (IL-1 α) (IMOKAWA *et al.*, 1992; 1995), que estimula, de maneira tempo dependente, a transcrição e a secreção de ET-1, mas não a de ET-3 (IMOKAWA *et al.*, 1992). Ainda, em queratinócitos humanos, a expressão da enzima conversora de endotelina (ECE) aumenta após tratamento com IL-1 α , fato que pode ser relacionado à hiperpigmentação pós-inflamatória (HACHIYA *et al.*, 2002).

Ainda há controvérsia sobre as vias de sinalização envolvidas nos efeitos mitogênico e melanogênico das ETs sobre os melanócitos (Figura 1). Há evidências de ativação de uma proteína G_i, uma vez que os efeitos hormonais foram abolidos por BQ-123 (IMOKAWA *et*

al., 1996; IMOKAWA *et al.*, 1997) e por toxina de pertussis (IMOKAWA *et al.*, 2000). Apesar deste suposto envolvimento da proteína G_i , estes mesmos estudos demonstraram haver aumento dos níveis de AMP_c na presença de ETs (IMOKAWA *et al.*, 1996; IMOKAWA *et al.*, 1997). Além disso, alguns estudos mostram um 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) e a ativação de proteína quinase A (dependente de AMP_c) (PKA) (IMOKAWA *et al.*, 1996; IMOKAWA *et al.*, 1997), PKC (IMOKAWA *et al.*, 1996; IMOKAWA *et al.*, 1997; IMOKAWA *et al.*, 2000), PLC (KANG *et al.*, 1998; IMOKAWA *et al.*, 2000) e MAPKs (IMOKAWA *et al.*, 1996; IMOKAWA *et al.*, 2000).

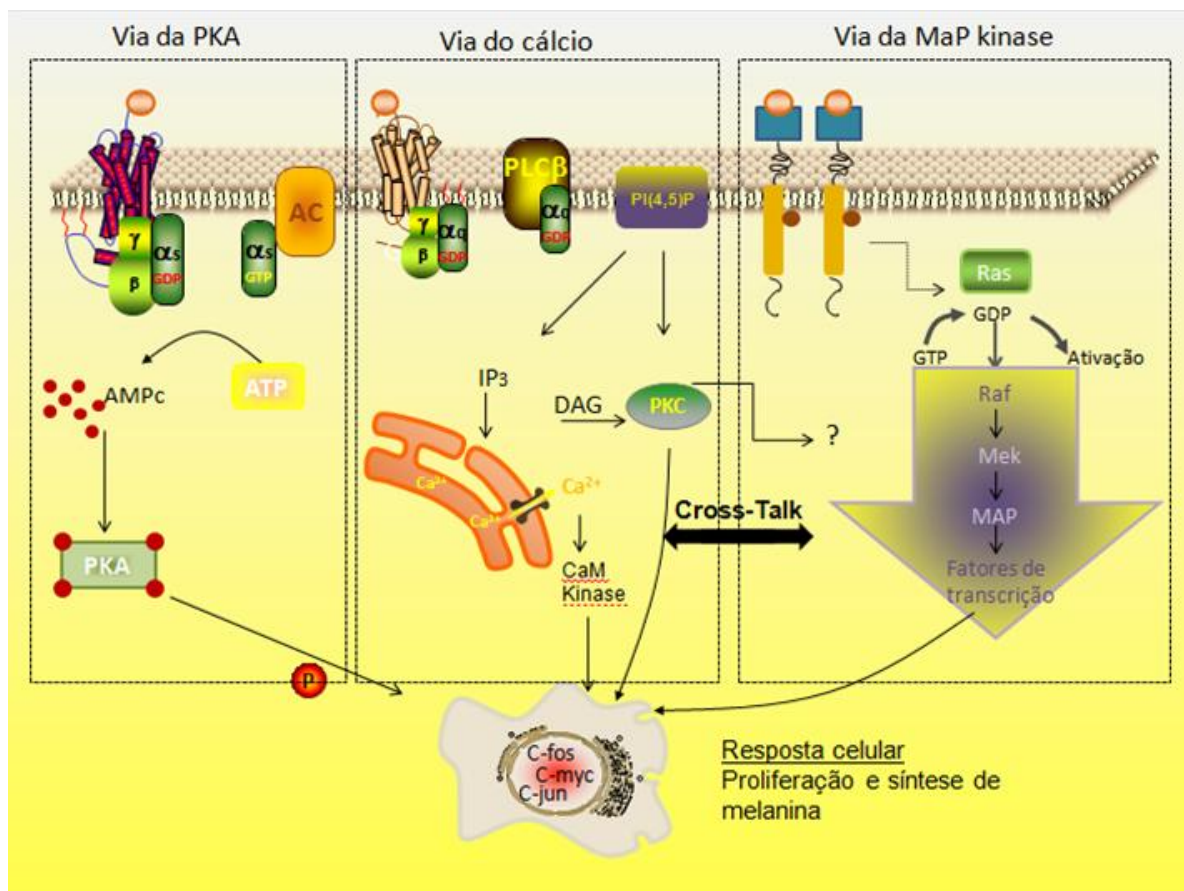


Figura 1 - Vias de sinalização intracelular participantes da estimulação da proliferação e melanogênese em melanócitos humanos (Modificado de IMOKAWA *et al.*, 1997).

Por outro lado, desde o início dessas investigações, foi sugerido que o mecanismo de ação das ETs nos melanócitos humanos envolveria conversas cruzadas entre diferentes vias de sinalização intracelulares, a saber, aquelas envolvendo a participação de PKA, PKC e MAPK (IMOKAWA *et al.*, 2000). PKC é capaz de fosforilar e ativar diretamente Raf-1 (KOLCH *et al.*, 1993), que é um dos componentes da via de sinalização das MAPKs. De fato, em melanócitos humanos, há indícios da ocorrência de conversa cruzada

entre a via de sinalização de PKC e de MAPKs, sendo PKC a provável responsável pela fosforilação de Raf-1 (IMOKAWA *et al.*, 1996; IMOKAWA *et al.*, 2000). Embora as vias de transdução do sinal ainda sejam controversas, foram feitos estudos farmacológicos da ação da endotelina-1 nessas células e foi demonstrada a participação do subtipo ET_B (IMOKAWA *et al.*, 1997; IMOKAWA *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 1998).

Em melanócito B16 de *Mus musculus*, o qual expressa rodopsina e receptor de endotelina subtipo ET_B , foi demonstrado que ET-1 modula os níveis de RNAm para rodopsina de forma temporal e dose-dependente, e que essa modulação envolve a participação de PLC, cálcio como segundo mensageiro intracelular, calmodulina, quinase dependente de cálcio/calmodulina e PKC (LOPES *et al.*, 2010). Os níveis de proteínas não foram alterados nos tratamentos com ET-1 10^{-10} M por 24 horas, tanto nas extrações feitas logo após o tratamento (tempo 0), como 6 horas após o tratamento. Já nas células cuja proteína total foi extraída 3 horas após o tratamento com ET-1, foi observada uma diminuição significativa dos níveis da proteína rodopsina, indicando o envolvimento de mecanismos de controle pós-transcricional na modulação da expressão protéica de rodopsina (LOPES *et al.*, 2010).

Objetivos

OBJETIVOS

1. Geral

- Verificar se a expressão gênica das melanopsinas e do receptor de endotelina subtipo ET_C em célula pigmentar de vertebrados pode ser modulada por endotelina.

2. Específico

- Verificar se a expressão gênica das melanopsinas e do receptor de endotelina em melanóforos de *Xenopus laevis* apresenta variação temporal em diferentes condições de iluminação.

- Verificar os efeitos temporais e dose-dependentes da endotelina sobre a expressão gênica das melanopsinas e do receptor de endotelina em melanóforos de *Xenopus laevis*.

- Verificar se endotelina ou ciclo claro-escuro podem atuar como agente sincronizador em melanóforos de *Xenopus laevis*.

*Material e
Métodos*

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultura de células

Melanóforos de *Xenopus laevis* (cedidos pelo Dr. Mark Rollag, *Uniformed Services University of Health Sciences*, EUA) foram mantidos em meio L-15 diluído para 60%, complementado com galactose 480mg/L, insulina/transferrina/selênio 5mg/L, uridina 4mg/L, L-glutamina 87,6mg/L, L-asparagina 25mg/L, CaCl₂ 152mg/L, MgCl₂ 49,6mg/L, MgSO₄ 51,7mg/L, solução de aminoácidos não essenciais de MEM 0,4X, solução de aminoácidos essenciais de MEM 0,2X, solução de vitaminas de MEM 0,3X, suplemento de hipoxantina/timidina 2X, suplementado com 10% de soro fetal bovino não inativado (todos da Life Technologies, EUA), pH 7,5, na presença de 1% de solução antibiótica/antimicótica contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B, em estufa a 25°C. O meio de cultura foi trocado semanalmente e as células subcultivadas (1:3) quando atingiam a confluência nos frascos. Para tanto foram removidas com solução Tryplex (Life Technologies, EUA) e transferidas a novos frascos.

2. Verificação do padrão temporal de expressão de (*Opn4x* e *Opn4m*) e do receptor de endotelina subtipo *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis*

As células foram semeadas (2×10^6 células por frasco de 25cm^2), em meio contendo 2% soro (Life Technologies, EUA) e 1% de retinaldeído 10^{-7}M (Life Technologies, EUA), obedecendo a dois diferentes protocolos: 1) as células foram mantidas em escuro constante por 5 dias (Fig. 2), ou 2) em 12C:12E (luz acesa às 8 horas, ZT0, Fig. 3) e então o RNA total foi extraído a cada 4 horas; 2) as células foram mantidas em 12C:12E (luz acesa às 8 horas, ZT0) ou escuro constante por 5 dias, e no início do 6º dia as células foram tratadas por 6 horas (ZT0 a ZT6) com endotelina 10^{-9} ou 10^{-8}M , mantendo-se em paralelo células controle na ausência do hormônio, mas que foram submetidas às mesmas trocas de meio. No dia seguinte, 24 horas após o início do tratamento, o RNA total foi extraído a cada 4 horas, seguido por RT-PCR e PCR em tempo real. As trocas de meio foram realizadas sob fluxo laminar (modelo FLV, Trox, Brasil). As células que foram mantidas em escuro constante foram manipuladas (troca de meio, adição de meio com hormônio e extração de RNA total) sob luz vermelha proveniente de um iluminador Konex com lâmpada de 7W e com filtro Safe-Light GBX-2 (Kodak, EUA).

2.1. Protocolo de expressão de melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) e do receptor de endotelina subtipo *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* mantidos em escuro constante

As garrafas experimentais (25cm²) contendo os melanóforos foram mantidas em regime de escuro constante por 5 dias, sem nenhum tipo de manipulação ou troca de meio (Figura 2). No início do quinto dia, correspondente ao ZT0 do ciclo claro-escuro, a extração do RNA total foi feita a cada 4 horas (duas garrafas por ponto de extração) ao longo de 24 horas, seguido por RT-PCR e PCR em tempo real. Cada experimento foi repetido duas vezes.

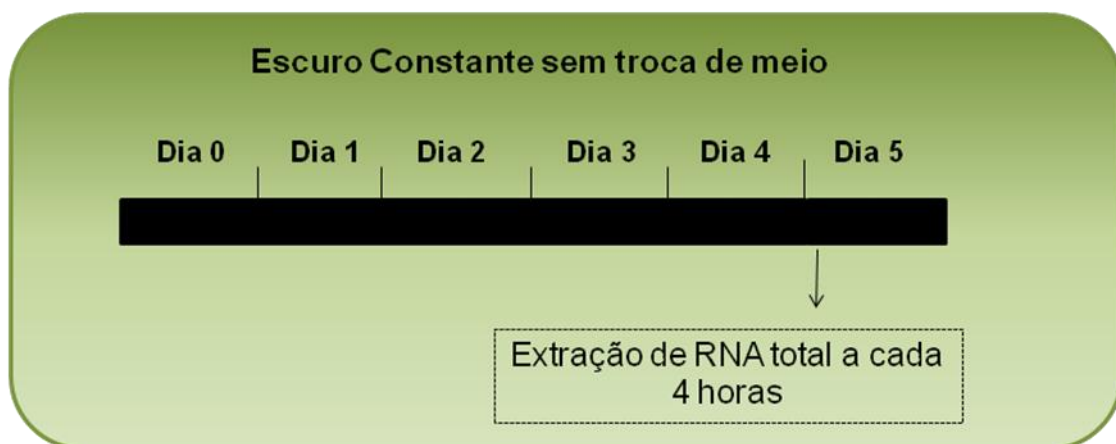


Figura 2 – Protocolo experimental: melanóforos de *Xenopus laevis* mantidos em escuro constante e sem adição de hormônio.

2.2. Protocolo de expressão de melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) e do receptor de endotelina subtipo *ET_c* em melanóforos de *Xenopus laevis* mantidos em fotoperíodo 12C:12E

As garrafas experimentais (25cm²) contendo os melanóforos foram mantidas em regime de 12 horas de claro e 12 horas de escuro por 5 dias, sem nenhum tipo de manipulação ou troca de meio (Figura 3). No início da fase clara do quinto dia, a extração do RNA total foi feita a cada 4 horas (duas garrafas por ponto de extração) ao longo de 24 horas, seguido por RT-PCR e PCR em tempo real. Cada experimento foi repetido duas vezes.

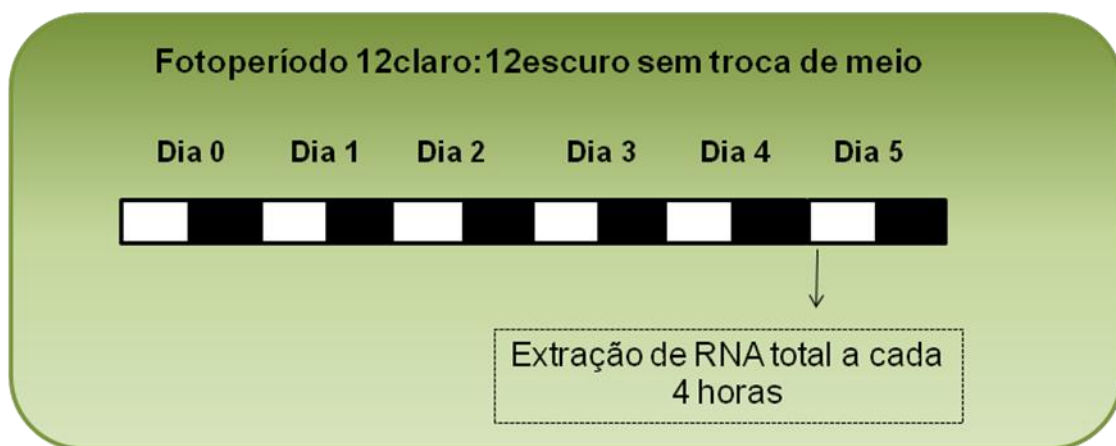


Figura 3 - Protocolo experimental: melanóforos de *Xenopus laevis* mantidos em fotoperíodo 12C:12E e sem adição de hormônio.

2.3. Protocolo de expressão de melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*) e do receptor de endotelina subtipo *ET_c* em melanóforos de *Xenopus laevis* mantidos em escuro constante e tratados com endotelina

As garrafas experimentais (25cm²) contendo os melanóforos foram mantidas em escuro constante. No ZT0 do quinto dia, as garrafas foram divididas em dois grupos: (1) grupo controle: as células foram submetidas a uma troca de meio sem adição de hormônio; (2) grupo tratado: as células foram submetidas a uma troca de meio contendo endotelina-3 (Calbiochem, EUA) 10⁻⁹ ou 10⁻⁸M. Seis horas após a adição do hormônio (ZT6), os dois grupos experimentais foram submetidos a uma nova troca de meio, sem adição de hormônio (Figura 4). No ZT0 do sexto dia (24 horas após o início do tratamento) foi realizada a extração do RNA total (2 garrafas por grupo experimental e por ponto de extração) a cada 4 horas por um período de 24 horas, seguido por RT-PCR e PCR em tempo real. Cada experimento foi repetido de duas a quatro vezes.

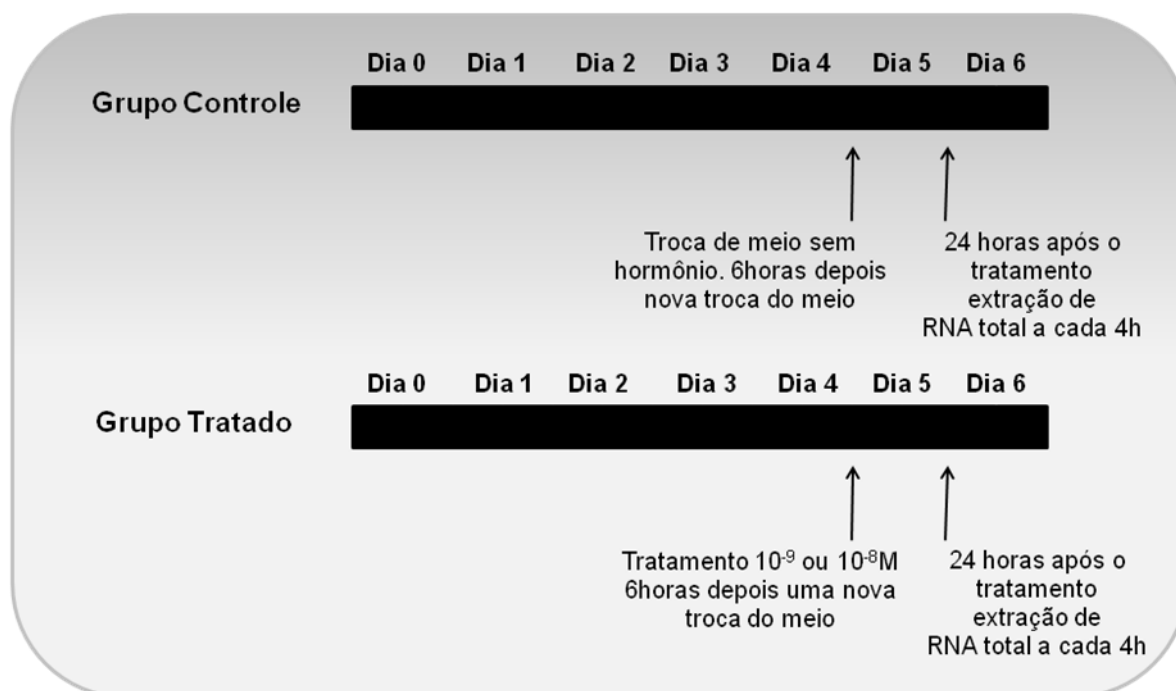


Figura 4 - Protocolo experimental: melanóforos de *Xenopus laevis* mantidos em escuro constante e tratados com endotelina.

2.4. Protocolo de expressão de melanopsinas (*Opn4x* e *Opn4m*), receptor de endotelina subtipo *ET_c* em melanóforos de *Xenopus laevis* mantidos em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina

As garrafas experimentais (25cm^2) contendo os melanóforos foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E. No ZT0 do quinto dia, as garrafas foram divididas em dois grupos: (1) grupo controle: as células foram submetidas a uma troca de meio sem adição de hormônio; (2) grupo tratado: as células foram submetidas a uma troca de meio contendo endotelina-3 (Calbiochem, EUA) 10^{-9} ou 10^{-8}

⁸M. Seis horas após a adição do hormônio (ZT6), os dois grupos experimentais foram submetidos a uma nova troca de meio, sem adição de hormônio (Figura 5). No ZT0 do sexto dia (24 horas após o início do tratamento), foi realizada a extração do RNA total (2 garrafas por grupo experimental e por ponto de extração) a cada 4 horas por um período de 24 horas, seguida por RT-PCR e PCR em tempo real. Cada experimento foi repetido de duas a seis vezes.

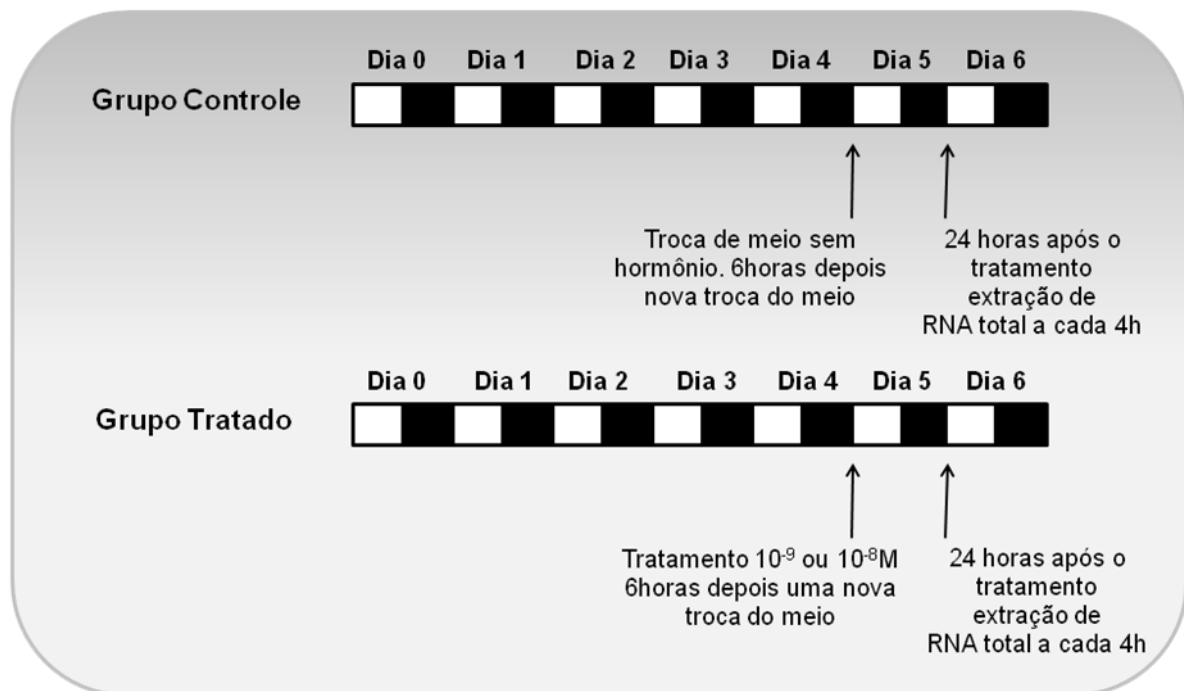


Figura 5 - Protocolo experimental: melanóforos de *Xenopus laevis* mantidos em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina.

3. Extração de RNA total

Após o descarte do meio, foi adicionado 1mL de Tri-Reagent-LS (Sigma, EUA) diretamente sobre as células. O lisado celular foi coletado em *eppendorf* e incubado por 5 min à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação das proteínas nucleares. Ao lisado celular foram adicionados 200 μ L de BCP (1-bromo-3-cloropropano, Sigma, EUA), 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 (Sigma, USA), 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 20 μ L de água tratada com dietil-pirocarbonato (H₂O DEPC, Ambion Inc., EUA). Para remoção de eventual contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase (kit *turboDNA-free*TM, Life Technologies, EUA). Adicionou-se a cada amostra, 10% do volume do *10x Turbo DNase Buffer*, 1 μ L de *Turbo DNase*, seguindo-se incubação de 30 min, a 37°C. Logo após, foram acrescentados 3 μ L 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 2-3x. Após

centrifugação a 10.000 x g por 2 min, o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo *ependorf* 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, EUA).

4. RT-PCR (*Reverse transcriptase-polymerase chain reaction*)

RT-PCR foi realizado com 1ug de RNA total, utilizando 1uL de oligonucleotídeos randômicos (100 ng/uL) e 1uL de dNTPs Mix 10mM (Life Technologies, EUA), em reação com volume final de 13uL ajustado com H₂O/DEPC. As amostras foram aquecidas por 5 min a 65°C e a seguir transferidas para cuba com gelo, adicionando-se 4uL de tampão para PCR (5x), 1uL de DTT (0,1 M), 1uL de inibidor de ribonuclease (40U/uL) e 1uL da enzima *Superscript III* (200U/uL, Life Technologies, EUA), para um volume final de 20uL. A mistura foi homogeneizada e, após breve centrifugação, incubada por 5 min a 25°C, e a seguir por 50 min a 50°C. A reação foi inativada por incubação a 70°C por 15 min. O cDNA sintetizado foi utilizado nas reações subsequentes de PCR quantitativo (em tempo real).

5. PCR quantitativo

As reações de PCR quantitativo foram feitas através de dois protocolos distintos. As reações de PCR quantitativo para protocolo multiplex foram feitas com um par de *primers* e uma sonda contendo fluoróforo, específicos para melanopsina *Opn4x* de *Xenopus laevis* (Tabela I, desenhados pelo programa Primer Express, LifeTechnologies, EUA). Para ETC e melanopsina *Opn4m*, foram usados pares de *primers* específicos (Tabela I), também desenhados pelo programa Primer Express, e a amplificação verificada pela incorporação do fluoróforo *SYBR Green*.

TABELA I. Seqüências de *primers* e sondas para PCR quantitativo

Primer	Seqüência	Seletividade
<i>Forward</i>	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	RNA 18S
<i>Reverse</i>	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	RNA 18S
Sonda	5'-5-TexRd-TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC-BHQ_2-3'	RNA 18S
<i>Forward</i>	5'-TCTTGAAT TTAAGGAGGAAAAGTG-3'	<i>Opn4x</i> de <i>X. laevis</i>
<i>Reverse</i>	5'-TGCTGCCTGCTGATTATGTGA-3'	<i>Opn4x</i> de <i>X. laevis</i>
Sonda	5`-6-FAM-AATGTGGAGCTTGGCACCATTACTTGGC-BHQ_1-3'	<i>Opn4x</i> de <i>X. laevis</i>

<i>Forward</i>	5` - AGGGCAGTCCTAATCCTTTCAGGT- 3`	<i>Opn4m</i> de <i>X. laevis</i>
<i>Reverse</i>	5` -AATCCCAGGTGCAGGATGTCAGAA-3`	<i>Opn4m</i> de <i>X. laevis</i>
<i>Forward</i>	5` -TGCTAAGACTGTGTTCTGCCTGGT-3`	<i>ET_C</i> de <i>X. laevis</i>
<i>Reverse</i>	5` -GCATGCTCGTTTGACTGTTGCAGA-3`	<i>ET_C</i> de <i>X. laevis</i>

Nos ensaios para *ET_C* e *Opn4m*, foram preparadas soluções contendo os *primers*, *iQTM SYBR[®] Green Supermix 2X* (Bio-Rad Laboratories, EUA) ou *SYBR[®] GreenERTM qPCR SuperMix for iCycler[®] 2x* (Life Technologies, EUA) e H₂O DNaseRNase-free (Life Technologies, EUA), obtendo-se uma concentração final de 300nM para os *primers* de *ET_C*, 300nM para os *primers* de *Opn4m* e 50nM para os *primers* do RNA 18S, em soluções independentes. Cada solução foi alíquotada (48µL, sendo cada alíquota suficiente para 2 poços) em tubos *ependorf* e o cDNA de cada amostra foi adicionado de acordo com o gene analisado: 2µL/alíquota para *ET_C*, 5µL/alíquota para *Opn4m*, 0,5µL/alíquota para RNA 18S. As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa experimental (23µL/poço), com duplicatas específicas para cada gene de interesse. Controles negativos feitos sem cDNA foram incluídos rotineiramente.

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 de DNA que está sendo amplificada, não sendo específico. Para determinar se houve 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.

Para os ensaios de PCR quantitativo através do protocolo multiplex para análise simultânea dos genes *Opn4x* e RNA 18S, foram preparadas soluções contendo os *primers* (300nM para melanopsina *Opn4x* e 50nM para RNA 18S), sondas (200nM para melanopsina *Opn4x* e 50nM para 18S), Supermix 2X (KCl 100mM, Tris-HCl 40mM, dNTPs 1,6mM, iTaq DNA polimerase 50U/mL e MgCl₂ 6mM, BioRad, EUA ou Life Technologies, EUA), complementados para aumentar as concentrações finais para 400uM de dNTPS, 6mM de MgCl₂, 0,1U/uL de Platinum Taq DNA polimerase (Life Technologies, EUA), e H₂O para volume final de 30uL/poço. Para cada amostra de cDNA foram feitas

triplicas com 1ul de cDNA por poço. Essa solução foi alíquotada (cada alíquota suficiente para 3,5 poços) em tubos, e o cDNA de cada amostra dos diferentes tratamentos, tempos e horas do dia foi adicionado (3,5uL/alíquota) a um tubo. As soluções já com cDNA foram então distribuídas nos poços da placa de experimento (28uL/poço). Controles negativos feitos sem cDNA foram incluídos rotineiramente.

Foi utilizado RNA ribossômico 18S como normalizador dos experimentos, com *primers* e sonda desenhados em região altamente conservada. Todos os ensaios foram realizados em um termociclador iCycler (BioRad Laboratories, EUA), nas seguintes condições: para os ensaios de *Sybr green*, 2 min a 50°C, 8:30 min a 95°C, seguido por 45 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C, 1 min a 95°C, 1 min a 55°C e 80 ciclos de 10 seg a 55°C, e para os ensaios de multiplex, 7 min a 95°C seguido por 45 ciclos de 30 seg a 95°C e 30 seg a 55°C.

6. Análise dos resultados

A análise dos dados foi feita pela comparação entre os C_T s dos poços controle e experimentais (tratados com hormônio), ou entre diferentes tempos, obtidos entre as porções de crescimento geométrico das curvas, passando-se uma reta denominada limiar que cruza essas porções. Sabendo-se o número de ciclos por onde passa a reta limiar (C_T), foi encontrado o ΔC_T que é a diferença entre os

valores médios do gene de interesse e do RNA 18S. A seguir, foram subtraídos os valores médios encontrados para os poços tratados da média dos poços controle, obtendo-se o $\Delta\Delta C_T$. Colocando-se esse valor como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) obtivemos o número de vezes que o gene está expresso após o tratamento em questão em relação ao controle. Nos experimentos temporais, sem tratamento hormonal, foi considerado controle o valor médio de menor expressão. Os resultados foram normalizados, estabelecendo-se o número de vezes em que o gene está expresso no grupo controle, como correspondendo a 100% da expressão. Para determinar os níveis de significância das possíveis diferenças entre os ZTs, os dados logarítmicos foram comparados por análise de variância (ANOVA), seguida por Tukey através do programa *Prism* versão 5 (GraphPad Software Inc., EUA). A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$. E para determinar os níveis de significância das possíveis diferenças entre grupos tratados com hormônio e grupos controle, os dados logarítmicos foram comparados por teste *t* de Student, também pelo programa *Prism* versão 5. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Além da análise por ANOVA, analisamos a ritmicidade pelo *software* COSANA (BENEDITO-SILVA, 2003), modificação do método COSINOR. Para todos os dados experimentais foi ajustada uma função cosseno, e antes do ajuste, todos os dados foram

normalizados. Para determinar a significância de cada curva ajustada para cada gene em cada experimento, um teste de razão de proximidade foi utilizado como comparação para uma hipótese de amplitude 0 (uma reta). O ajuste periódico foi considerado significativo quando o teste de proximidade p foi menor que 0,05.

Resultados

RESULTADOS

Expressão gênica

1. Quantificação dos níveis de RNAm das melanopsinas (*Opn4m* e *Opn4x*) e do receptor de endotelina em resposta ao ciclo claro-escuro

1.1. *ET_C*

As células foram mantidas em regime de 12C:12E ou em escuro constante por 5 dias antes do início da extração do RNA total.

O receptor de endotelina, subtipo *ET_C*, não mostrou nenhuma variação significativa ao longo de 24 horas quando mantido em escuro constante (Figura 6). Porém apresentou uma tendência de aumento do transcrito às 16, 20 e 4 horas. Quando submetido ao regime de 12C:12E ainda não foi possível observar nenhuma variação ao longo do tempo, indicando que a alternância claro-escuro não foi capaz de sincronizar a expressão desse transcrito, como mostrado na Figura 7. No entanto, em ciclo claro-escuro, houve uma grande inibição do transcrito de *ET_C* em todos os ZTs.

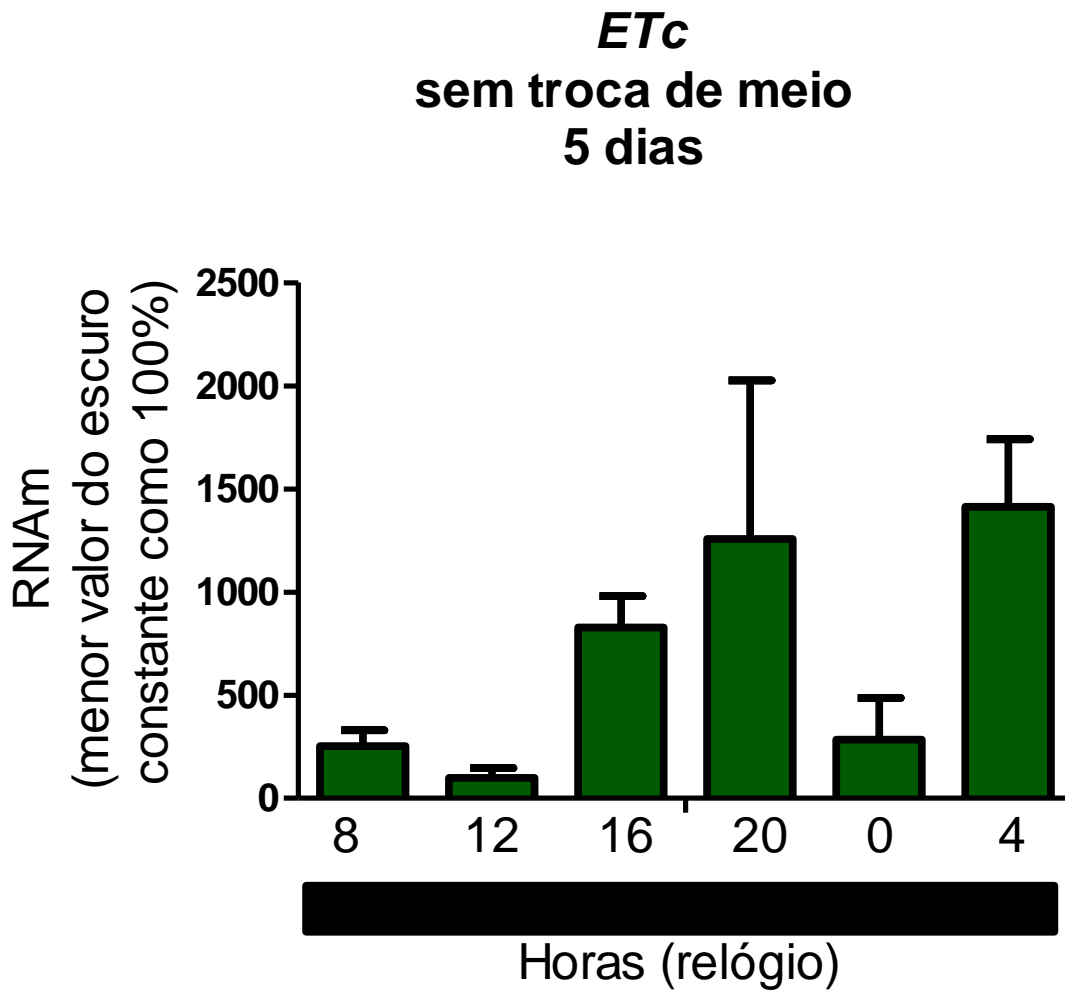


Figura 6 - PCR quantitativo para receptor de endotelina subtipo ET_C em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias antes do início da extração do RNA total, e não foram submetidas a troca de meio durante esse período. Valores são a média \pm EPM ($n=4$) do gene ET_C normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tempos ($p<0,05$).

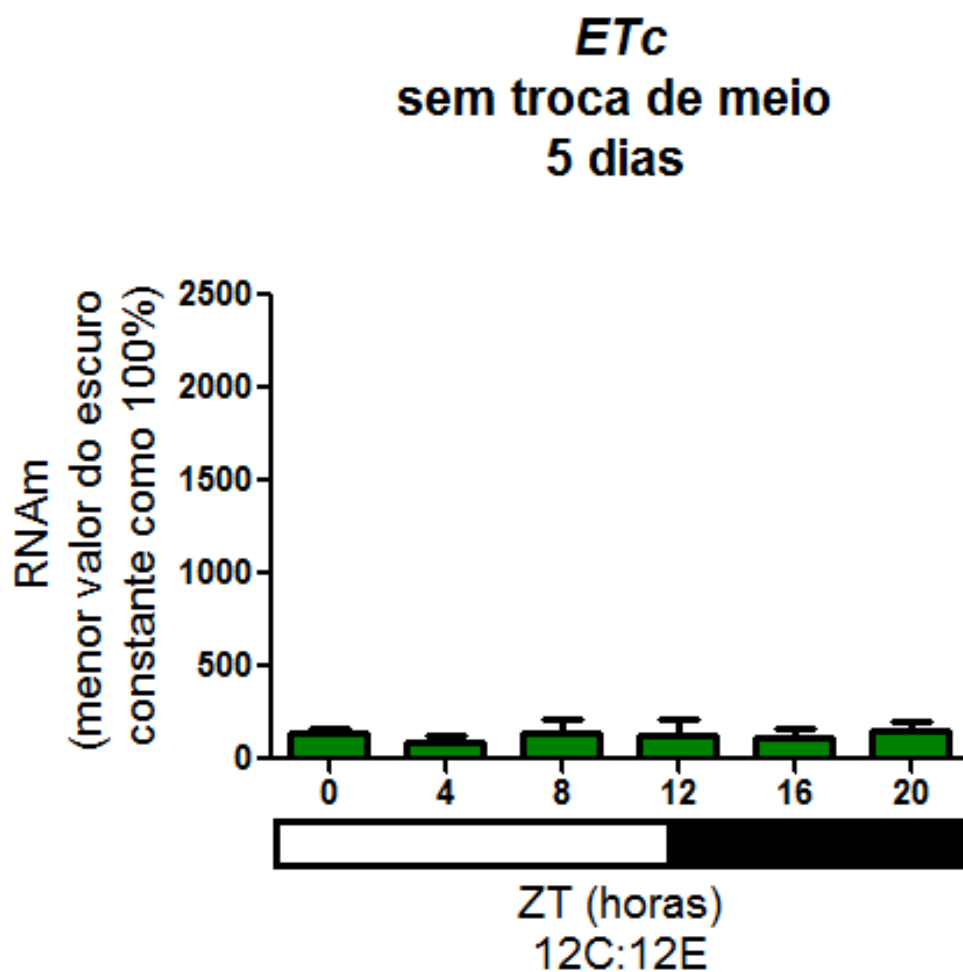


Figura 7 - PCR quantitativo para receptor de endotelina subtipo *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias antes do início da extração do RNA total, e não foram submetidas a troca de meio durante esse período. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene *ET_C* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$).

1.2. *Opn4m*

Quando as células foram mantidas em escuro constante, a produção de RNAm da melanopsina homóloga de mamíferos, *Opn4m*, mostrou um aumento do transcrito às 16 horas (correspondente ao ZT8 de ciclo claro-escuro), em comparação aos horários de menor expressão, 0 e 4 horas (correspondente aos ZTs 16 e 20 de ciclo claro-escuro) (Figura 8). Embora a análise por ANOVA tenha indicado variação significativa entre os tempos, análise por COSANA não identificou um padrão de expressão rítmico. Em fotoperíodo 12C:12E, foi observado um aumento durante a fase escura (Figura 9), evidenciado pela maior expressão no ZT16. Este gene, nesta condição, apresentou menor expressão no ZT0 com aumento ao longo dos ZTs, atingindo seu ponto máximo no ZT16. Mais uma vez, embora o tratamento estatístico tenha mostrado diferenças significativas, não foi possível observar nenhuma variação rítmica pela análise por COSANA. Novamente observou-se diminuição da expressão do RNAm do gene quando as células foram submetidas a 12C:12E.

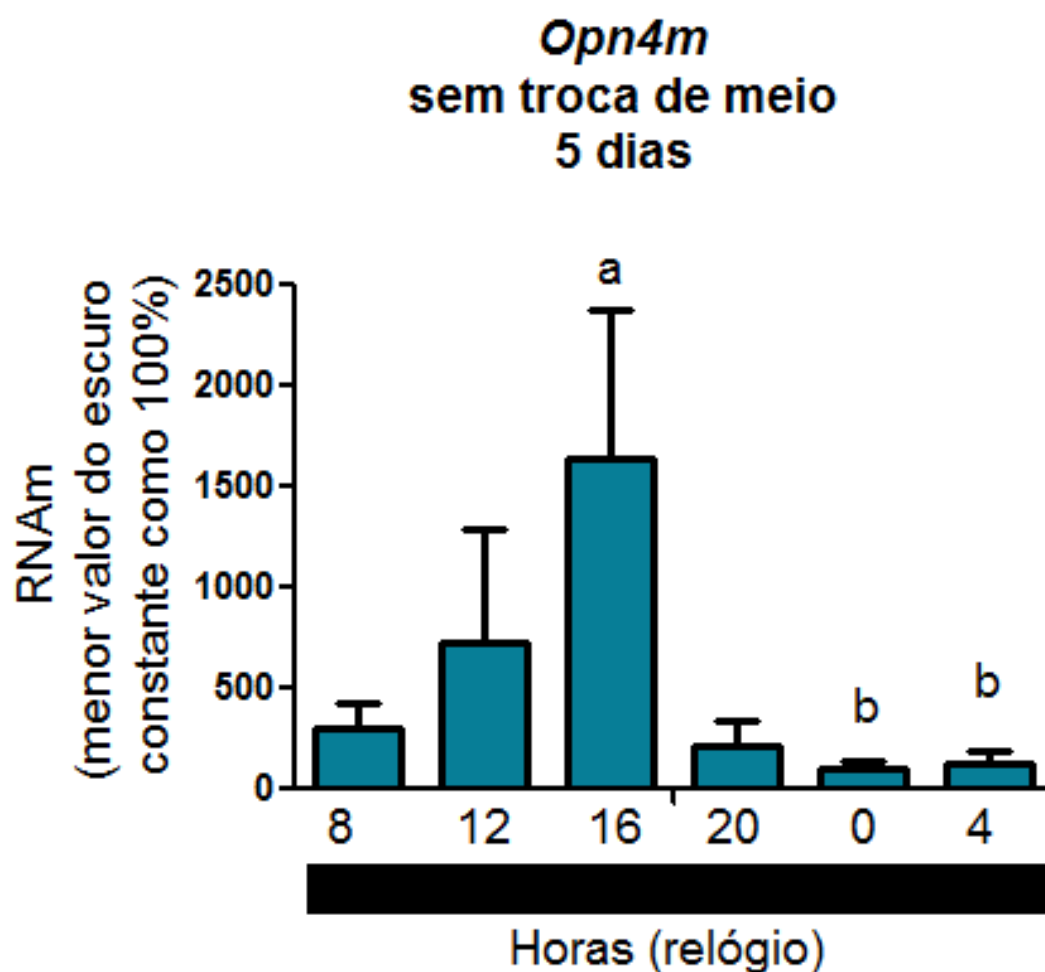


Figura 8 - PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias antes do início da extração do RNA total, e não foram submetidas a troca de meio durante esse período. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0410$).

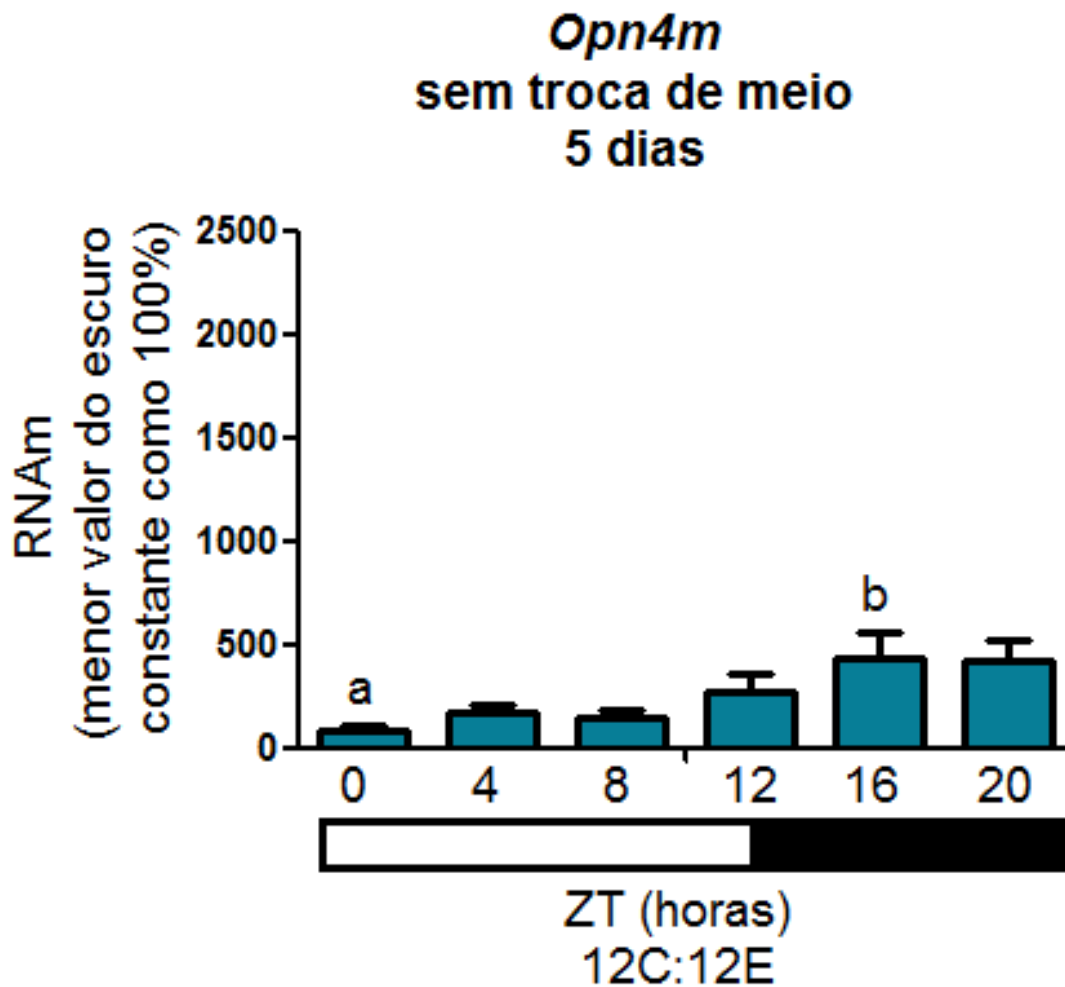


Figura 9 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias antes do início da extração do RNA total, e não foram submetidas a troca de meio durante esse período. Valores são a média \pm EPM (n=8) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0140$).

1.3. *Opn4x*

Semelhantemente ao observado para *Opn4m*, *Opn4x* apresentou o maior ponto de expressão do transcrito às 16 horas (ZT8) em células mantidas em escuro constante (Figura 10). Foi vista também uma tendência de aumento da transcrição iniciando às 8 horas até as 16 horas, ponto máximo de expressão, diminuindo nos outros tempos analisados. Em oposição a *Opn4m*, a melanopsina de *Xenopus* apresentou maior expressão na fase clara, quando mantida em fotoperíodo 12C:12E (Figura 11). Esse aumento foi de quatro vezes quando comparado o transcrito no ZT0, início da fase clara, com ZT20. Ainda que as diferenças estatísticas tenham sido significativas ($p < 0,05$), não foi confirmado nenhum padrão de expressão rítmica pela análise por COSANA.

Esses resultados indicam que, embora existam diferenças na expressão das melanopsinas ao longo das 24 h, o ciclo de claro-escuro não é capaz de sincronizar a expressão desses genes, e nem do receptor de endotelina.

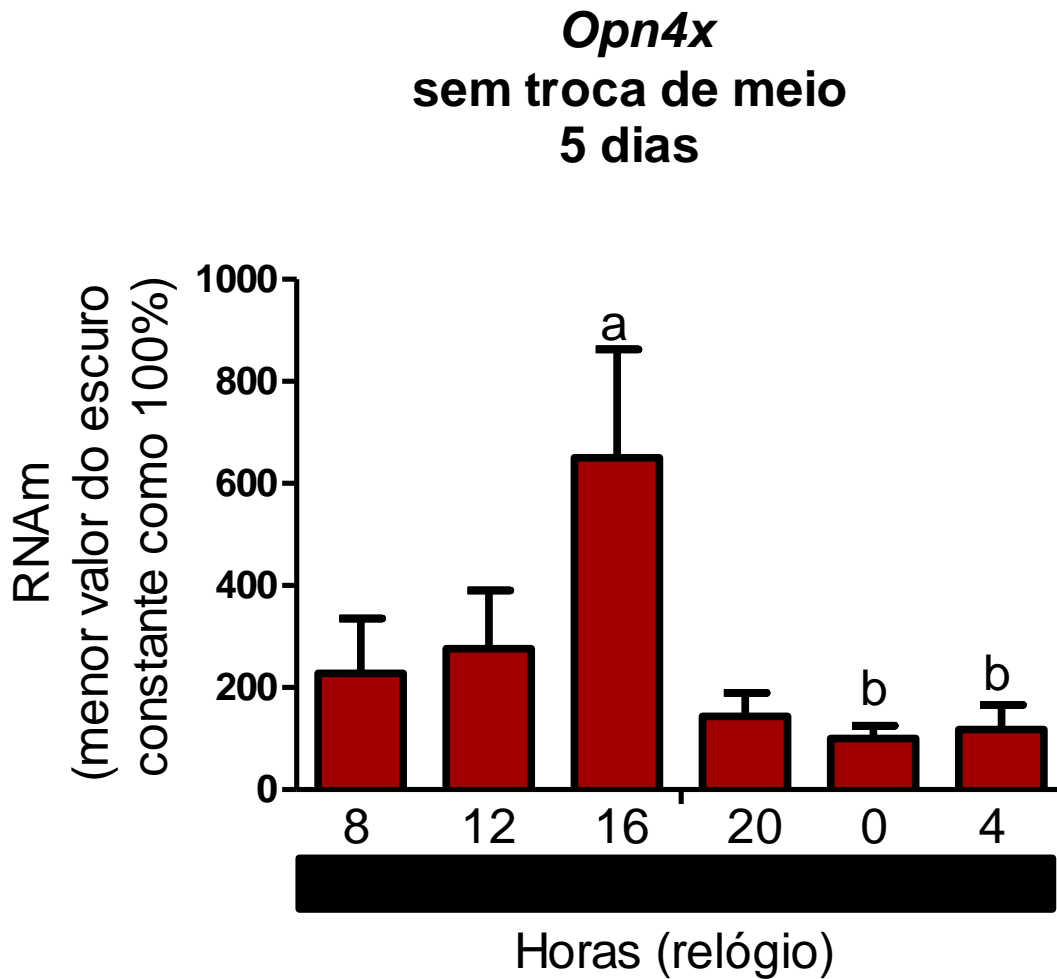


Figura 10 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias antes do início da extração do RNA total, e não foram submetidas a troca de meio durante esse período. Valores são a média \pm EPM ($n=4$) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0376$).

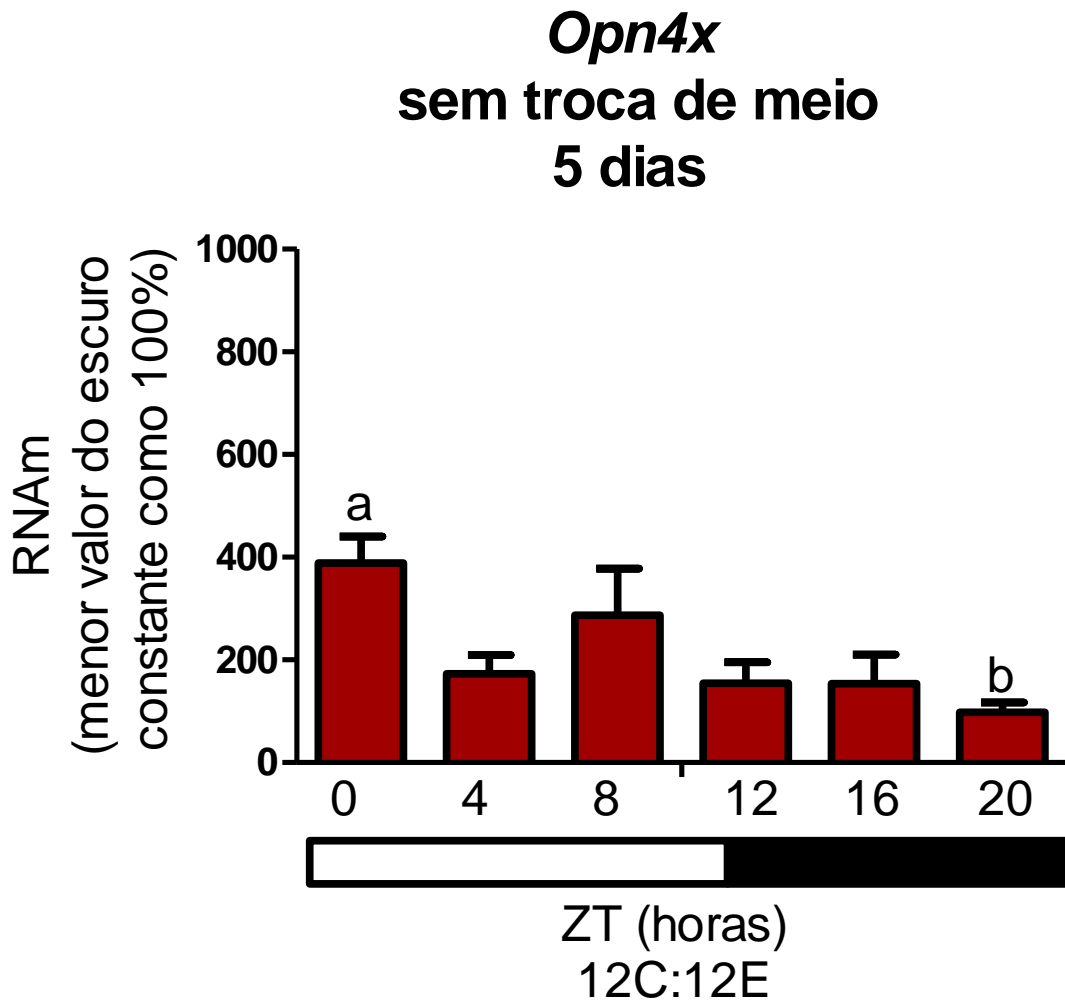


Figura 11 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias antes do início da extração do RNA total, e não foram submetidas a troca de meio durante esse período. Valores são a média \pm EPM (n=8) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0251$).

2. Quantificação dos níveis de RNAm das melanopsinas (*Opn4m* e *Opn4x*) e do receptor de endotelina em resposta a endotelina

As células foram mantidas em escuro constante ou em regime de 12C:12E por 5 dias. No início da fase clara do 6º dia as células foram tratadas com endotelina 10^{-9} ou 10^{-8} M por 6 horas; controles foram mantidos nas mesmas condições, onde o meio era trocado obedecendo ao protocolo do tratamento hormonal.

2.1. *ET_c*

A expressão de RNAm do receptor de endotelina, subtipo *ET_c*, mostrou um grande aumento em todos os ZTs, quando comparados ao ZT12, em células mantidas em escuro constante e submetidas a troca de meio, porém as diferenças estatísticas foram significativas somente nos ZT4 e ZT12 (Figura 12). Esse aumento foi de aproximadamente 20 vezes em relação ao ZT de menor expressão (ZT12). Quando a troca de meio foi associada ao fotoperíodo 12C:12E, houve uma drástica inibição dos transcritos em relação aos valores do escuro constante. Um pequeno aumento de expressão foi observado no ZT20, na fase de escuro, com um aumento de 2 vezes em relação ao ZT de menor expressão (Figura 13). Esses resultados indicam que o regime fotoperiódico de 12C:12E somado a uma troca de meio não é capaz de sincronizar a expressão de *ET_c*, e que este

regime inibe fortemente a transcrição desse gene. A expressão de RNAm do receptor de endotelina, subtipo *ET_c*, mostrou um grande aumento em todos os ZTs, quando comparados ao ZT12, em células mantidas em escuro constante e submetidas a troca de meio, porém as diferenças foram estatisticamente significativas somente entre ZT4 e ZT12 (Figura 12). Esse aumento foi de aproximadamente 20 vezes em relação ao ZT de menor expressão (ZT12). Quando a troca de meio foi associada ao fotoperíodo 12C:12E, houve uma drástica inibição dos transcritos em relação aos valores do escuro constante. Um pequeno aumento de expressão foi observado no ZT20, na fase de escuro, com um aumento de 2 vezes em relação ao ZT de menor expressão (Figura 13). Esses resultados indicam que o regime fotoperiódico de 12C:12E somado a uma troca de meio não é capaz de sincronizar a expressão de *ET_c*, e que este regime inibe fortemente a transcrição desse gene.

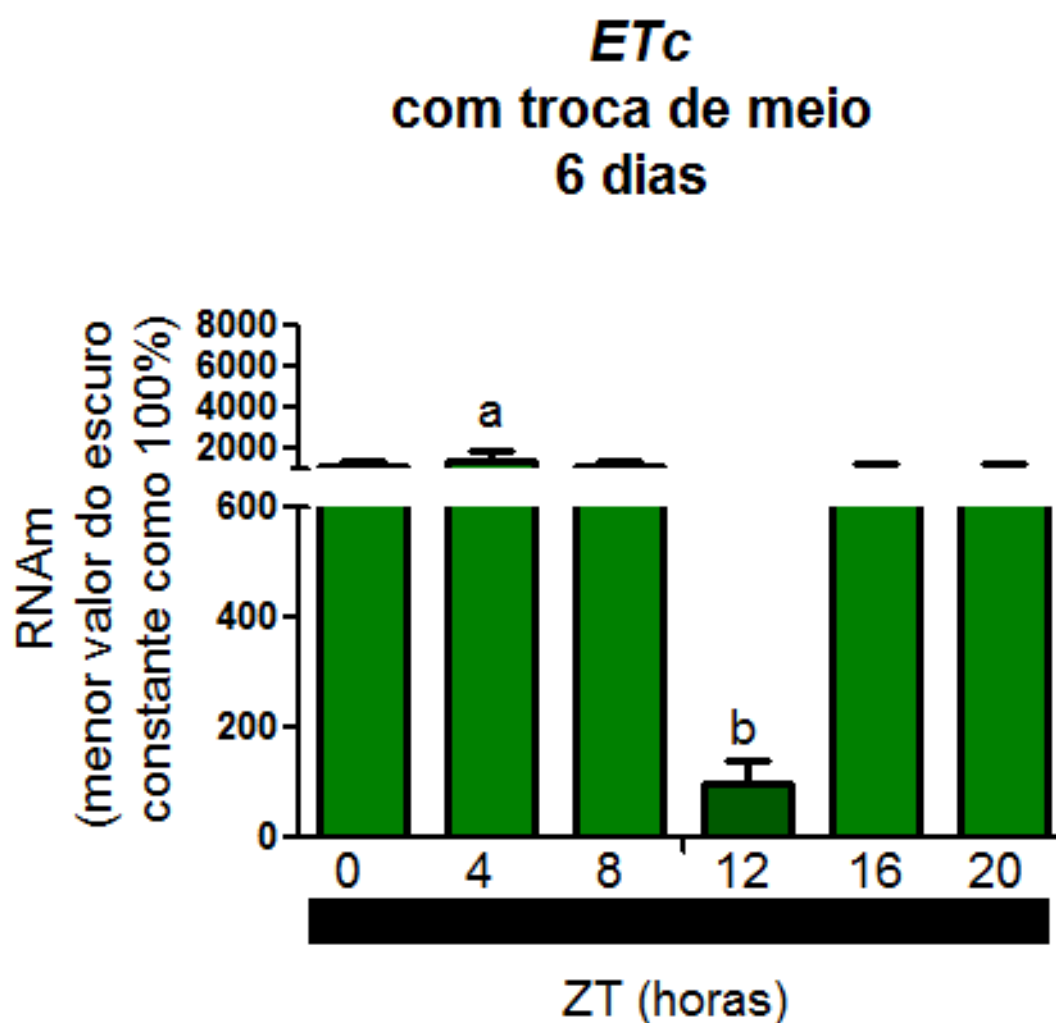


Figura 12 – PCR quantitativo para *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início do sexto dia às 8 horas (ZT0) e uma segunda troca de meio após 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=8) do gene *ET_C* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0492$).

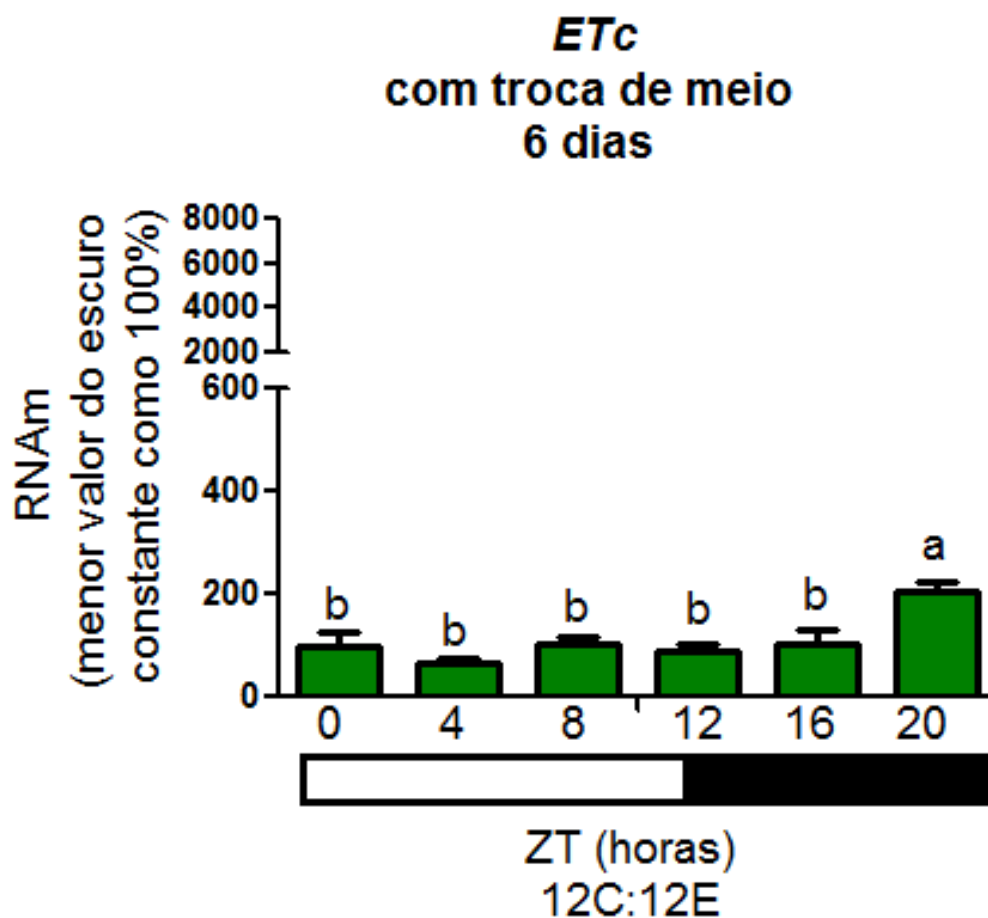


Figura 13 – PCR quantitativo para *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início da fase clara do 6^o dia e uma segunda troca de meio após 6h. Valores são a média \pm EPM (n=8) do gene *ET_C* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0012$).

Utilizando os mesmos protocolos experimentais, escuro constante ou 12C:12E, porém com tratamento hormonal, nossa hipótese era que endotelina seria capaz de sincronizar a expressão de *ET_C*.

Quando as células foram mantidas em escuro constante e tratadas com endotelina-3 10^{-9} M, houve um aumento da transcrição às 12 e às 16 horas (ZTs 4 e 8) (Figura 14), decrescendo até atingir ZT de menor expressão (ZT20). Embora esse aumento tenha sido estatisticamente significativo, a análise por COSANA não mostrou nenhum padrão de oscilação rítmica. Já o tratamento nesta mesma condição fotoperiódica, porém com maior concentração de endotelina-3, 10^{-8} M, não apresentou variação estatisticamente significativa ao longo dos ZTs analisados (Figura 15), e dessa forma não foi possível aplicar a análise por COSANA. Quando o tratamento hormonal foi feito em fotoperíodo 12C:12E, não foi verificada nenhuma alteração significativa ao longo das 24 horas, tanto com endotelina 10^{-9} M (Figura 16), como 10^{-8} M (Figura 17). Porém, em ambos os tratamentos, foi observada uma tendência de aumento da transcrição no ZT8 (fase clara) e de menor expressão no ZT20 (fase escura). Esses resultados indicam que a transcrição do RNAm para o receptor de endotelina não é sincronizada por nenhum dos tratamentos utilizados: fotoperíodo, troca de meio, endotelina, e nem pela associação de duas dessas variáveis, como foi o caso do fotoperíodo associado a troca de meio.

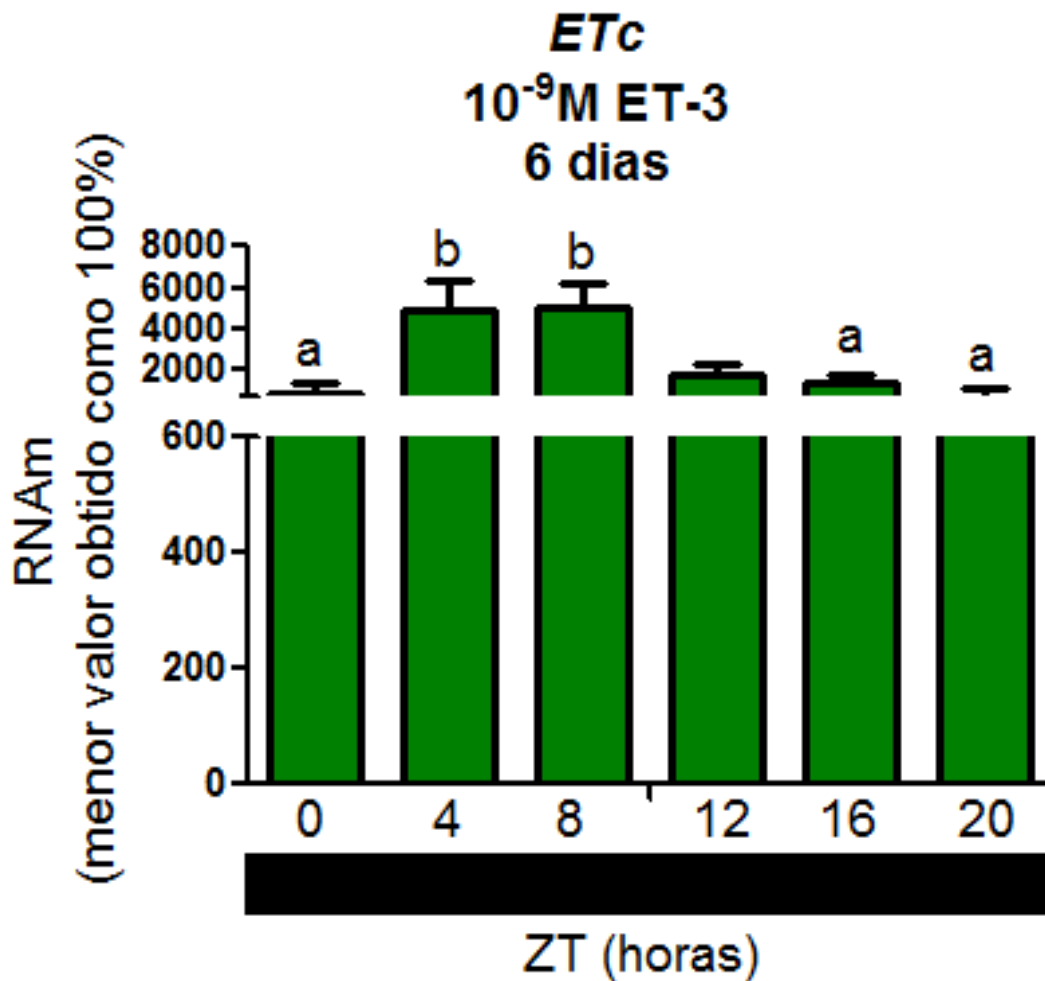


Figura 14 – PCR quantitativo para *ET_c* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10⁻⁹M por 6 horas. Valores são a média ± EPM (n=8) do gene *ET_c* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com p=0,0005).

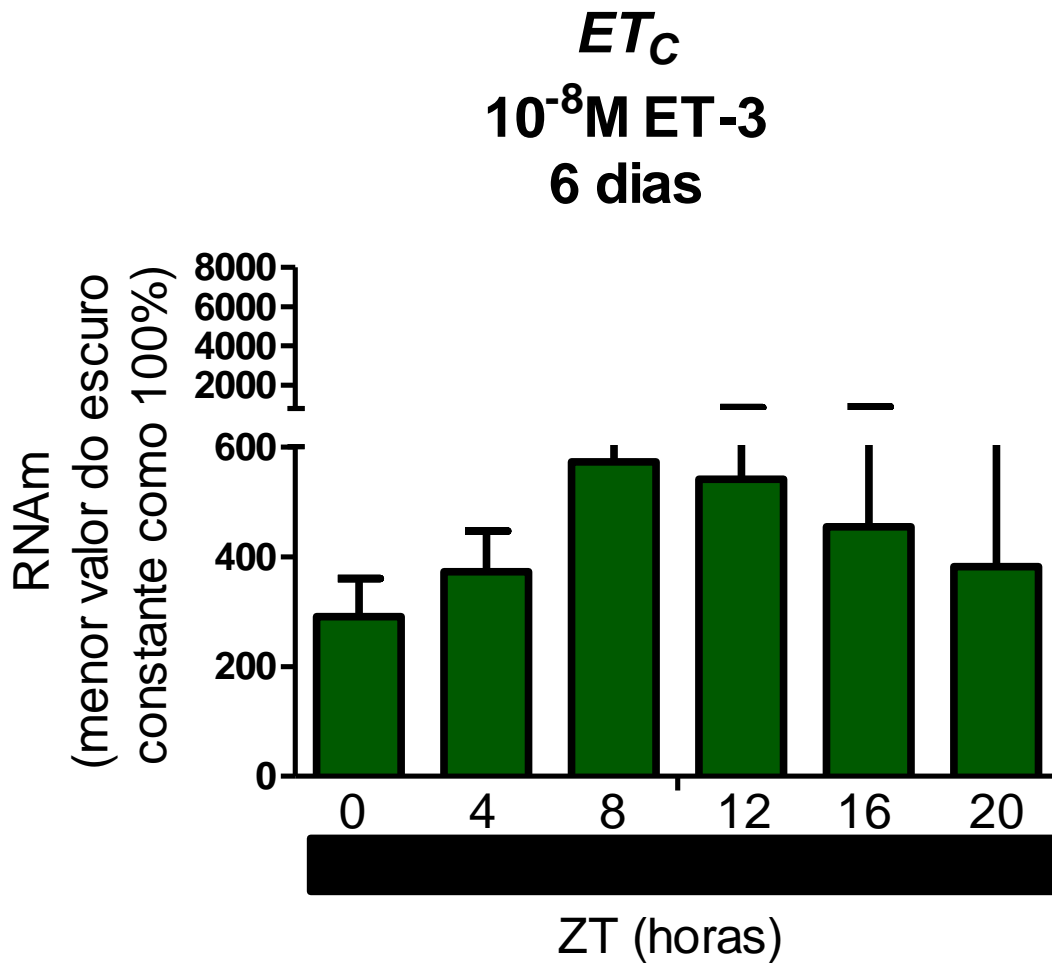


Figura 15 – PCR quantitativo para ET_C em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 $10^{-8}M$ por 6 horas. Valores são a média \pm EPM ($n=6$) do gene ET_C normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tempos.

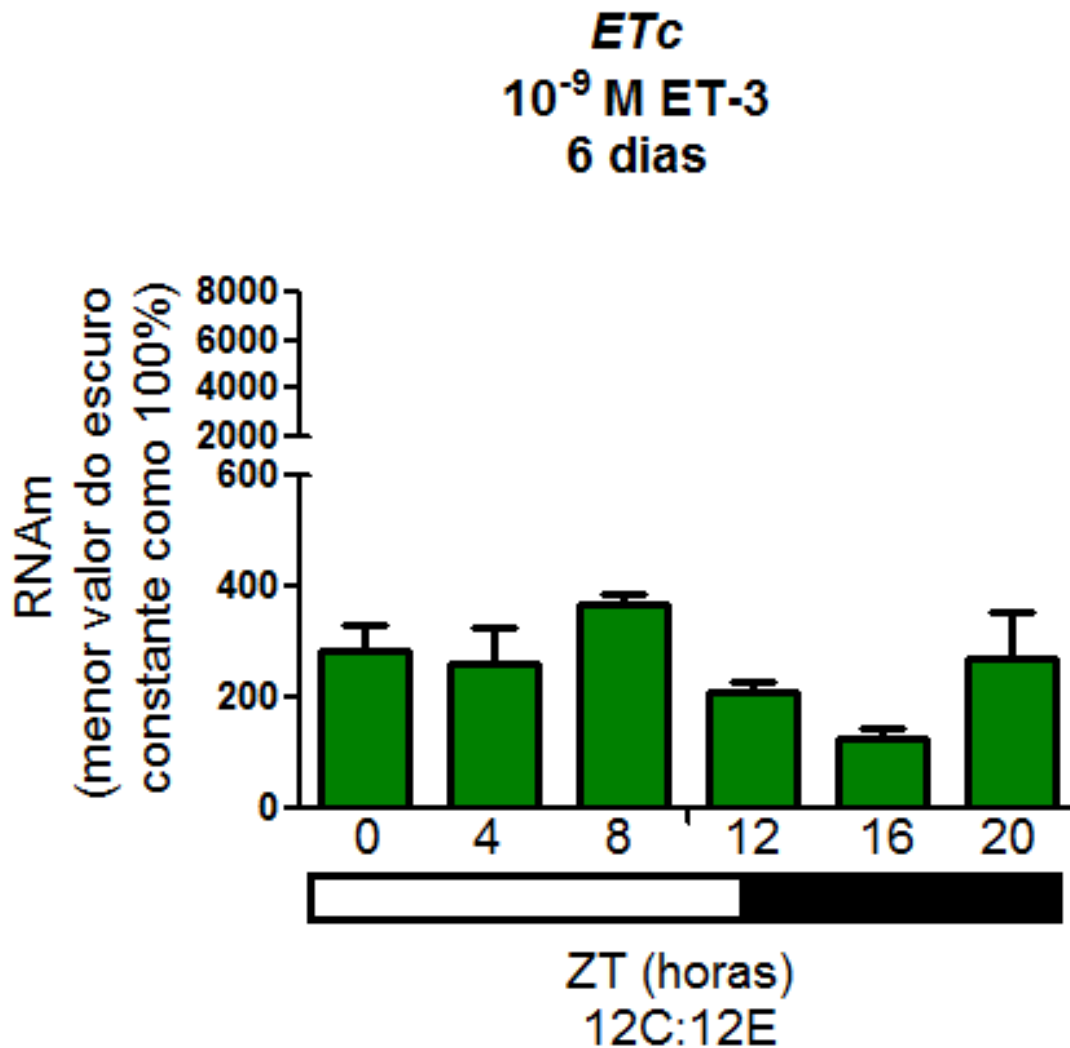


Figura 16 – PCR quantitativo para *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina. As células permaneceram em regime de 12C:12E por 5 dias. No início da fase clara do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10⁻⁹M por 6 horas. Valores são a média ± EPM (n=8) do gene *ET_C* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tempos.

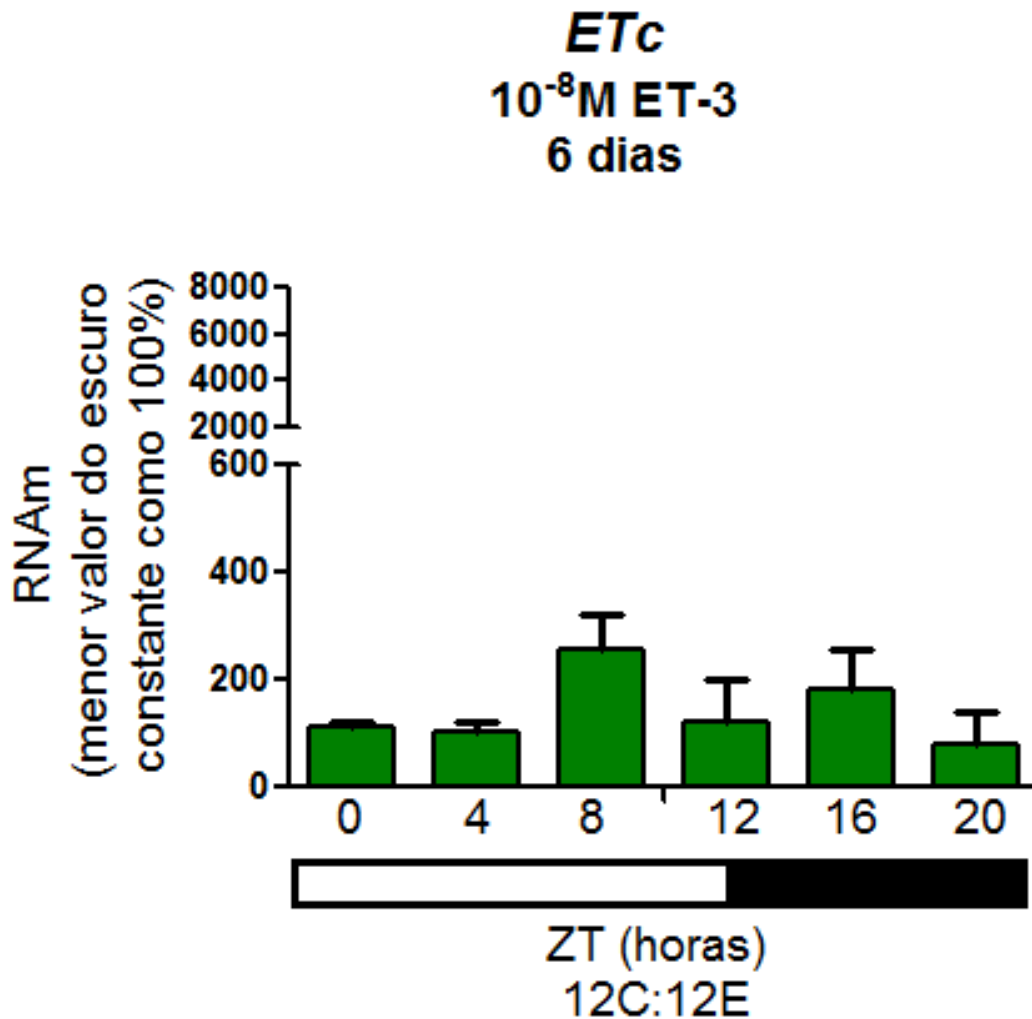


Figura 17 - PCR quantitativo para *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina. As células permaneceram em regime de 12C:12E por 5 dias. No início da fase clara do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10⁻⁸M por 6 horas. Valores são a média ± EPM (n=8) do gene *ET_C* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tempos.

Em escuro constante, o tratamento com endotelina 10⁻⁹M exerceu efeito modulando a transcrição do RNAm do receptor de

endotelina de forma positiva. A expressão de ET_C mostrou aumento dos transcritos nos ZTs 4, 8 12 (Figura 18), sendo que nos ZTs 4 e 8 houve uma forte ativação da transcrição, de cerca de cinco vezes quando comparado ao seu controle. Na mesma condição fotoperiódica, o tratamento com endotelina $10^{-8}M$ não exerceu efeito modulando a transcrição do RNAm do receptor de endotelina. Porém é possível notar uma tendência de inibição da transcrição nos ZTs 0 e 4 e um aumento no ZT12 (Figura 19).

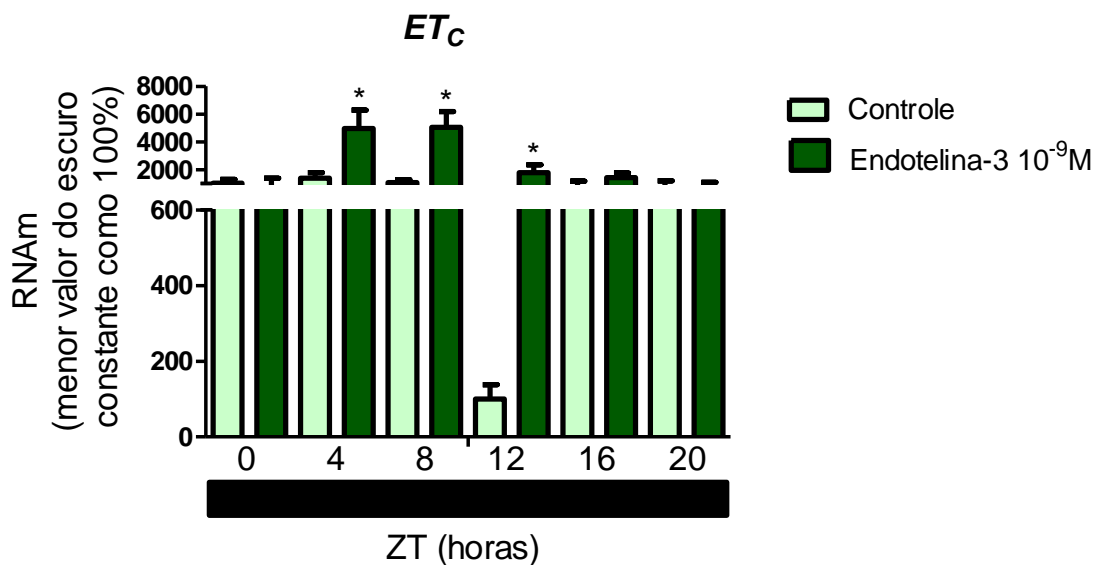


Figura 18 – PCR quantitativo para ET_C em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina $10^{-9}M$. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina $10^{-9}M$ no início do 6º dia (ZT0, as 8horas) por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=8-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene ET_C normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por

teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$.

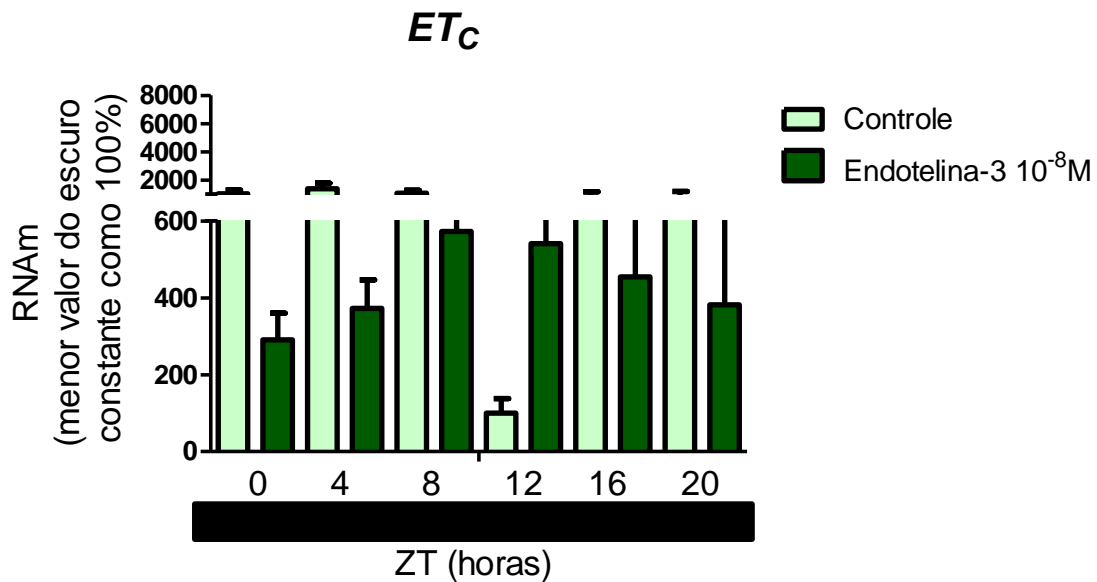


Figura 19 – PCR quantitativo para *ET_c* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina 10⁻⁸M. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina 10⁻⁸M no início do 6^o dia (ZT0, as 8 horas) por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média ± EPM (n=8) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *ET_c* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%.

O tratamento com endotelina-3 10⁻⁹M em regime 12C:12E promoveu forte ativação da transcrição nos ZTs que correspondem a fase clara (ZTs 0, 4 e 8) e a fase de transição do claro para o escuro (ZT12) (Figura 20). No ZT que apresentou um pico de expressão

(ZT8), foi observado um aumento de quase 3 vezes em comparação ao seu respectivo controle.

O receptor de endotelina sofre tanto estimulação quanto inibição da transcrição quando tratado com endotelina 10^{-8} M em regime 12C:12C, apresentando aumento da produção do RNAm na fase clara, ZT8, e inibição na fase escura, ZT20 (Figura 21).

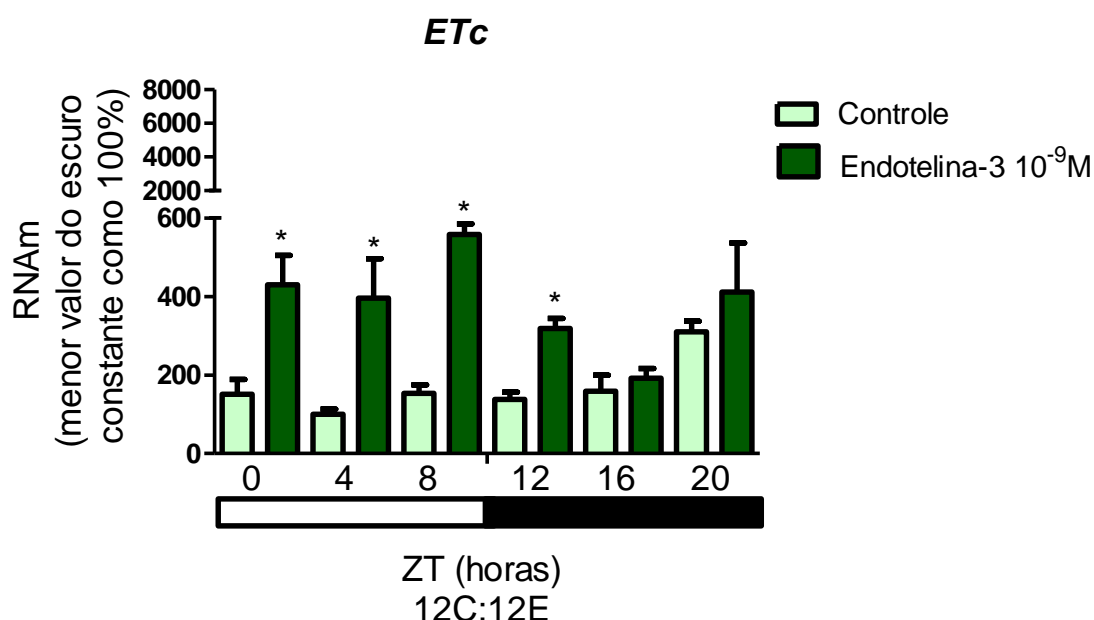


Figura 20 – PCR quantitativo para *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-9} M. As células permaneceram em 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina 10^{-9} M no início da fase clara do 6º dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=8) do no grupo controle e (n=4) no grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *ET_C* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste t de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$.

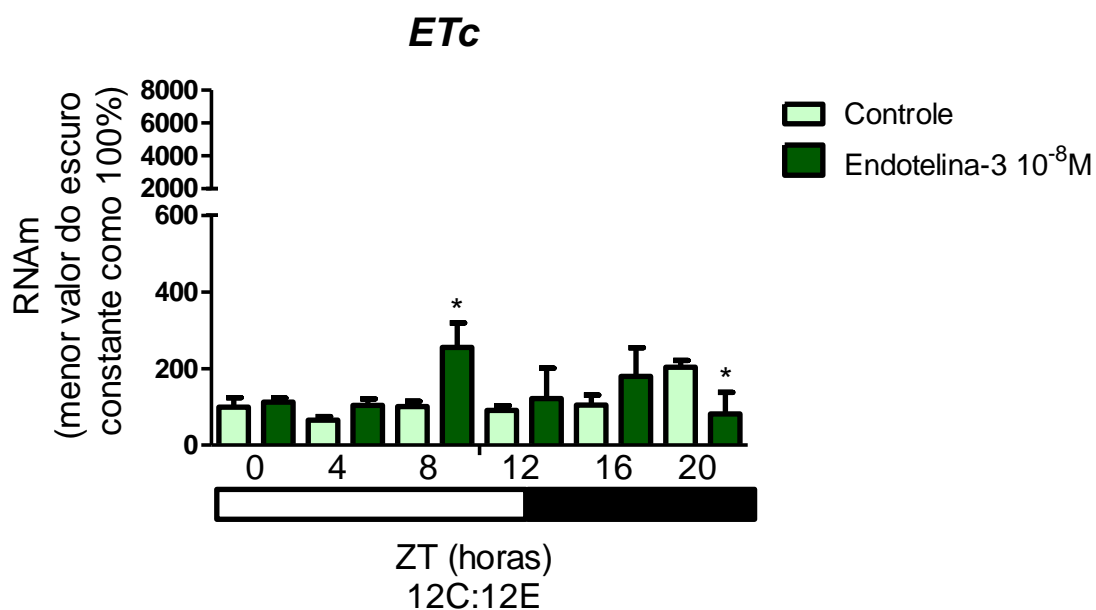


Figura 21 – PCR quantitativo para *ET_C* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10⁻⁸M. As células permaneceram em 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10⁻⁸M no início da fase clara do 6^o dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média ± EPM (n=8) do no grupo controle e (n=4) no grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *ET_C* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, p<0,05.

2.2. *Opn4m*

Quando as células foram mantidas em escuro constante associado a uma troca de meio, *Opn4m*, apresentou um forte aumento na produção do RNAm no ZT8, quando comparado aos ZTs 0, 4, 12, 16 (Figura 22). Em comparação ao ZT de menor expressão, ZT16, o ZT8 apresentou um aumento de aproximadamente 18 vezes. Embora a análise por ANOVA One Way tenha apontado diferenças significativas entre os tempos, a análise por COSANA não mostrou um padrão rítmico de transcrição.

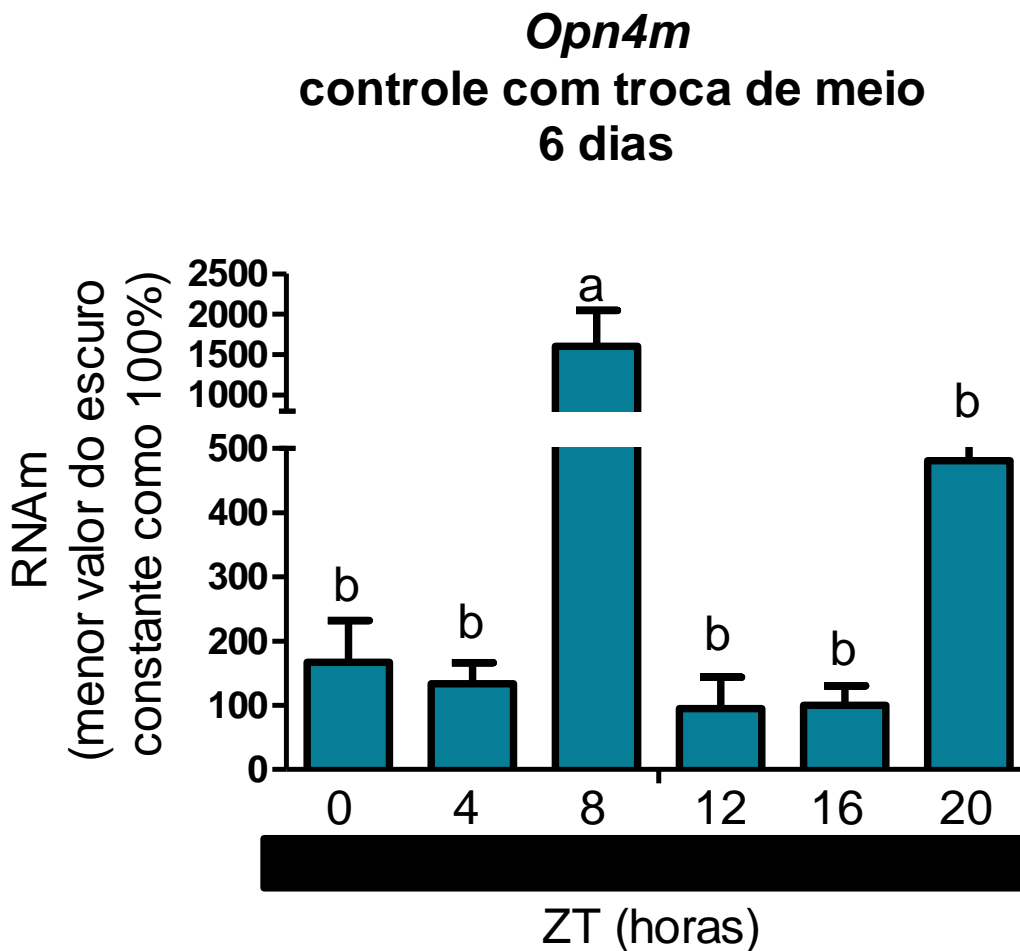


Figura 22 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início do 6º dia às 8 horas (ZT0) e uma segunda troca de meio após 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0001$).

Quando as células foram mantidas em ciclo de claro-escuro de 12C:12E, o momento de maior expressão foi representado pelo ZT4 (Figura 23), demonstrando um aumento da transcrição na fase clara. Durante a fase escura foi observada uma diminuição da transcrição, evidenciada pelo valor em ZT12, quando comparado ao ZT4. Nesta condição de fotoperíodo foi possível identificar um padrão de oscilação rítmica, com período de 21 horas (Figura 24). Análise por COSANA aponta uma probabilidade de ritmo circadiano de %R= 92,82.

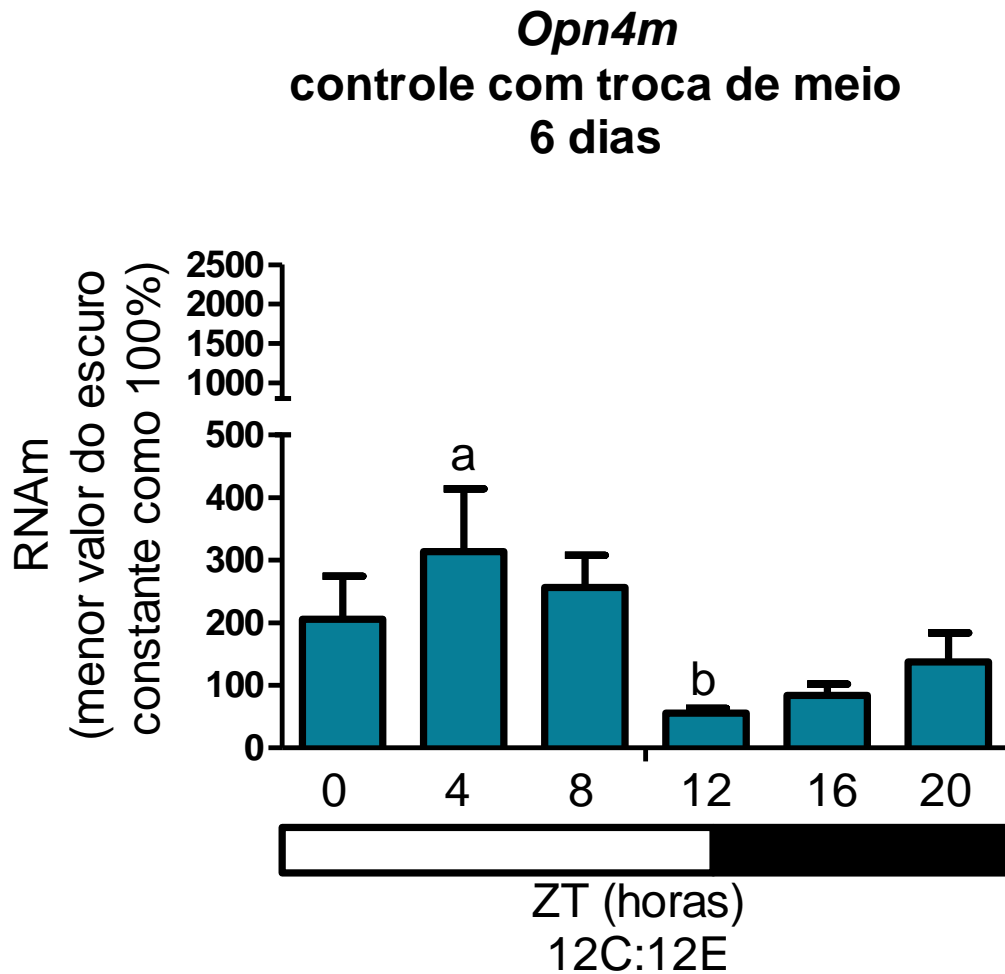


Figura 23 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em regime de fotoperíodo 12C:12E. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início da fase clara do 6º dia às 8 horas (ZT0) e uma segunda troca de meio após 6 horas. Valores são a média \pm EPM ($n=10-12$) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0001$).

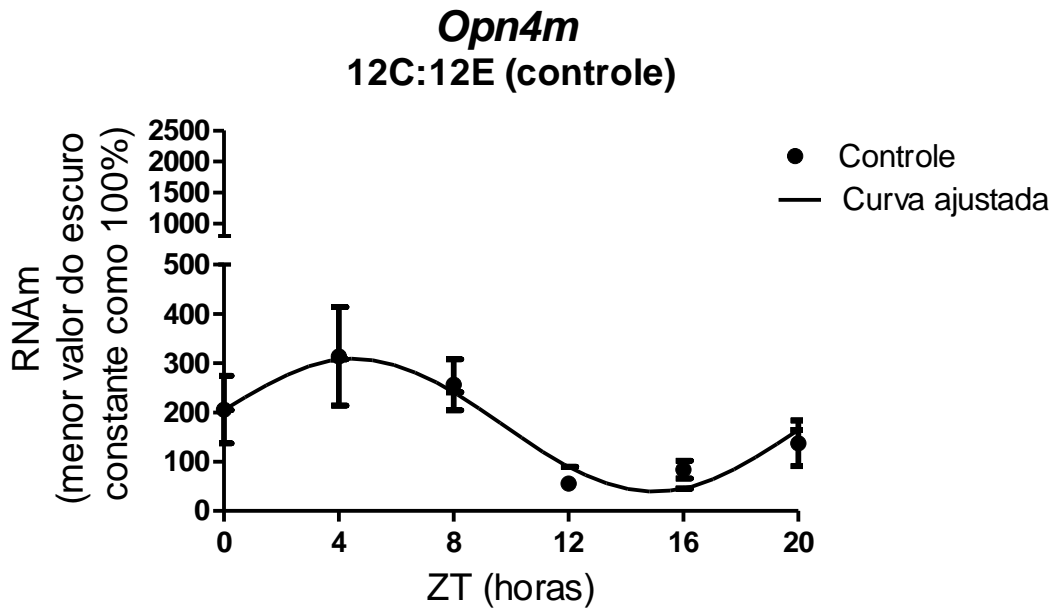


Figura 24 – Ajuste de curva pelo software COSANA da expressão temporal de *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis*. As células foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início da fase clara do 6º dia e uma segunda troca de meio após 6 horas. Análise por COSANA mostrou um padrão circadiano na expressão de *Opn4m*, probabilidade de ritmo circadiano de $R=92,82\%$ e $p=0,019$, para período de 21 horas.

Utilizando os mesmos protocolos experimentais, escuro constante ou 12C:12E, porém com tratamento hormonal, nossa hipótese era que endotelina seria capaz de sincronizar a expressão de *Opn4m*.

O tratamento com endotelina-3 $10^{-9}M$ em condição de escuro constante exerceu efeito estimulando a transcrição do RNAm para *Opn4m* no ZT16, quando comparado aos demais ZTs (Figura 25). O ponto de maior expressão foi evidenciado pelo ZT16, o qual apresentou 15 vezes maior produção de RNAm que o ponto de menor

expressão (ZT0). Análise por COSANA não mostrou nenhum padrão rítmico de transcrição para *Opn4m* nesta condição. O tratamento com endotelina-3 10^{-8} M na mesma condição mostrou um aumento da transcrição no ZT20 quando comparado ao ZT16 de aproximadamente 7 vezes (Figura 26). Análise por COSANA não mostrou um padrão circadiano de expressão deste gene (probabilidade de ritmo circadiano de 33,74).

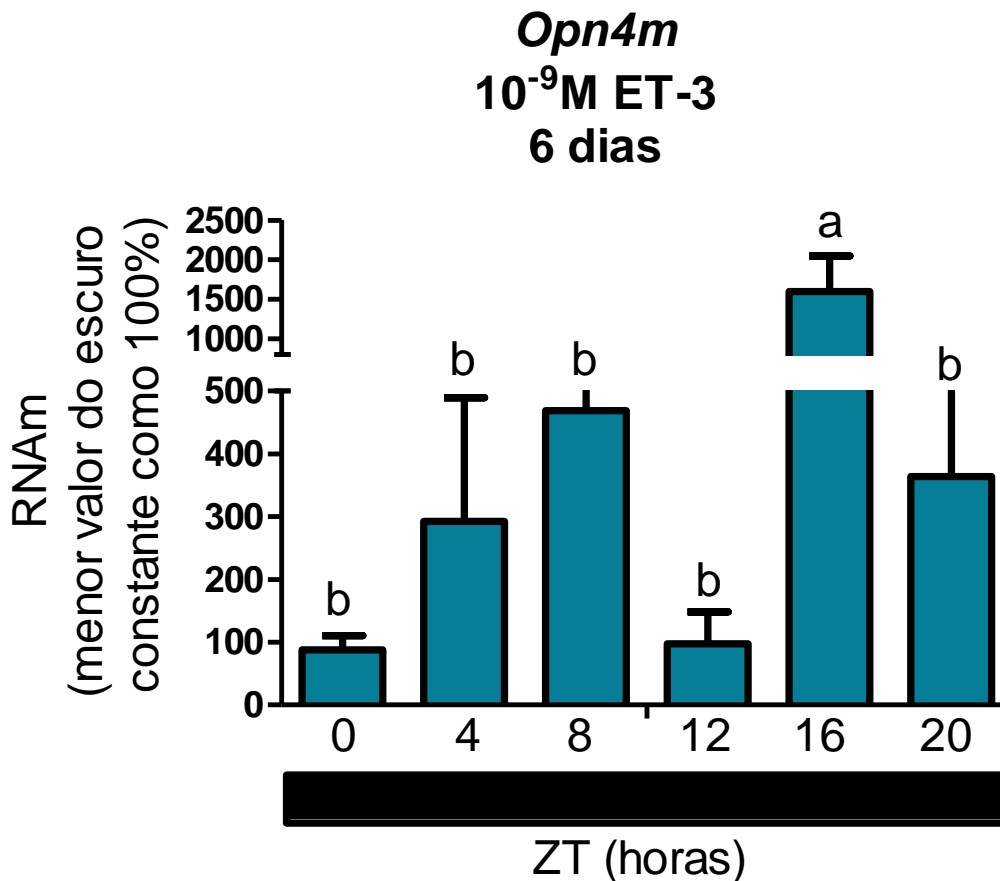


Figura 25- PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10^{-9} M por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=6) do gene

Opn4m normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,005$).

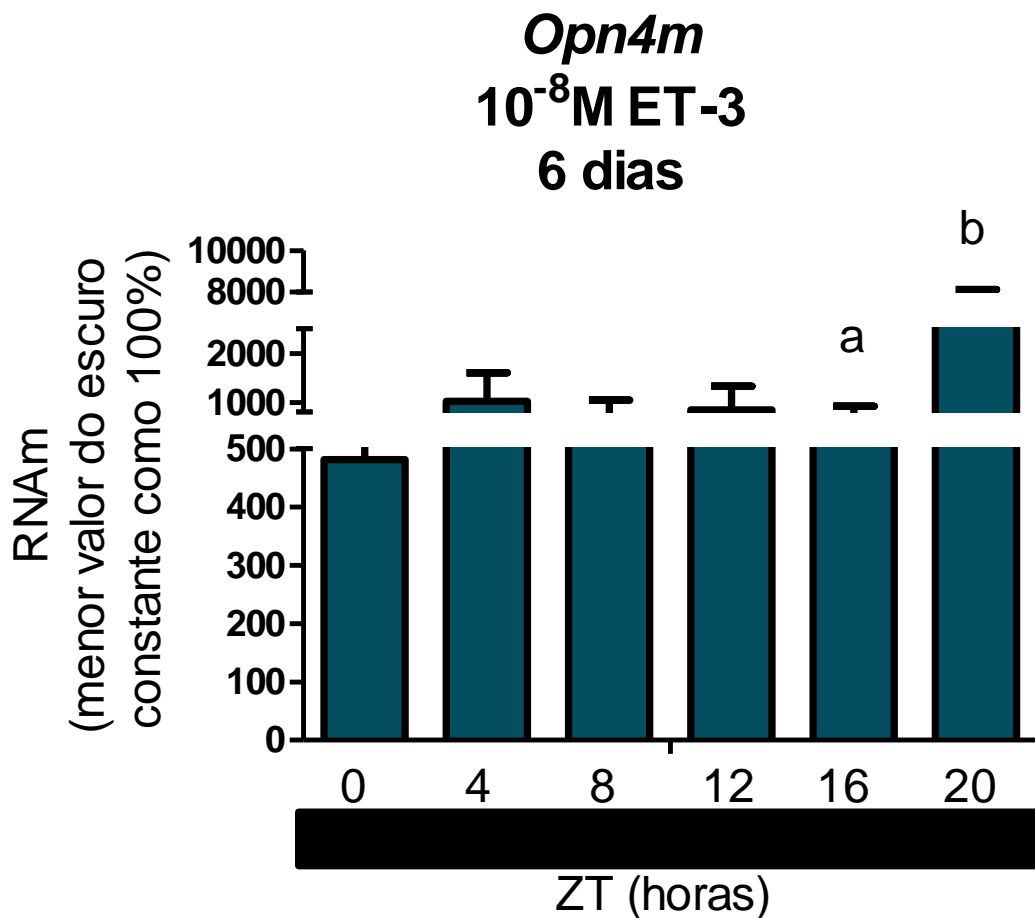


Figura 26 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10^{-8} M por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0368$).

Quando as células foram tratadas com ET-3 10^{-9} M em fotoperíodo 12C:12E, foi observado o desaparecimento do padrão de ritmicidade, apesar da análise por ANOVA One Way ter mostrado variação estatística entre os tempos ($p=0,0260$). Embora ET-3 10^{-9} M não tenha sido capaz de manter a sincronização da expressão desse gene, o tratamento demonstrou modulação da transcrição em fotoperíodo 12C:12E, com ponto máximo de expressão no ZT4, em comparação ao ZT8 de menor expressão, ambos na fase clara (Figura 27). O tratamento com endotelina 10^{-8} M em fotoperíodo 12C:12E, embora não apresente diferença estatística significativa, apresenta uma tendência em aumentar a transcrição na fase clara, ZT0 (Figura 28), e também aboliu a ritmicidade.

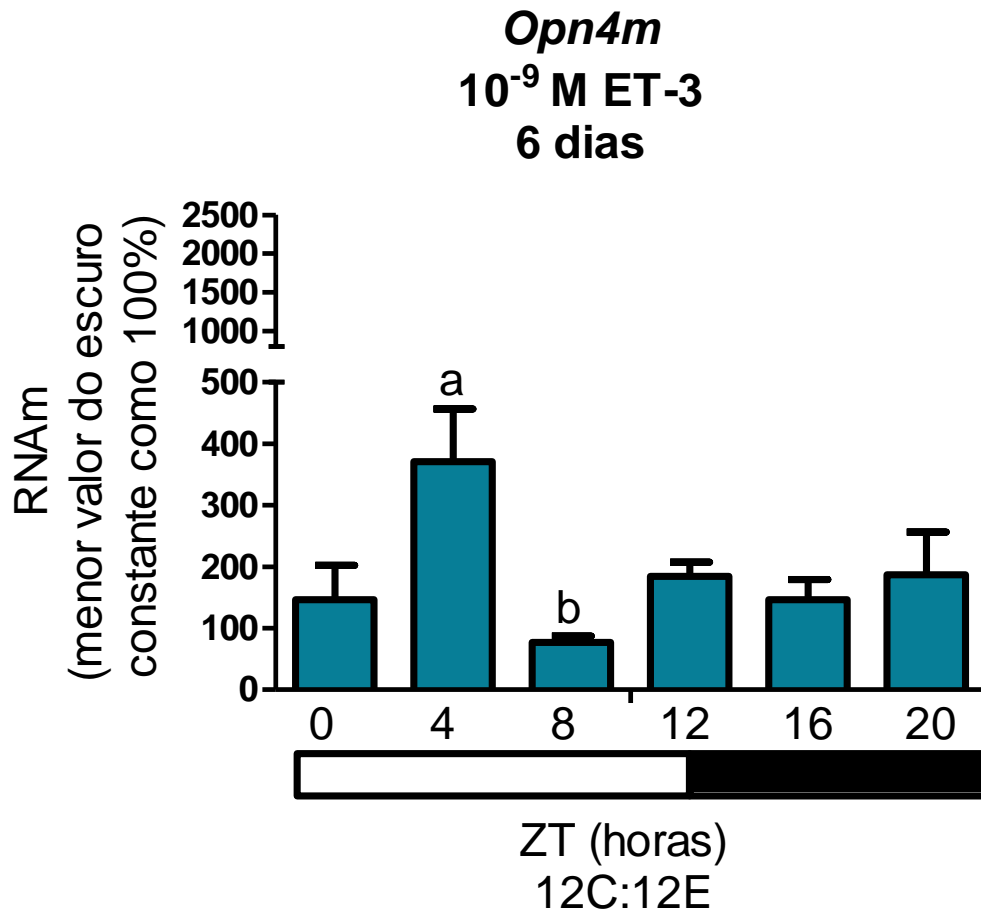


Figura 27 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em regime de fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10⁻⁹M. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias. No início da fase clara do 6º dia, ZT0, as células foram tratadas com ET-3 10⁻⁹M por 6 horas. Valores são a média ± EPM (n=4) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com p=0,0260).

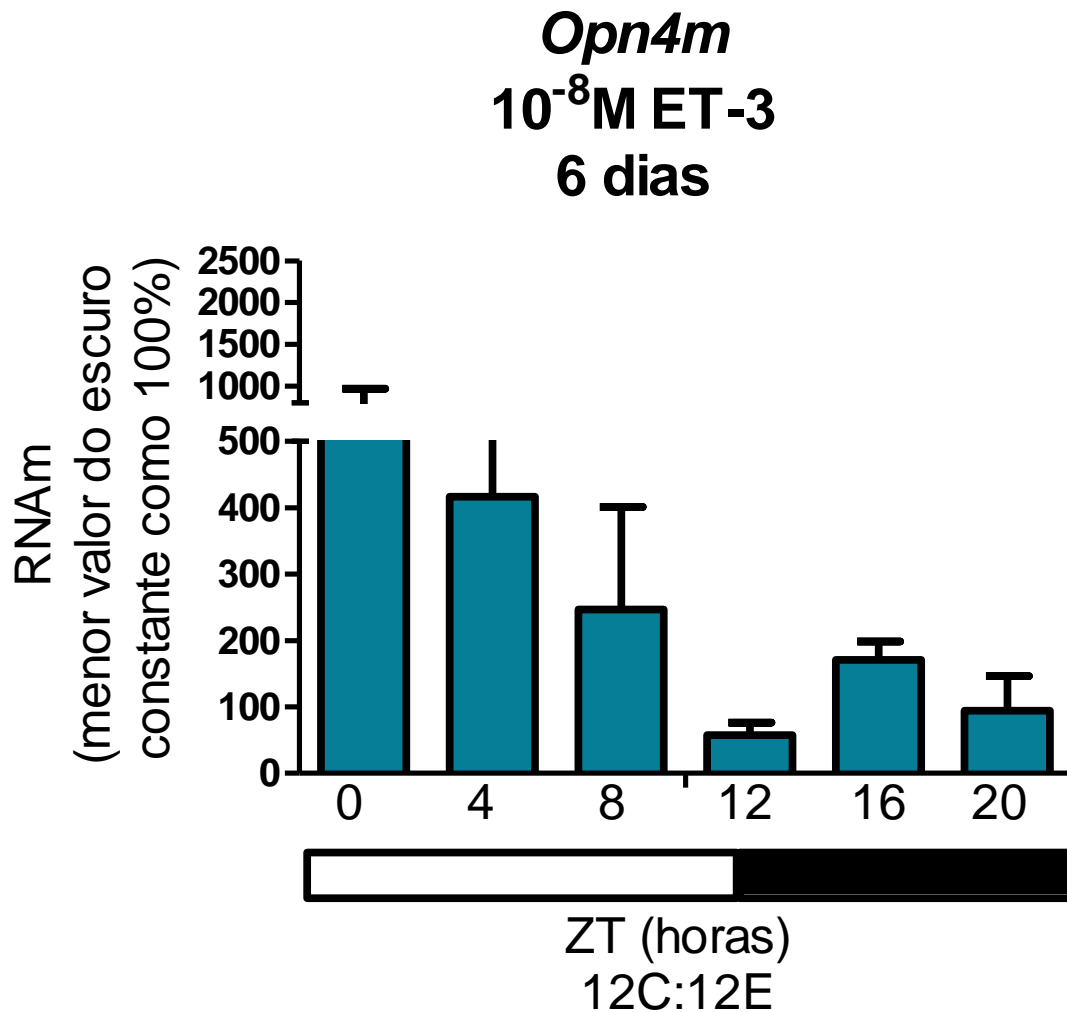


Figura 28 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em regime de fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-8} M. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias. No início da fase clara do 6º dia, ZT0, as células foram tratadas com ET-3 10^{-8} M por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene *Opn4m* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA não mostrou diferença significativa entre os tempos ($p > 0,05$).

Quando as células foram mantidas em escuro constante, e tratadas ou não com endotelina-3 10^{-9} M por 6 horas, a expressão do

gene *Opn4m* foi alterada de forma positiva no ZT16, quando comparado ao seu respectivo controle (Figura 29), apresentando uma forte ativação da transcrição. Nos outros ZTs analisados o tratamento não exerceu efeito significativo. O tratamento com uma maior concentração, $10^{-8}M$, de endotelina-3, alterou significativamente a expressão de *Opn4m* nos ZTs 4, 12, 16 e 20, de forma acentuada, aumentando a transcrição do RNAm cerca de 8 vezes (ZT 4, 12 e 16), como mostrado na Figura 30.

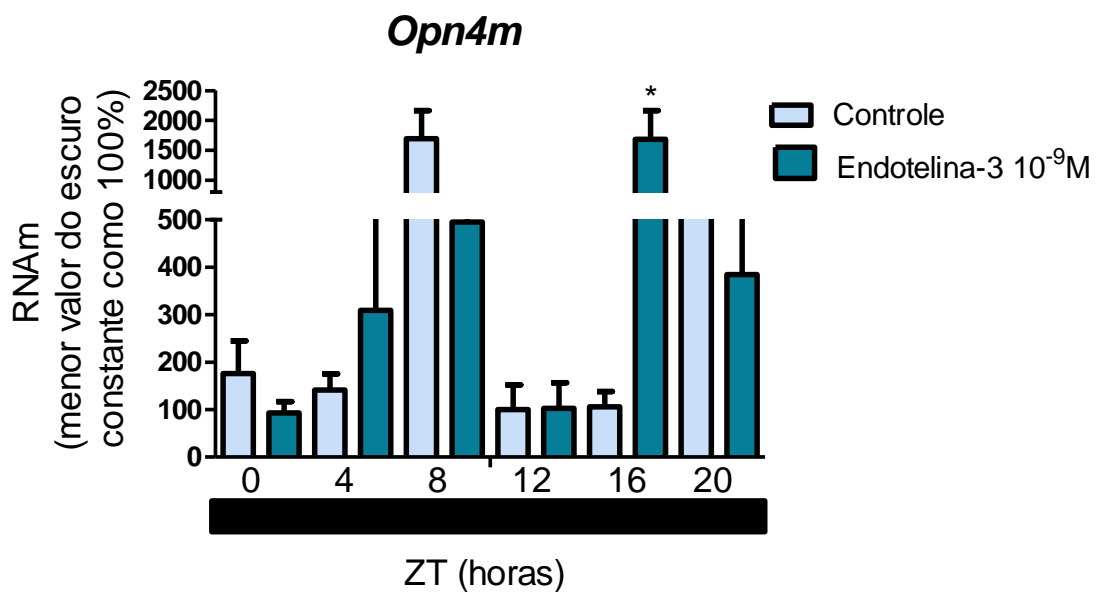


Figura 29 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina $10^{-9}M$. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 $10^{-9}M$ no início do 6º dia (ZT0) por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=6) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. *

Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$.

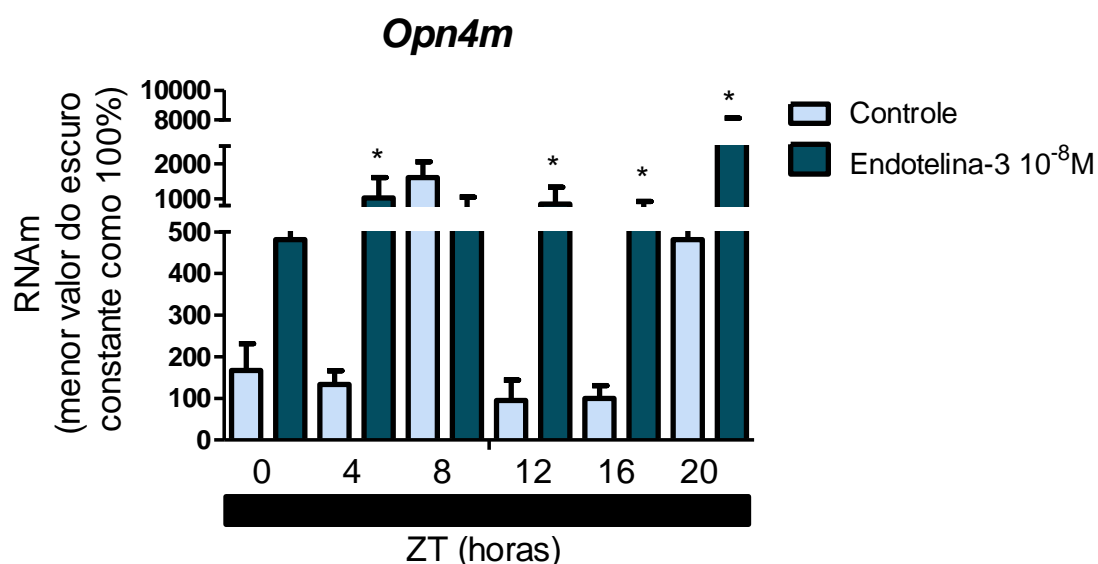


Figura 30 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina $10^{-8}M$. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 $10^{-8}M$ no início do 6º dia (ZT0) por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$.

Em fotoperíodo 12C:12E, o tratamento com endotelina-3 nas duas concentrações utilizadas apresentou efeito estimulando a transcrição do gene *Opn4m*. O tratamento com ET-3 $10^{-9}M$ aumentou a produção do RNAm deste gene no ZT12 (Figura 31), e o tratamento

com uma maior concentração, ET-3 10^{-8} M, apresentou efeito similar, estimulando a transcrição no ZT16 (Figura 32), ambos na fase escura.

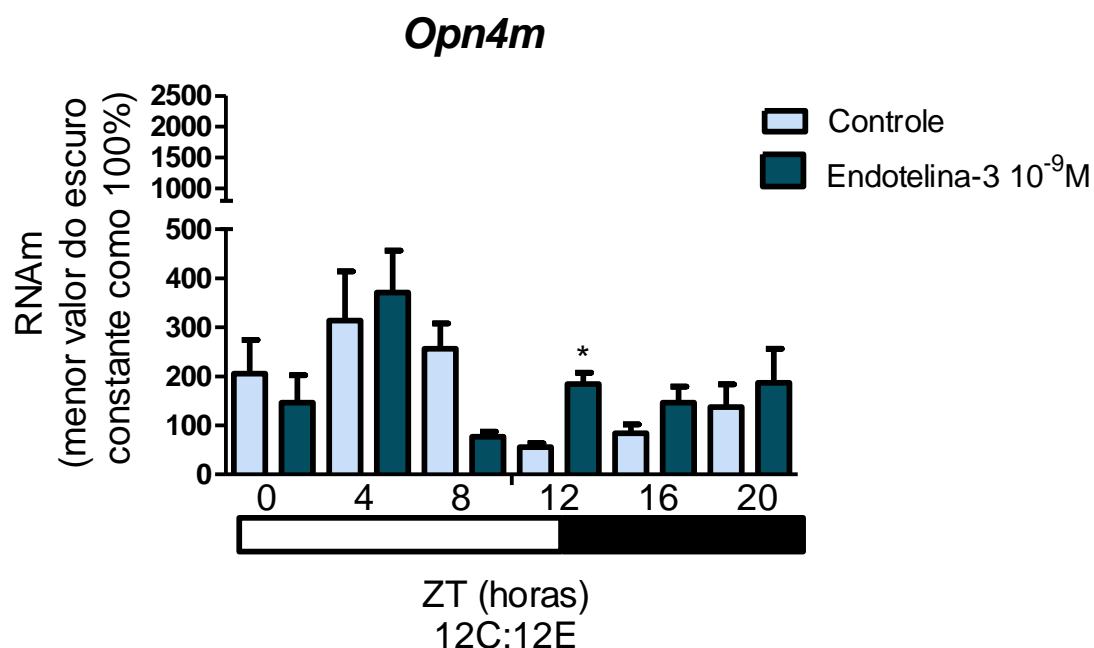


Figura 31 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-9} M. As células permaneceram em 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-9} M no início da fase clara do 6º dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$.

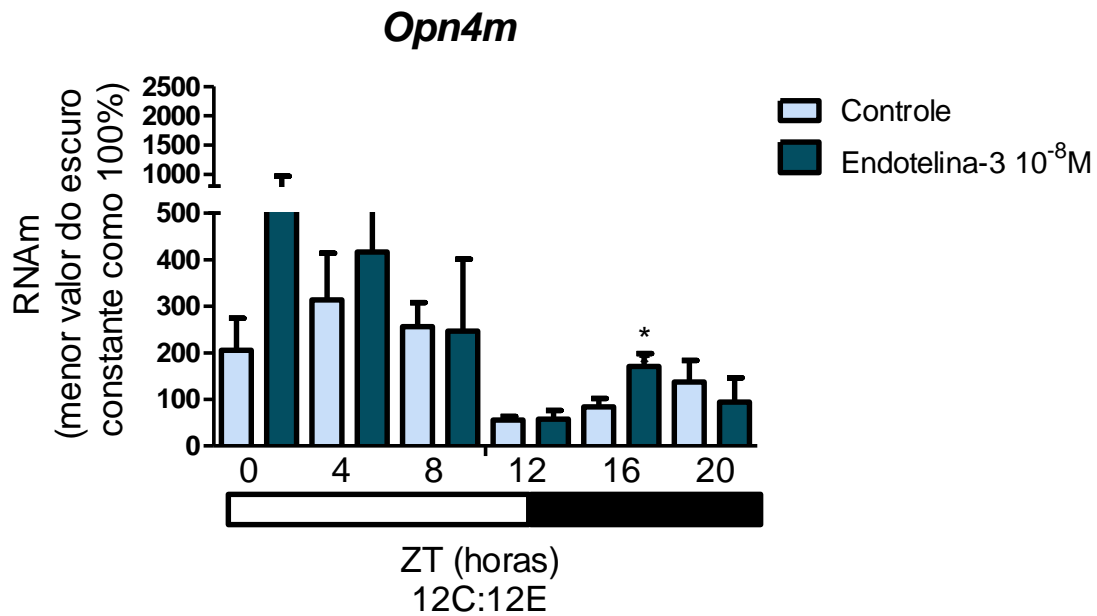


Figura 32 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10⁻⁸M. As células permaneceram em 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10⁻⁸M no início da fase clara do 6^o dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média ± EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, p<0,05.

2.3. *Opn4x*

Em condição de escuro constante associado a troca de meio, a expressão da melanopsina ortóloga de *Xenopus laevis*, *Opn4x*, apresentou um aumento de cerca de 15 vezes em sua expressão no ZT8, quando comparado ao ZT12, de menor expressão (Figura 33). Embora a análise estatística tenha indicado diferenças significativas ($p=0,0001$), nesta condição não foi possível identificar um padrão de expressão circadiano pela análise por COSANA.

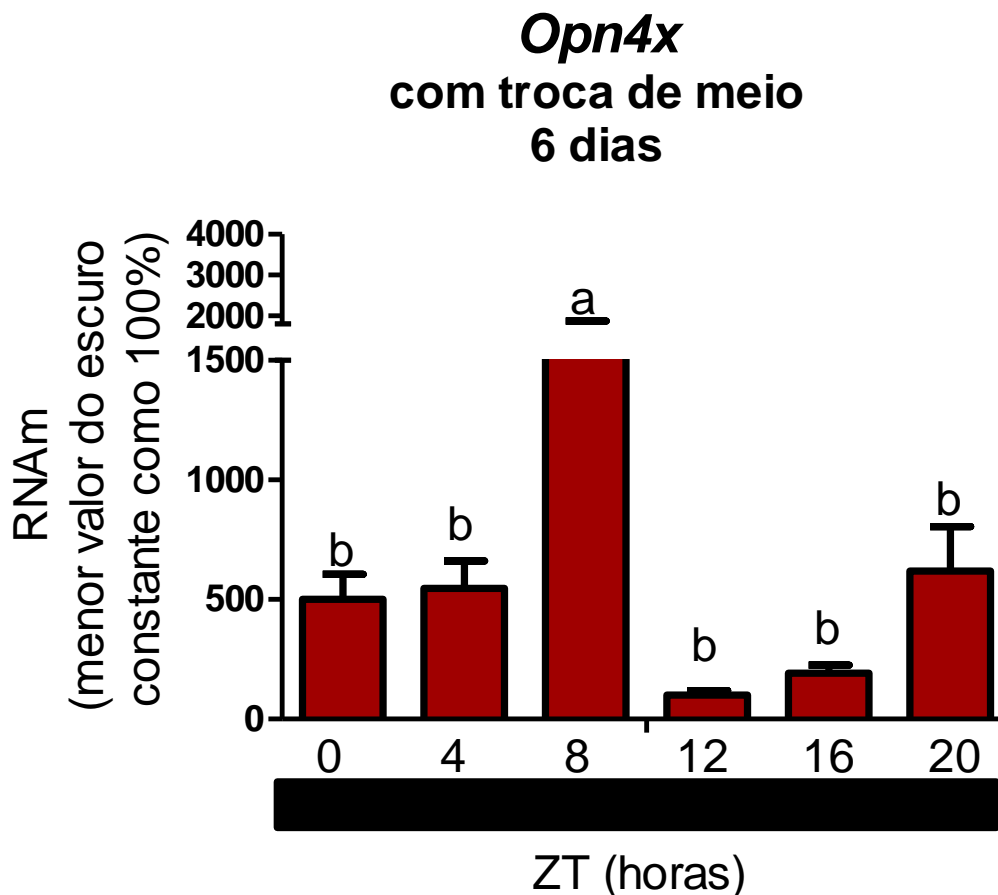


Figura 33 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis*

em escuro constante. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início do 6º dia às 8 horas (ZT0) e uma segunda troca de meio após 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0001$).

Em regime 12C:12E também associado a troca de meio, a produção de RNAm para este gene apresentou o maior valor no ZT4, que corresponde a fase clara, diminuindo ao longo dos ZTs, e tendo a menor expressão no ZT16 (Figura 34). Nesta condição, foi possível identificar um padrão de expressão circadiana pela análise por COSANA, com um período de 25 horas ($p=0,001$) (Figura 35).

No protocolo experimental na condição de escuro constante onde foi evidenciada variação na produção de RNAm do gene *Opn4x* entre os ZTs, a análise por COSANA foi aplicada para diferentes períodos (de 6 a 30 horas) e não foi possível verificar a presença de um padrão de expressão. Em oposição, no protocolo 12C:12E a análise rítmica evidenciou um forte padrão de expressão circadiano (Figura 34). Esses resultados indicam que a associação do fotoperíodo a troca de meio é capaz de sincronizar a expressão do RNAm para *Opn4x*, mostrando um robusto padrão circadiano.

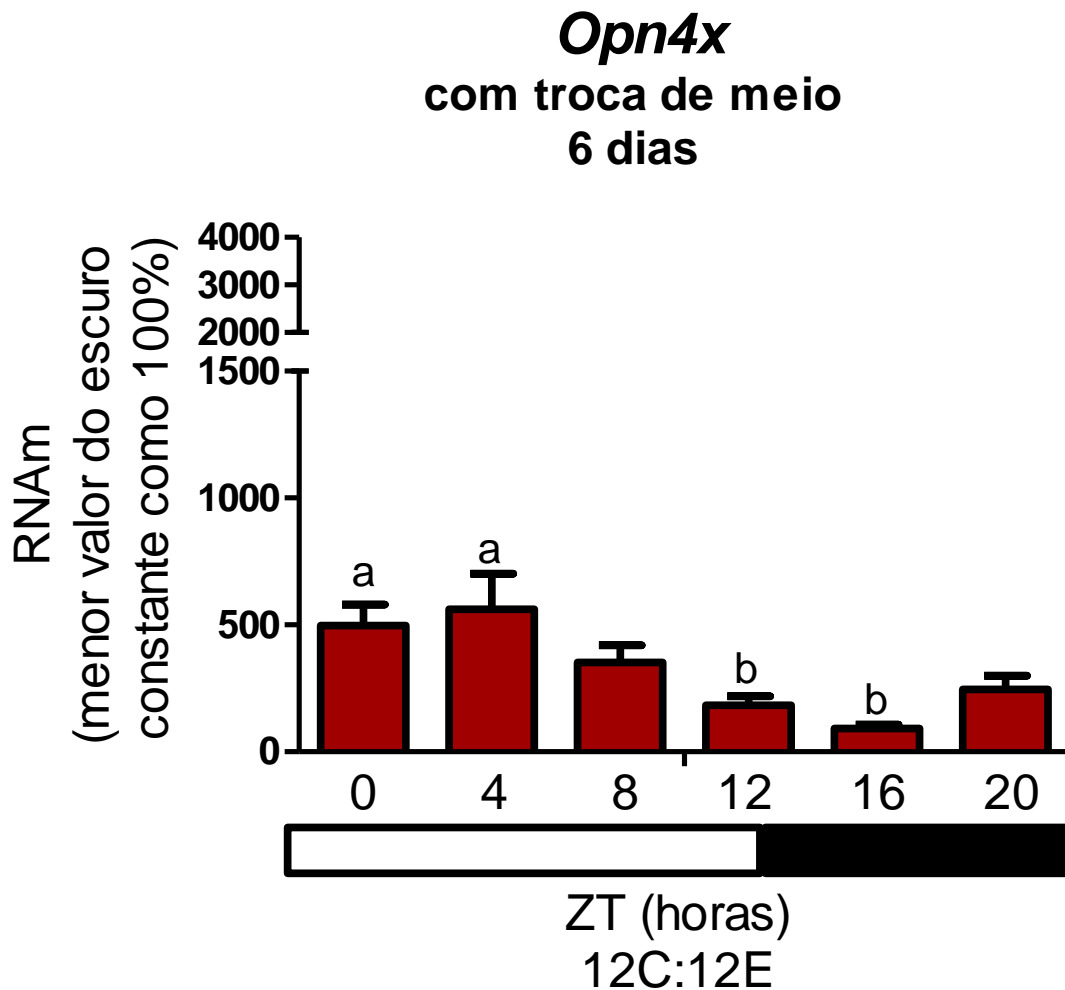


Figura 34 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início da fase clara do 6º dia às 8 horas (ZT0) e uma segunda troca de meio após 6 horas. Valores são a média ± EPM (n=10-12) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante, que corresponde a 100%. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0012$).

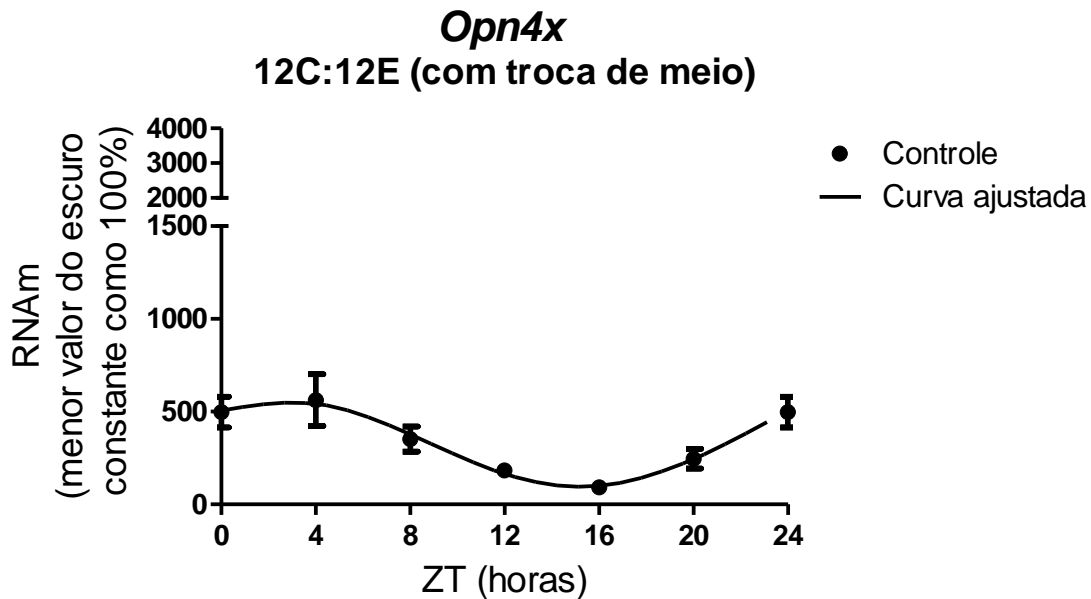


Figura 35 – Ajuste de curva pelo software COSANA da expressão temporal de *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis*. As células foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias e foram submetidas a uma troca de meio no início da fase clara do 6º dia e uma segunda troca de meio após 6 horas. Análise por COSANA mostrou um padrão circadiano na expressão de *Opn4x*, probabilidade de ritmo circadiano de R=99,05% e p=0,001, para período de 25 horas.

Utilizando os mesmos protocolos experimentais, escuro constante ou 12C:12E, porém com tratamento hormonal, nossa hipótese era que endotelina seria capaz de sincronizar a expressão de *Opn4x*.

Em escuro constante, o tratamento com endotelina 10^{-9} M promoveu um aumento do transcrito no ZT8 e menor produção de RNAm no ZT16 (Figura 36), padrão este similar ao observado no protocolo sem tratamento hormonal nestas mesmas condições (Figura 33). Este tratamento, no entanto, mostrou-se efetivo na

sincronização da expressão do RNAm de *Opn4x*, o qual passou a apresentar um forte ritmo circadiano, evidenciado pela análise por COSANA (Figura 37). O tratamento com endotelina-3 10^{-8} M promoveu um aumento do transcrito no ZT20 de aproximadamente 20 vezes, quando comparado ao ZT16 de menor expressão (Figura 38), semelhante ao observado para *Opn4m*, o qual também apresentou pico de expressão no ZT20. Embora a lise de ANOVA One Way tenha sido estatisticamente significativa, análise por COSANA não foi capaz de identificar um padrão rítmico de expressão para *Opn4x* (probabilidade de ritmo circadiano igual a 31,24%).

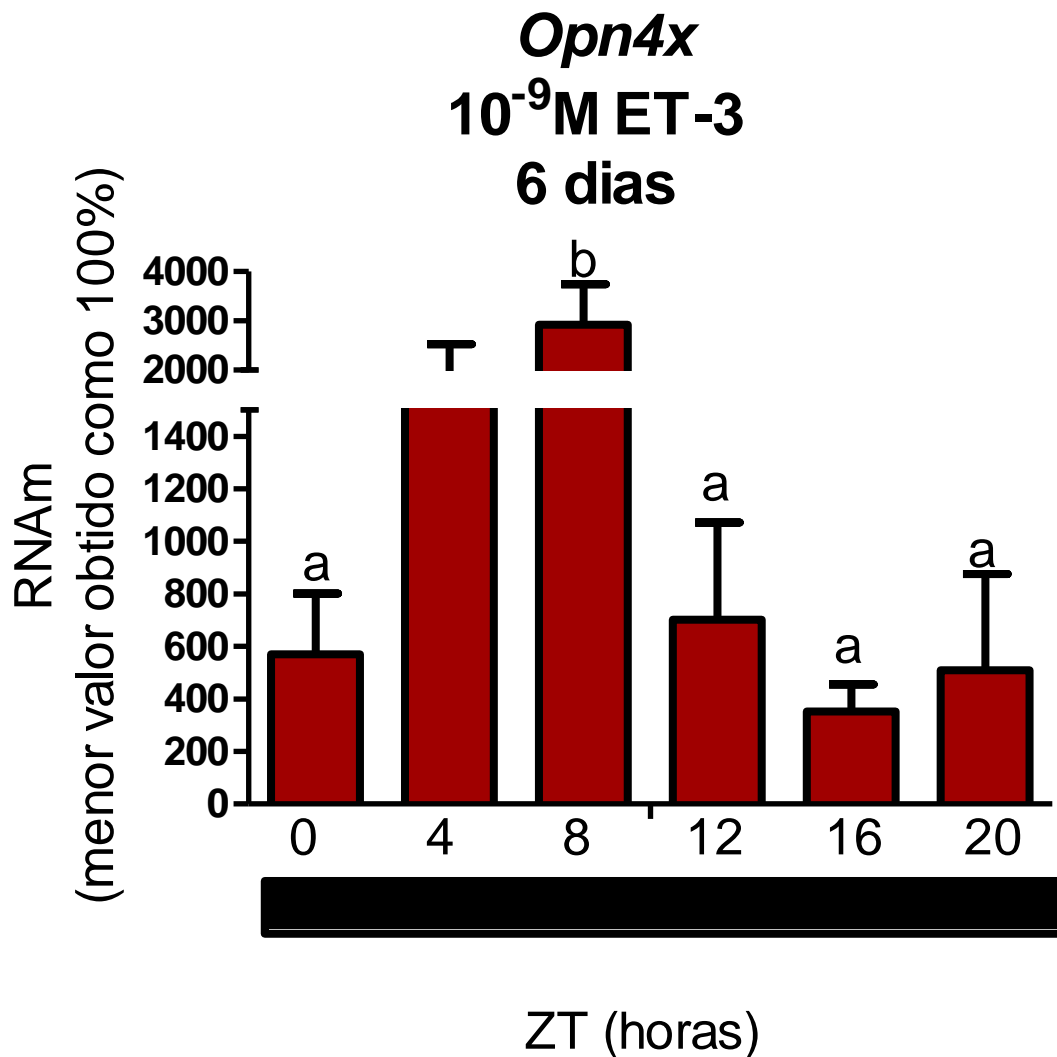


Figura 36 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina 10^{-9} M. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10^{-9} M por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=6) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0035$).

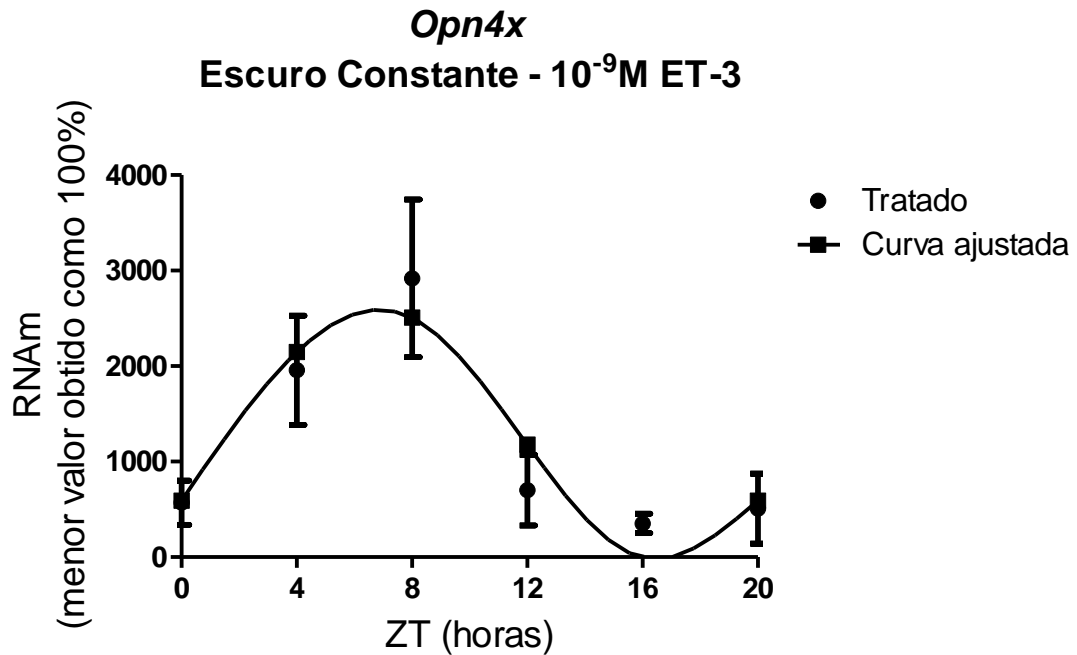


Figura 37 - Ajuste de curva pelo software COSANA da expressão temporal de *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis*. As células foram mantidas em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-9} M no início do 6º dia por 6 horas. Análise por COSANA mostrou um padrão circadiano na expressão de *Opn4x*, probabilidade de ritmo circadiano de $R=89,57\%$ e $p=0,034$, para período de 20 horas.

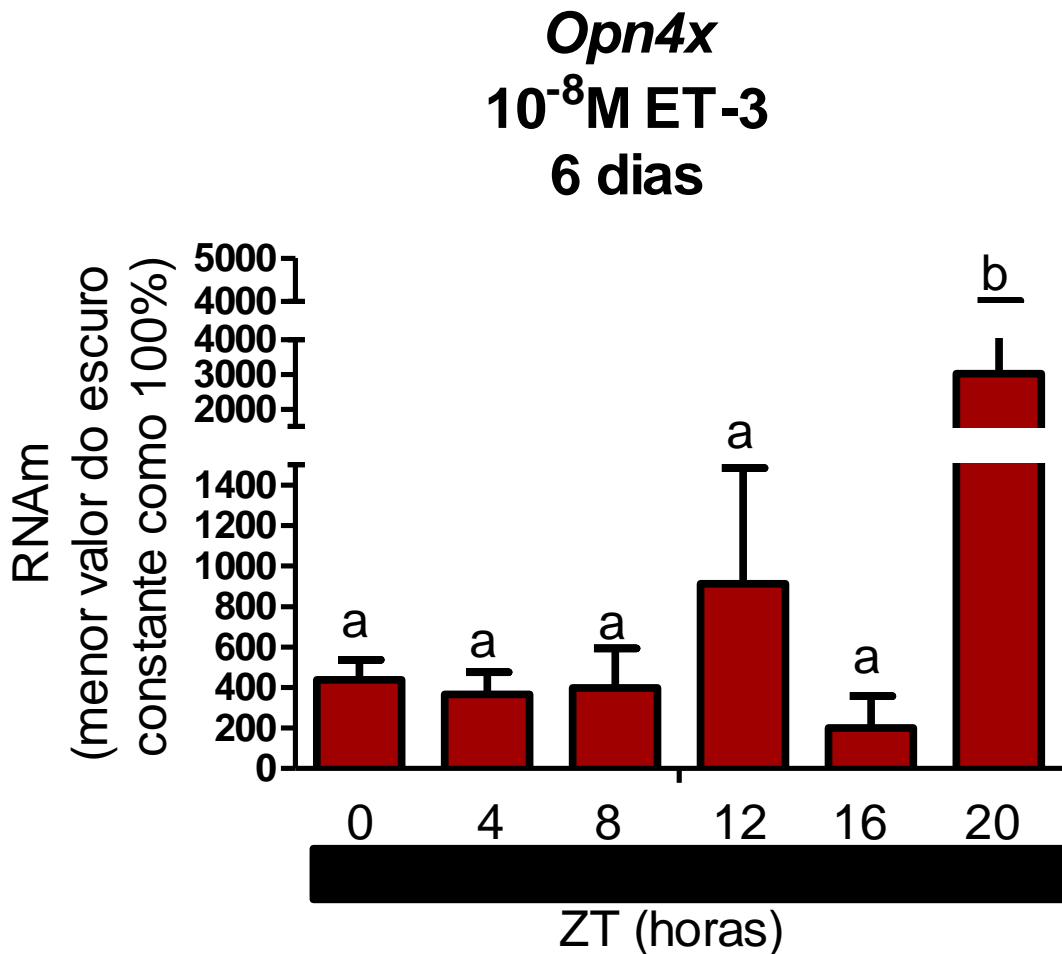


Figura 38 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina 10^{-8} M. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10^{-8} M por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0069$).

Em condições de 12C:12E, endotelina 10^{-9} M induziu um pico de produção de RNAm durante a fase de escuro, evidenciado em ZT20, comparado ao ZT16, de menor expressão (Figura 39). O tratamento

com ET-3 10^{-8} M induziu um aumento na produção do RNAm no período de claro, ZT8, com um aumento de aproximadamente 12 vezes na transcrição deste gene. Os pontos de menor transcrição foram evidenciados pelo ZT0, que corresponde a transição do escuro para o claro, e o ZT12 que corresponde a transição do claro para o escuro (momento de menor expressão, com sua taxa de transcrição aproximadamente 12 vezes menor que o ZT de maior expressão) (Figura 40).

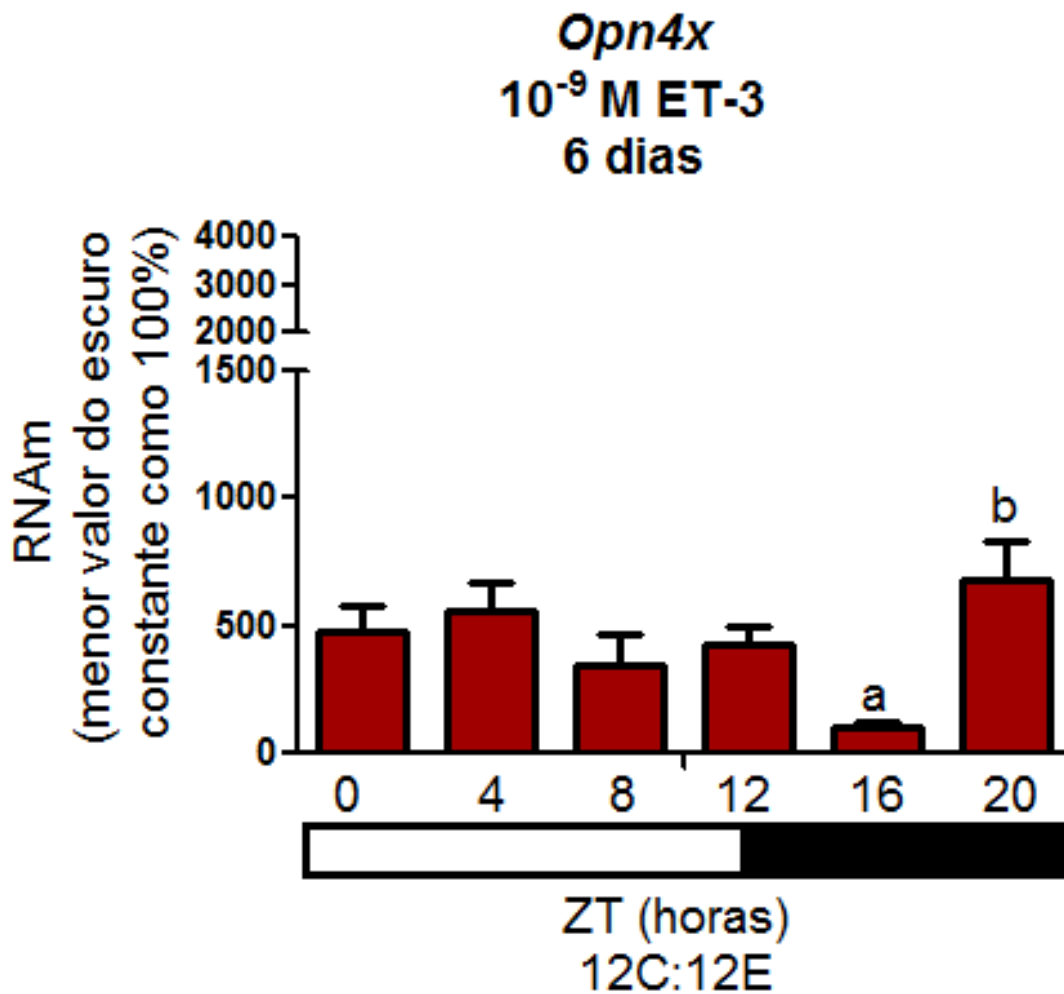


Figura 39 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-9} M. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias. No ZT0 do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10^{-9} M por 6 horas. Valores são a média \pm EPM (n=4) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0325$).

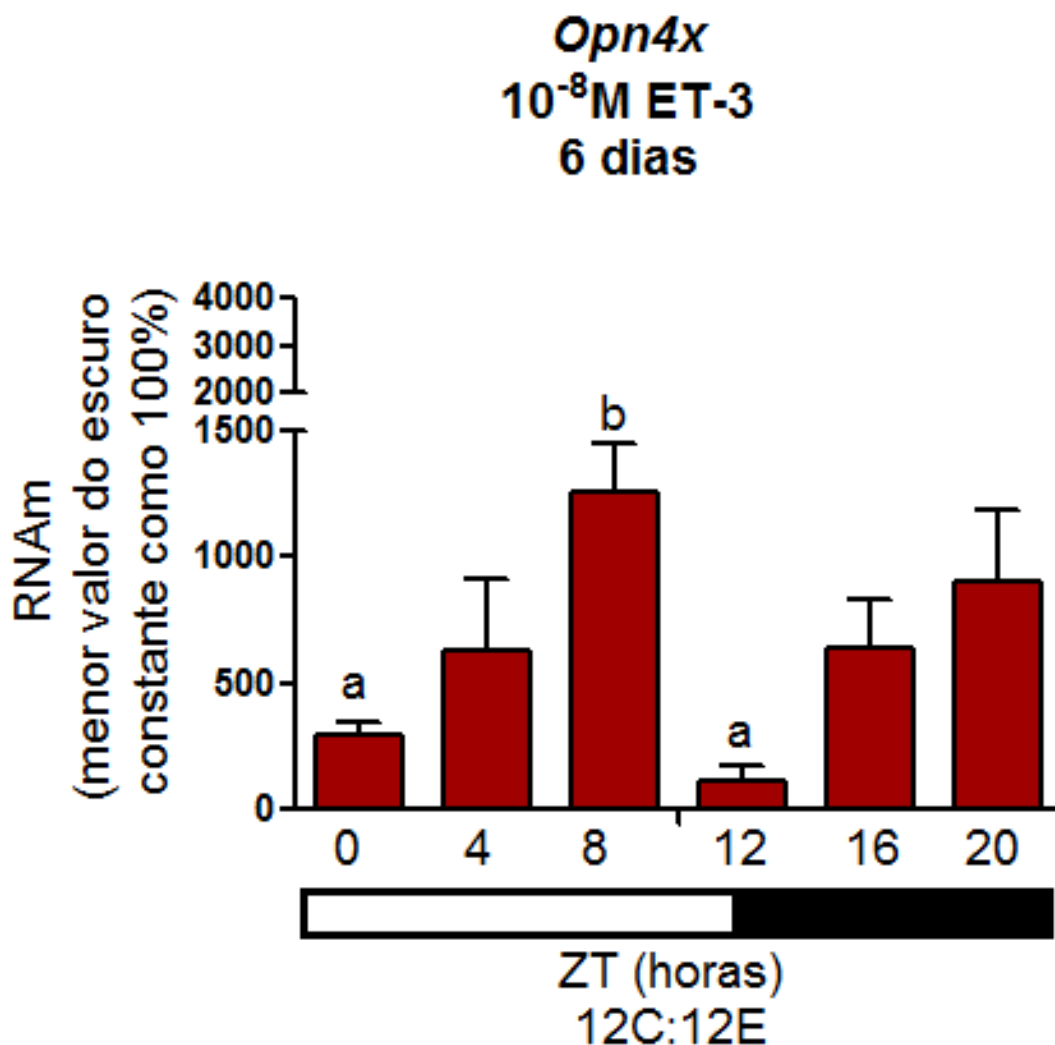


Figura 40 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-8} M. As células permaneceram em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias. No início da fase clara do 6º dia as células foram tratadas com ET-3 10^{-8} M por 6 horas. Valores são

a média \pm EPM (n=4) do gene *Opn4x* normalizado pelo RNA 18S, expressa em relação ao menor valor de expressão do grupo controle do escuro constante. Análise por ANOVA mostrou diferença significativa entre os tempos (a é diferente de b com $p=0,0205$).

Na condição de fotoperíodo 12C:12E, o tratamento com endotelina apresentou um efeito dose-dependente na sincronização de *Opn4x*. Comparado ao seu controle (Figura 33), a endotelina 10^{-8} M exerceu efeito modificando o padrão de oscilação do transcrito, de circadiano para ultradiano. O padrão de expressão ultradiano mostrou um período de 11horas (Figura 41). Já na concentração de 10^{-9} M, endotelina aboliu a oscilação circadiana vista no controle (Figura 33).

Assim, dependendo da dose utilizada e do ZT analisado, ET-3 pode promover um aumento da expressão gênica de *Opn4x*, indicando uma modulação de forma dose-dependente. Além disso, pode re-ajustar a expressão desse transcrito a uma nova fase, com novo período, também de forma dose-dependente.

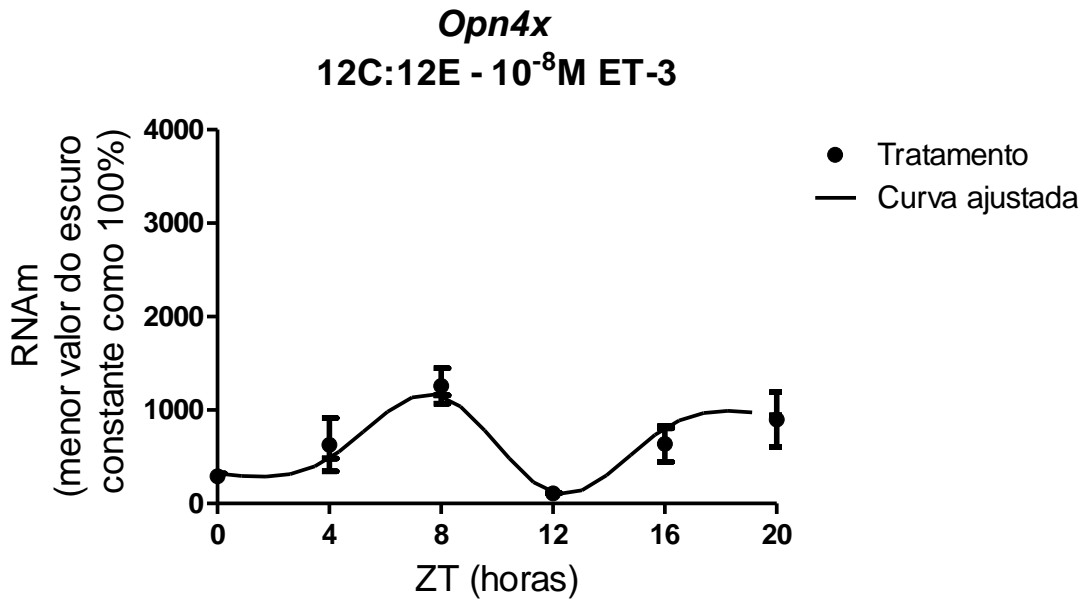


Figura 41 – Ajuste de curva pelo software COSANA da expressão temporal de *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis*. As células foram mantidas em fotoperíodo 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10⁻⁸M no início da fase clara do 6º dia. A análise por COSANA não mostrou probabilidade de ritmo circadiano, com R=3,60% com p=0,947, mas foi possível evidenciar um ritmo ultradiano, com R= 92,64% e p=0,02, com período de 11 horas.

Quando as células foram mantidas em escuro constante, e tratadas ou não com endotelina-3 10⁻⁹M por 6 horas, a expressão do gene *Opn4x* foi alterada de forma positiva. O tratamento exerceu efeito aumentando fortemente a transcrição do RNAm deste gene nos ZT4 e ZT12, quando comparado ao seu respectivo controle (Figura 42). Nos outros ZTs analisados não foi possível identificar a modulação do transcrito. Quando as células foram mantidas em escuro constante, e tratadas com endotelina-3 10⁻⁸M por 6 horas, a

expressão do gene *Opn4x* foi alterada tanto positivamente quanto negativamente, dependendo do ZT analisado. No ZT8 foi observada uma diminuição da produção do RNAm para o gene analisado, ao passo que nos outros ZTs em que endotelina exerceu efeito modulando a transcrição, foi observado um aumento de aproximadamente 6 vezes no ZT20 e de 8 vezes no ZT12 (Figura 43).

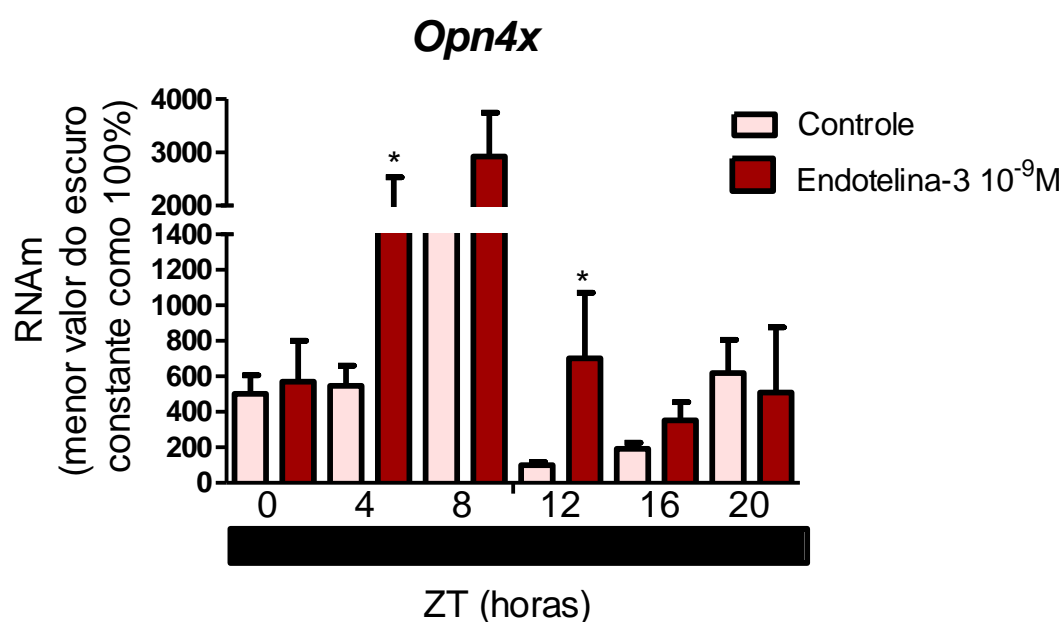


Figura 42 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina 10⁻⁹M. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10⁻⁹M no início do 6º dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média ± EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=6) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4x* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, p<0,05.

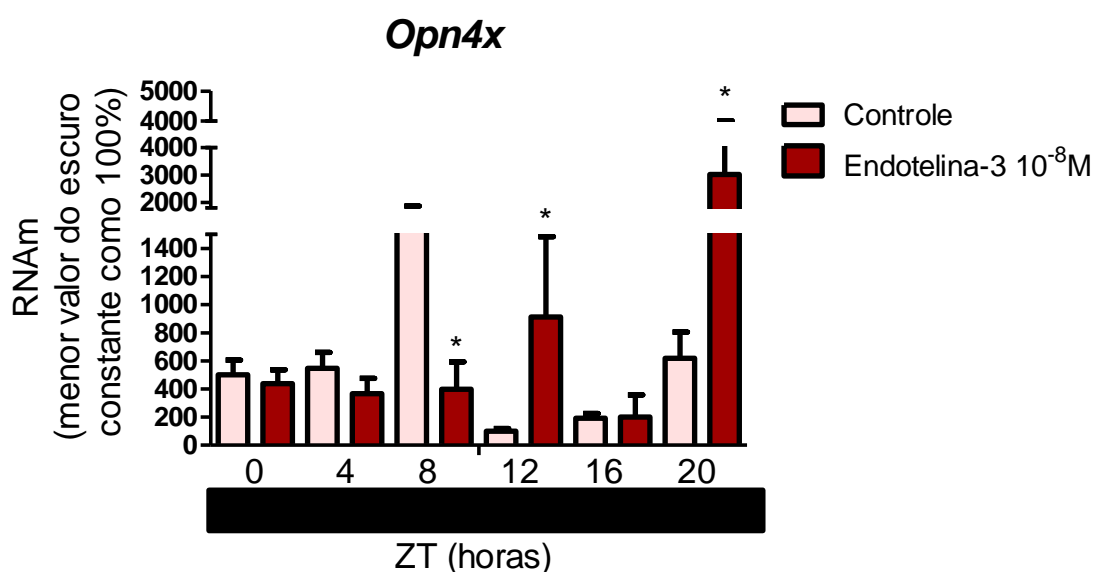


Figura 43 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em escuro constante e tratados com endotelina 10⁻⁸M. As células permaneceram em escuro constante por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10⁻⁸M no início do 6^o dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média ± EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4x* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, p<0,05.

Em fotoperíodo 12C:12E, o tratamento com endotelina-3 nas duas concentrações utilizadas apresentou efeito estimulador da transcrição do gene *Opn4x*. O tratamento com ET-3 10⁻⁹M aumentou a produção do RNAm deste gene no ZT12 (transição do claro para o escuro) e ZT20, fase escura (Figura 44), e o tratamento com uma concentração maior, ET-3 10⁻⁸M, apresentou efeito similar, estimulando a transcrição no ZT8, 16 e 20 (Figura 45). Embora as

duas concentrações tenham apresentado efeito estimulador da transcrição, o tratamento com ET-3 10^{-8} M mostrou um efeito mais acentuado. O ZT de maior expressão na concentração 10^{-9} M teve um aumento de aproximadamente 3 vezes com relação ao seu controle (Figura 44), enquanto que na concentração 10^{-8} M o aumento foi de quase 6 vezes (Figura 45).

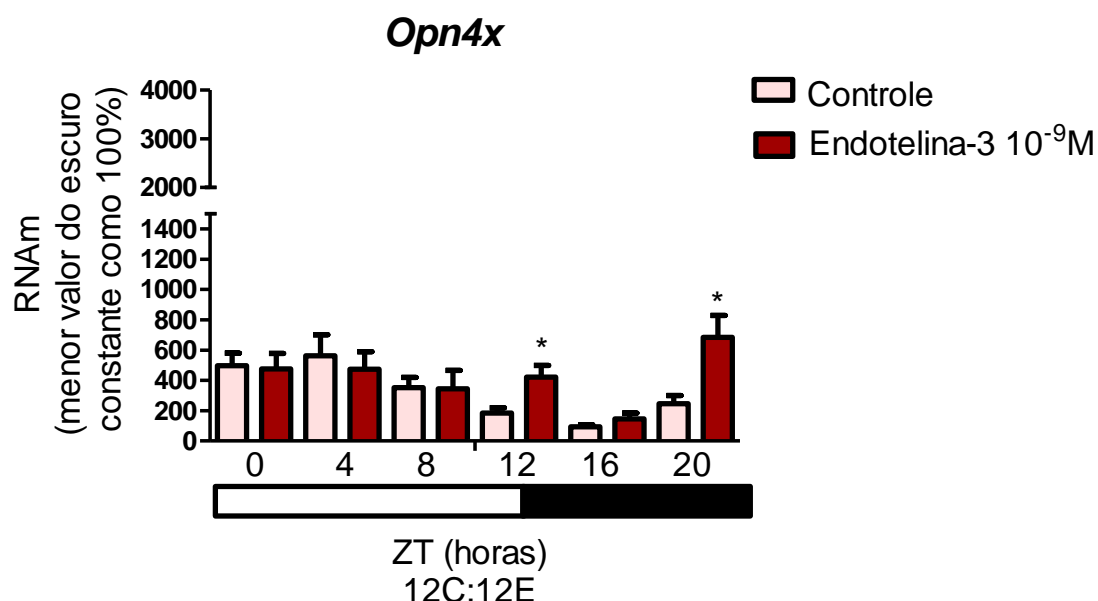


Figura 44 – PCR quantitativo para *Opn4x* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10^{-9} M. As células permaneceram em 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10^{-9} M no início da fase clara do 6º dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média \pm EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4x* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu

respectivo controle, $p < 0,05$.

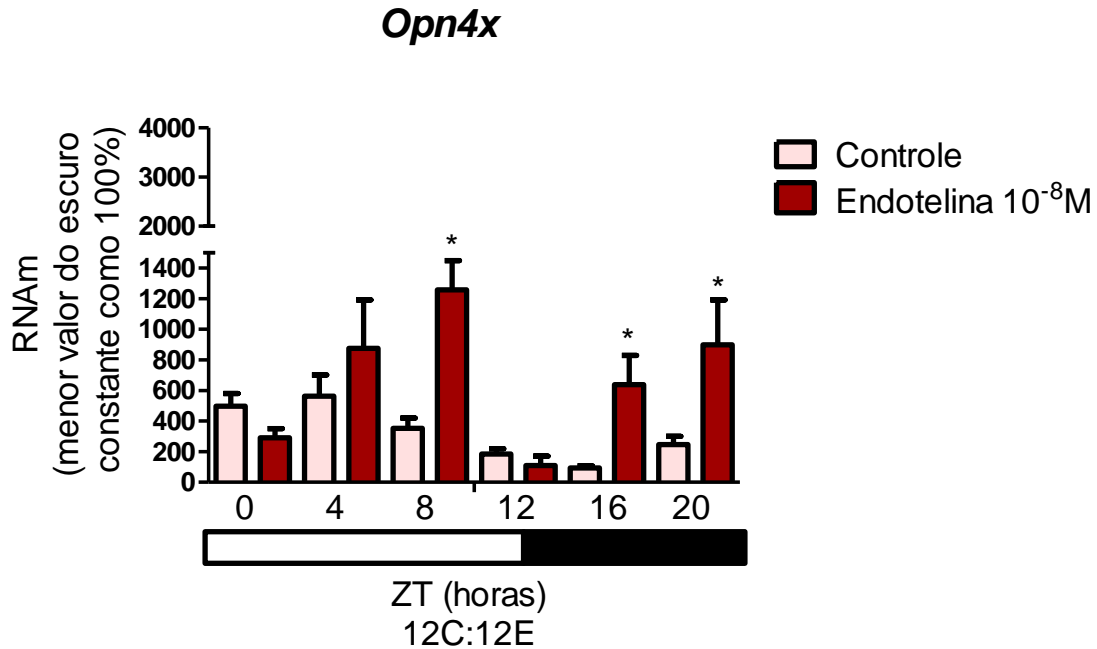


Figura 45 – PCR quantitativo para *Opn4m* em melanóforos de *Xenopus laevis* em fotoperíodo 12C:12E e tratados com endotelina 10⁻⁸M. As células permaneceram em 12C:12E por 5 dias e foram tratadas com endotelina-3 10⁻⁸M no início da fase clara do 6º dia por 6 horas. Ao final do tratamento uma nova troca de meio foi realizada para remoção do hormônio. Valores são a média ± EPM (n=10-12) do grupo controle e (n=4) do grupo tratado. Cada barra representa os valores da transcrição do gene *Opn4m* normalizados pelo RNA 18S e expressos em relação ao menor valor do grupo controle no escuro constante, que corresponde a 100%. * Análise por teste *t* de Student mostrou diferença significativa entre tratado e seu respectivo controle, $p < 0,05$.

Díscussão

DISCUSSÃO

Muitos dos parâmetros fisiológicos e comportamentais exibidos pelos organismos apresentam variações ao longo do dia, e a maioria desses ritmos persiste em condições constantes apresentando um período de 24 horas aproximadamente. Muitas dessas variações biológicas são claramente associadas ao ciclo claro-escuro, sendo este ciclo de grande importância para as espécies que possuem algum tipo de pigmento fotossensível (MARQUES *et al.*, 2003). Os melanóforos de *Xenopus laevis* apresentam compostos que são responsáveis pela percepção das alterações na intensidade luminosa, as melanopsinas.

Após a descoberta da melanopsina em melanóforos de *Xenopus laevis* em cultura, na década de 90 (PROVENCIO *et al.*, 1998), e posteriormente a demonstração de seu envolvimento na captura de luz para o sistema circadiano de mamíferos, essencial para o ajuste do relógio aos ciclos claro-escuro (PANDA *et al.*, 2002; 2003), tornou-se de grande importância estudos que visassem compreender a organização desse complexo sistema.

A regulação da expressão da melanopsina é ainda pouco conhecida, mas sabe-se que pode ser regulada diretamente pelo ciclo claro-escuro em células ganglionares da retina. Em ratos albinos (HANNIBAL, 2006) a expressão da proteína melanopsina é inibida por

luz, representando uma adaptação das células ganglionares a mudanças na intensidade de luz do ambiente. CHAURASIA e colaboradores (2005) demonstraram que em cultura da retina de embrião de galinhas, *Opn4x* apresenta picos de expressão no fim do dia, tanto em fotoperíodo claro-escuro quanto em escuro constante. A regulação do RNAm de *Opn4x* na retina é consistente com a hipótese de que este fotopigmento desempenha importante papel na regulação da função fótica circadiana neste tecido.

Em mamíferos, a organização circadiana é governada por células localizadas dentro do NSQ do hipotálamo. Hoje se sabe que osciladores circadianos não são encontrados somente no NSQ, mas também em tecidos periféricos e até em cultura de células imortalizadas (BASALOBRE *et al.*, 1998; YAMAMOTO *et al.*, 2004).

Uma vez que o ritmo biológico é gerado pelo sistema de temporização do organismo, a exposição do mesmo às flutuações do ambiente não é necessária para a expressão do ritmo em livre-curso. Porém, hoje, sabe-se que quando tecidos são mantidos em cultura, a expressão de alguns genes pode se mostrar dessincronizada. Pesquisas eletrofisiológicas revelaram que neurônios nos NSQs, quando dissociados e mantidos em cultura, exibem ritmos de disparos independentes, e que as células quando isoladas umas das outras apresentam fase e períodos diferentes entre si (WELSH *et al.*, 1995). Assim, seria necessário algum agente que fosse capaz de

sincronizar a expressão dessas células que se encontram em desacoplamento de fase.

Em escuro constante, e na ausência de qualquer pista ambiental, não é possível identificar nenhum padrão de oscilação na produção de RNAm para os genes foco deste trabalho. Quando as células foram submetidas à iluminação, 12C:12E, ainda não foi possível verificar um padrão oscilatório, indicando que o fotoperíodo não é capaz de atuar na sincronização desses genes.

Dados da literatura mostram que um choque de soro fetal bovino é capaz de sincronizar a expressão de genes em culturas antes arrítmicas (BALSALOBRE *et al.*, 1998). Logo em seguida, descobriu-se que até mesmo uma simples troca do meio de cultivo é capaz de sincronizar o oscilador interno de cada célula (YAMAZAKI *et al.*, 2000). Conforme modelo proposto por BALSALOBRE e colaboradores (1998), um choque de soro fetal bovino em células em cultura pode atuar de duas maneiras: sincronizando as células que se encontram dessincronizadas, em desacoplamento de fase, ou ainda induzindo uma oscilação rítmica em células antes arrítmicas. Com os melanóforos de *Xenopus* mantidos em regime de 12C:12E e submetidos a troca de meio, nossos resultados se assemelham aos resultados apresentados na literatura para outros genes, já que nesta condição, tanto *Opn4x*, quanto *Opn4m*, passaram a apresentar um padrão rítmico na expressão de seus transcritos. Esses resultados não

se repetiram quando as células foram mantidas em escuro constante com troca de meio, indicando que a sincronização das melanopsinas foi induzida pela associação do fotoperíodo com a troca de meio, já que na ausência de uma dessas variáveis não foi possível observar uma sincronização.

Ainda que nenhum ritmo tenha se manifestado nas células mantidas em escuro constante e com troca de meio, é interessante notar que as duas melanopsinas apresentaram um pico de expressão no ZT8, e quando mantidas em 12C:12E e com troca de meio, o aumento da transcrição ocorreu no período de claro, no ZT4, e menor expressão na fase escura, agora evidenciando um padrão de oscilação.

Em contraste com as melanopsinas, parece que o receptor de endotelina se mantém constante ao longo das 24 horas, não sendo alterado pelo fotoperíodo ou pela associação de fotoperíodo com troca de meio.

Em um estudo do nosso laboratório, foi demonstrado que células da retina de embriões de galinha mantidas em fotoperíodo 12C:12E apresentam padrões rítmicos de transcrição para *Opn4m*, e alguns genes do relógio, como *Clock* e *Per*, além da expressão de outros genes relacionados ao sistema circadiano. Dessa forma, foi demonstrado que as células de retina de embrião de 8 dias de galinha

em cultura já contêm um relógio funcional, o qual necessita do ciclo claro-escuro para sua sincronização (LIMA *et al.*, 2010).

As endotelinas 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 sanguíneos existentes próximos aos cromatóforos sejam responsáveis pela síntese e liberação de endotelinas, que atuam como um fator de ação parácrina (MURATA & FUJII, 2000). Na pele de mamíferos, endotelina é produzida pelos queratinócitos, e atua de forma parácrina nos melanócitos (IMOKAWA *et al.*, 1986). A produção de endotelina é aumentada fortemente após exposição à radiação UVB (IMOKAWA *et al.*, 1992).

Em células pigmentares do teleósteo GEM-81 indiferenciadas ETs induzem significativo aumento de proliferação, no entanto ET-3 não apresentou um efeito significativo, enquanto que ET-1 apresentou efeito bifásico sobre a proliferação, onde menores concentrações causaram redução e maiores concentrações aumento do número de células. Com relação a atividade tirosinásica, também foi observado um efeito bifásico semelhante. Em células GEM-81 diferenciadas por dimetil sulfóxido (DMSO), foi observada uma redução da atividade tirosinásica. A ação das endotelinas no tocante a proliferação foi

potente em induzir aumento deste parâmetro, sugerindo uma função de ETs como fatores de crescimento para células pigmentares de teleósteos (FILADELFI *et al.*, 2004).

Em melanóforos de *Brachydanio rerio*, ET-1 promove agregação pigmentar, sendo este efeito dose-dependente, e sofrendo dessensibilização com concentrações superiores a 10^{-6} M (FUJII *et al.*, 1993). De forma similar ET-1 atua sobre melanóforos de *Zacco temmincki*, porém a dessensibilização do sistema ocorre em concentrações acima de 10^{-7} M (HAYASHI *et al.*, 1996).

Dados de nosso laboratório confirmam que os melanóforos de *Xenopus* apresentam receptores específicos que reconhecem a endotelina, o receptor subtipo ET_C . As diferentes isoformas de endotelina apresentam diferentes afinidades para os três tipos de receptores clonados, sendo que a endotelina-3 possui maior afinidade para ET_C (KARNE *et al.*, 1993).

Estudos sobre a dispersão de grânulos de pigmento em melanóforos de *Xenopus laevis* em resposta as endotelinas mostraram que endotelina-3 é mais potente que ET-1 e ET-2, e que o tratamento com altas concentrações, ET-3 100nM, induz uma rápida dispersão dos grânulos de pigmentos, com pico em 60 minutos e dessensibilização em 90 minutos. Por outro lado, menores concentrações causam uma dispersão mais lenta a qual permanece por tempo mais longo. Tratamento com ET-3 50nM promove um

máximo de dispersão em 80 minutos o qual permanece por mais 70 minutos, retornando ao nível basal nos próximos 100 minutos. Ainda, quando comparada a altas concentrações a dispersão dos grânulos de pigmento é menor. Essas informações confirmam que a resposta de dispersão dos grânulos de pigmento por ET-3 é concentração e tempo dependente (KARNE *et al.*, 1993).

Endotelina atua estimulando a transcrição de diversos genes que são relacionados a pigmentação. ET-1 estimula um forte aumento na transcrição do RNAm para receptores de melanocortina do tipo 1 (MCR1) em melanócitos humanos normais, de maneira dose-dependente (SCOTT *et al.*, 2002). Os receptores MC1R são os principais reguladores da síntese de eumelanina em melanócitos de mamíferos, sendo de grande importância na fotoproteção. Ainda, foi observado por IMOKAWA e colaboradores (1995), que ET-1 10nM induz um aumento na atividade e nos níveis de RNAm para a enzima tirosinase em melanócitos humanos em cultura, enzima chave envolvida na síntese de melanina.

Em oposição ao observado para endotelina, a exposição de melanócitos à radiação UV induz uma significativa diminuição nos níveis de RNAm de MC1R. SCOTT e colaboradores (2002) com base nesta constatação propuseram um modelo de melanogênese induzido por radiação UV. A radiação UV atua de forma direta promovendo dano ao DNA, e indiretamente estimulando a síntese de vários fatores

epidérmicos, como ET-1 (IMOKAWA *et al.*, 1992). Muitos desses fatores estariam atuando como reguladores parácrinos que medeiam os efeitos da radiação UV, na melanogênese, proliferação e na sobrevivência do melanócito.

As células da linhagem embrionária ZEM-2S de *Danio rerio* expressam tanto *Opn4x* como *Opn4m*, além de seis genes *Cry*. Quando submetidas a regime fotoperiódico de 12:C12E, essas células apresentam ritmos circadianos robustos na expressão de *Per1* e *Cry1b*, indicando que a presença de um fotopigmento é capaz de sincronizar a expressão de genes de relógio neste modelo celular. Neste mesmo estudo foi analisada também a modulação desses genes por endotelina-1. Endotelina-1 exibiu um efeito bifásico nestas células, onde foi observada uma forte ativação da expressão de *Opn4x*, nas células tratadas com 10^{-10} e 10^{-11} M de endotelina-1, enquanto que em maiores concentrações (10^{-8} e 10^{-9} M) houve inibição da expressão de *Opn4x* na maioria dos ZTs analisados. O tratamento com ET-1 10^{-11} M promoveu um padrão de oscilação circadiana para *Opn4x*, enquanto que com as outras concentrações utilizadas não foi possível observar nenhuma oscilação significativa. A expressão de *Clock* em 12C:12E não foi significativamente afetada pelo tratamento com ET-1 10^{-8} M. Entretanto na presença de ET-1 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} M, a expressão foi aumentada em alguns ZTs analisados. Nessas células, altas concentrações de endotelina-1 exerceram um

efeito inibitório na expressão de *Per1* e *Cry1b* durante o período de luz, porém essa inibição não foi suficiente para afetar a oscilação circadiana vista no controle (FARHAT *et al.*, 2010).

Nossos resultados mostram que o tratamento com endotelina-3, independentemente da concentração utilizada e do regime fotoperiódico, não exerceu efeito sobre a sincronização do receptor de endotelina, embora tenha sido observado um aumento do transcrito nos ZTs 4 e 8 na condição de escuro constante e com endotelina 10^{-9} M. Já o tratamento com endotelina-3 10^{-8} e 10^{-9} M em 12C:12E parece abolir o ritmo de produção do RNAm de *Opn4m* visto no controle.

Diferente do que ocorre para *Opn4m* com o tratamento de endotelina, a expressão de *Opn4x* apresentou uma ampla variação ao longo dos ZTs analisados. Em escuro constante, endotelina 10^{-9} M promove um aumento do transcrito no ZT8, cerca de 10 vezes aquele visto no ZT de menor expressão, decaindo ao longo dos ZTs. Essa variação na produção do RNAm ao longo do tempo mostrou, pela análise por COSANA, um ritmo circadiano. Já o tratamento com endotelina 10^{-8} M não se mostrou capaz de promover um padrão rítmico, como visto no tratamento com endotelina 10^{-9} M em escuro constante. Na concentração 10^{-9} M, porém em 12C:12E, o hormônio aboliu a ritmicidade deste transcrito, antes observado no grupo controle com troca de meio. Nesta mesma condição fotoperiódica

(12C:12E), com uma concentração mais alta de endotelina, 10^{-8} M, o padrão de oscilação foi alterado, passando de circadiano para ultradiano, quando comparado ao seu respectivo controle.

O presente trabalho demonstrou que ET-3 modula os níveis do RNAm para as melanopsinas e para o receptor de endotelina nos melanóforos de *Xenopus laevis*, de maneira dose-dependente. Dependendo da dose utilizada e do ZT analisado, ET-3 promoveu um aumento ou diminuição da expressão gênica. De maneira similar, em corações murinos intactos (PIUHOLA *et al.*, 2007), cardiomiócitos (CHENG *et al.*, 2005), células endoteliais aórticas (SUGIYAMA *et al.*, 2004), aortas intactas de ratos adultos (WOLF *et al.*, 2006), células da musculatura lisa vascular (RODRIGUEZ-VITA *et al.*, 2005), ET-1 regula positivamente a transcrição de diversos genes.

O tratamento com endotelina-3 nas concentrações 10^{-8} e 10^{-9} M por 6 horas em 12C:12E ou escuro constante afetou significativamente os níveis de RNAm para as melanopsinas e para receptor de endotelina. Na concentração 10^{-9} M em 12C:12E, endotelina promoveu um aumento significativo da transcrição do receptor de endotelina nos ZTs 0, 4, 8 e 12, enquanto que na concentração de 10^{-8} M, aumentou a transcrição no ZT8, fase clara, e inibiu no ZT20, fase escura. A expressão das melanopsinas foi afetada positivamente, mostrando ativação da transcrição em todos os ZTs que apresentaram diferenças significativas, sendo o aumento

para *Opn4m*, observado somente no período de escuro, nas duas concentrações. Similarmente, em escuro constante, endotelina-3 na concentração 10^{-9} M exerceu efeito estimulando a transcrição de todos os três genes, nos ZTs onde a análise estatística indicou diferenças significativas. Já o tratamento na concentração 10^{-8} M mostrou-se variável ao longo dos tempos para os 3 genes analisados. O receptor de endotelina não sofreu qualquer alteração entre os tempos nesta concentração. A expressão de *Opn4m* foi aumentada nos ZTs 4, 12, 16 e 20 em relação ao seu controle, e a expressão de *Opn4x* apresentou uma forte ativação da transcrição nos ZTs 12 e 20, ao passo que no ZT8 foi observada uma grande inibição da produção do RNAm.

Os resultados obtidos confirmam a ação da ET-3 sobre as células pigmentares, ação que, em melanóforos de *Xenopus laevis*, ocorre através da ligação da endotelina ao receptor subtipo ET_C . O efeito deste peptídeo sobre a expressão gênica das melanopsinas e do receptor de endotelina ocorre de maneira dose-dependente e tempo-dependente, indicando que esta modulação está diretamente correlacionada aos mecanismos de controle da pigmentação. Essa coordenação e sincronização dos elementos responsáveis pelo controle da pigmentação refletem de forma direta no mimetismo, termorregulação, comunicação social e expressão de comportamentos como medo, agressividade e excitação sexual

(BAGNARA E HADLEY, 1973; FUJII, 2000), que atuam na promoção da sobrevivência de espécie.

Resumo

RESUMO

Os relógios biológicos são fundamentais para a sincronização do comportamento dos organismos a mudanças no fotoperíodo. Todas as alterações rítmicas são determinantes para a sobrevivência da espécie uma vez que elas prevêm que os ajustes internos coincidam com a fase mais propícia do ciclo ambiental, permitindo aos organismos a capacidade de sincronizar esses eventos internos com os ciclos ambientais. Muitos desses ritmos biológicos são claramente associados ao ciclo claro-escuro, sendo este ciclo de grande importância para as espécies que possuem algum tipo de pigmento fotossensível. Os melanóforos de *Xenopus laevis* são fotossensíveis, respondendo à luz com dispersão dos grânulos de melanina, devido à presença de duas melanopsinas, *Opn4x* e *Opn4m*.

As células pigmentares dos vertebrados heterotérmicos respondem com migração pigmentar a uma variedade de agentes, incluindo as endotelinas. Em peixes teleósteos, ETs induzem a agregação pigmentar em melanóforos, enquanto que em anfíbios, ET-3 induz a dispersão de grânulos de pigmentos em melanóforos de *Xenopus laevis* e de *Rana catesbeiana*, através da ativação de receptores ETc.

Propusemos determinar o padrão temporal de expressão dos genes das melanopsinas e do receptor *ET_C* em melanóforos dérmicos de *X. laevis* em cultura, bem como os efeitos temporais e dose-dependentes da endotelina sobre essa expressão. Demonstramos, através de ensaios de PCR quantitativo, que o tratamento de 12C:12E, somado a uma troca de meio, assim como o de endotelina-3 10^{-9} e 10^{-8} M em escuro constante, foi capaz de sincronizar a expressão de *Opn4x* e *Opn4m*. Entretanto, o receptor *ET_C* parece não ser sincronizado pelo ciclo claro-escuro, ou pelo tratamento hormonal. Dependendo da dose utilizada e do ZT analisado, ET-3 pode promover um aumento ou inibição da expressão gênica de *Opn4x*, *Opn4m* e *ET_C*, indicando uma modulação de forma dose-dependente. Além disso, pode atuar como um agente sincronizador da expressão dos transcritos das melanopsinas.

Abstract

ABSTRACT

The biological clocks are critical for synchronizing the behavior of organisms to changes in photoperiod. All rhythmic changes are crucial to the survival of the species since they provide for internal adjustments to coincide with the phase of the cycle most favorable. Many of these biological rhythms are clearly associated with the light-dark cycle, of major importance for species that have some type of photosensitive pigment.

Melanophores of *Xenopus laevis* are photosensitive, responding to light with dispersion of melanin granules, due to the presence of two melanopsins, *Opn4x* and *Opn4m*. The pigment cells of ectothermic vertebrates respond with pigment migration to a variety of agents including the endothelins. In teleost fish, ETs induce pigment aggregation in melanophores, whereas in amphibians, ET-3 induces the dispersion of pigment granules in melanophores of *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana*, by activation of *ETc*.

We proposed to determine the temporal pattern of gene expression of the *ETc* receptor and melanopsins in dermal melanophores of *X. laevis* in culture as well as the effects of endothelin-3 on the temporal expression of the 3 genes. Using quantitative PCR, we demonstrated that 12L: 12D regimen, combined

with medium changes, as well as the treatment with 10^{-9} and 10^{-8} M endothelin-3, was able to synchronize the expression of *Opn4x* and *Opn4m*. However, *ET_C* receptor seems not to be synchronized by light-dark cycle, or hormone treatment. Depending on the dose and the ZT, ET-3 may promote an increase or inhibition of gene expression of *Opn4x*, *Opn4m* and *ET_C*, indicating a dose-dependent modulatory effect. In addition, endothelin-3 may also act as a synchronizing agent of the melanopsins transcripts.

*Referências
Bibliográficas*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, U.; EICHELE, G. The mammalian circadian clock. *Curr Opin Genet Dev*, v. 3, p. 271-277, 2003.

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

ARAI, H. *et al.* Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, v. 348, p. 730-732, 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, p. 12468-12474, 1992.

BAGNARA, J. T. Hypophysectomy and the tail darkening reaction in *Xenopus*. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 94, p. 572-575, 1957.

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

BAGNARA, J. T.; FERNANDEZ, P. J. Hormonal influences on the development of amphibian pigmentation patterns. *Zool Sci*, v. 10, p. 733-748, 1993.

BALSALOBRE, A. *et al.* A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, v. 93, p. 929-937, 1998.

- BALDO, M. V. C. Visão, In: *Fisiologia*. Aires, M. M. (Coord.). Rio de Janeiro, ed. Guanabara-Koogan, p. 288-311, 2007.
- BAN, E. *et al.* The signaling pathways in photoresponses that may be mediated by visual pigments in erythrophores of Nile tilapia. *Pigment Cell Res*, v. 18, p. 360-369, 2005.
- BARR, L.; ALPEN, M. Photosensitivity of the frog iris. *J Gen Physiol*, v. 46, p. 1249-1265, 1963.
- BELLINGHAM, J.; FOSTER, R. Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell Tissue Res*, v. 309, p. 57-71, 2002.
- BELLINGHAM, J. *et al.* Zebrafish melanopsin: isolation, tissue localization and phylogenetic position *Brain Res Mol Brain Res*, v. 107, p.128-136, 2002.
- BELLINGHAM, J. *et al.* Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *PLoS Biol*, v. 4, p. 1334-1343, 2006.
- BENEDITO-SILVA, A. A. Aspectos metodológicos da cronobiologia. In: Marques N. & Menna-Barreto L. S. (eds.) *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*, 3ª. Ed., EDUSP: 297-320, 2003.
- BERSON, D. *et al.* Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, v. 295, p. 1070-1073, 2002.
- BLOCH, K. D. *et al.* cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin 3. *J Biol Chem*, v. 264, p. 18156-18161, 1989.

- CARR, A. J.; WHITMORE, D. Imaging of single light-responsive clock cells reveals fluctuating free-running periods. *Nat Cell Biol.*, v. 7, p. 319-321, 2005.
- CAMARGO, C. R. *et al.* Physiological color change in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Exp. Zool*, v. 283, p.160-169, 1999.
- CASTRUCCI, A. M. L. *et al.* A teleost skin bioassay for melanotropic peptides. *Gen Comp Endocrinol*, v. 66, p. 374-378, 1987.
- CEREJIDO, M. La vida y el tiempo. In: Cerejido, F. B. Del tiempo, cronos, Freud, Einstein y los genes. México: Folios Ediciones, 1983.
- CHAURASIA, S. S. *et al.* Molecular cloning, localization and expression of chicken melanopsin (Opn4): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types. *J Neurochem*, v. 92, p. 158-170, 2005.
- 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, p. 123-133, 2005.
- COLLIN, J. P. *et al.* Pineal transducers in the course of evolution: molecular organization, rhythmic metabolic activity and role. *Arch Histol Cytol*, v. 52, p. 441-449, 1989.
- DANIOLOS, A. *et al.* Action of light on frog pigment cells in culture. *Pigment Cell Res*, v. 3, p. 38-43, 1990.

DEGUCHI, T. A circadian oscillator in cultured cells of chicken pineal gland. *Nature*, v. 282, p. 94-96, 1979.

EDMUNDS-JÚNIOR, L. N. Chronobiology at the cellular and molecular levels: models and mechanisms for circadian timekeeping. *Am J Anat*, v. 168, p. 389-431, 1983.

EMOTO, N.; YANAGISAWA, M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem*, v. 270, p. 15262-15268, 1995.

FARHAT, F. P, *et al.* Melanopsin and clock genes: regulation by light and endothelin in the zebrafish ZEM-2S cell line. *Chronobiol Int*, v. 26, p. 1090-1119, 2009.

FIELD, M. D. *et al.* Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron*, v. 25, p. 437-447, 2000.

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

FILADELFI, A. M. C. *et al.* Adrenoceptors in vertebrate pigment cells: a comparative approach. *J Comp Physiol*, v. 172, p. 599-602, 2002.

FILADELFI, A. M. C. *et al.* 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, p. 480-487, 2004.
- FUJII, R. The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment Cell Res*, v. 13, p. 300-319, 2000.
- FUJII, R. Cytophysiology of fish chromatophores. *Int Rev Cytol*, v. 143, p. 191-255, 1993.
- FUJII, R.; OSHIMA, N. Control of chromatophores movements in teleost fishes. *Zool Sci*, v. 3, p. 13-47, 1986.
- FUJITA, T.; FUJII, R. Endothelin disperses light-scattering organelles in leucophores of the medaka, *Oryzias latipes*. *Zool Sci*, v. 14, p. 559-569, 1997.
- GOWER, B. A. *et al.* Effect of photoperiod, testosterone, and estradiol on body mass, bifid claw size, and pelage color in collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*). *Gen Comp Endocrinol*, v. 93, p. 459-470, 1994.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro/RJ, pp. 632, 2002.
- GROOS, G. The comparative physiology of extraocular photoreception. *Experientia*, v. 15, p. 989-991, 1982.
- HACHIYA, A. *et al.* Biochemical characterization of endothelin-converting enzyme-1 alpha in cultured skin-derived cells and its postulated role in the stimulation of melanogenesis in human epidermis. *J Biol Chem*, v. 277, p. 5395-5403, 2002.

- HALL, J. C.; ROSBASH, M. Genetics and molecular biology of rhythms. *Bioessays*, v. 3, p. 108-112, 1987.
- HANNIBAL, J. *et al.* Light dependent induction of cFos during subjective day and night in PACAP-containing ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Biol Rhythms*, v. 16, p. 457-470, 2001.
- HANNIBAL, J. Regulation of melanopsin expression. *Chronobiol Int*, v. 23, p. 159-166, 2006.
- HAYASHI, H. *et al.* The endothelin receptors that mediate aggregation of pigment in fish melanophores. *Comp Biochem Physiol*, v. 115, p. 143-152, 1996.
- IMOKAWA, G. *et al.* Differential analysis of experimental hypermelanosis induced by UVA, PUVA, and allergic contact dermatitis using a brownish guinea pig model. *Arch Dermatol Res*, v. 278, p. 352-362, 1986.
- IMOKAWA, G. *et al.* Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J Biol Chem*, v. 267, p. 24675-24680, 1992.
- IMOKAWA, G. *et al.* 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, p. 32-37, 1995.
- IMOKAWA, G. *et al.* Signalling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *Biochem J*, v. 314, p. 305-312, 1996.

- IMOKAWA, G. *et al.* The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res*, v. 10, p. 218-228, 1997.
- IMOKAWA, G. *et al.* 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, p. 33321-33328, 2000.
- INOUE, A. *et al.* The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci*, v. 86, p. 2863-2867, 1989.
- ISOLDI, M. C. *et al.* Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc Natl Acad Sci*, v. 102, p. 1217-21, 2005.
- KANG, H. *et al.* Endothelin-B receptor-mediated Ca²⁺ signaling in human melanocytes. *Pflugers Arch*, v. 435, p. 350-356, 1998.
- 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, p. 19126-19133, 1993.
- 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, p. 1325-1333, 1994.

- KIDO, T., SAWAMURA, T.; MASAKI, T. The processing pathway of endothelin-1 production. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 31, p. S13-S15, 1998.
- KITTA, K. *et al.* Effects of prolactins on the chromatophores of the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Gen Comp Endocrinol*, v. 92, p. 355-365, 1993.
- KLOOG, Y.; SOKOLOVSKY, M. Similarities in mode and sites of action of sarafotoxins and endothelins. *Trends Pharmacol Sci*, v. 10, p. 212-214, 1989.
- KLOOG, Y. *et al.* Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science*, v. 242, p. 268-270, 1988.
- KO, C. H.; TAKAHASHI, J. S. Molecular components of mammalian circadian clock. *Human Mol Genet*, v. 15, p. R271-R277, 2006.
- KOBAYASHI, A. *et al.* Inhibitory mechanism of an extract of *Althaea officinalis* L. on endothelin-1-induced melanocyte activation. *Biol Pharm Bull*, v. 25, p. 229-234, 2002.
- KOIZUMI, S. *et al.* Endothelin increased $[Ca^{2+}]_i$ in cultured neurones and slices of rat hippocampus. *Neuroreport*, v. 5, p. 1077-1080, 1994.
- KOLCH, W. *et al.* Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, v. 364, p. 249-252, 1993.

- KORNMANN, B. *et al.* System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol*, v. 2, p. e34, 2007.
- KUMBALASIRI, T. *et al.* Melanopsin triggers the release of internal calcium stores in response to light. *Photochem Photobiol*, v. 83, p. 273-279, 2006.
- LIMA, H. R. G. *et al.* Clock genes, melanopsins, melatonin and dopamine and their modulation by light and glutamate in chicken embryonic retinal cells. *Chronobiol Int*, no prelo, 2010.
- LOPES, G. J. D. *et al.* Modulation of rhodopsin gene expression and signaling mechanisms evoked by endothelins in goldfish and murine pigment cell lines. *Braz J Med Biol Res*, v. 43, p. 828-836, 2010.
- MARQUES, M. D. *et al.* Adaptação temporal. In: *Cronobiologia: Princípios e aplicações*. São Paulo: EDUSP. pp. 55-97, 2003.
- MASAKI, T. *et al.* Physiology and pharmacology of endothelins. *Med Res Rev*, v. 12, p. 391-421, 1992.
- MILLER, W. H.; CAWTHON, D. F. Pigment granule movement in *Limulus* photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, v.13, p. 401-405, 1974.
- MORIYA, T. *et al.* Light-sensitive response in melanophores of *Xenopus laevis*: Spectral characteristics of melanophore response in isolated tail fin of *Xenopus* tadpole. *J Exp Zool*, v. 276, p. 11-18, 1996.

- MOORE, R. Y. *et al.* The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol*, v. 3, p. 351-366, 1995.
- MURATA, N.; Fujii, R. Pigment-aggregating action of endothelins on medaka xanthophores. *Zool Sci*, v. 17, p. 853-862, 2000.
- NATH, K. *et al.* Effects of ethidium bromide and SYBR Green I on different polymerase chain reaction systems. *J Biochem Biophys Methods*, v. 42, p. 15-29, 2000.
- OHTA, T. Melanosome dispersion in direct response to light in melanophores of *Rhodeus ocellatus* fry. *Annot Zool Jpn*, v. 56, p. 155-162, 1983.
- OHTA, T.; SUGIMOTO, S. Leucosome dispersion under light in medaka leucophores. *Jpn J Ichthyol*, v. 27, p. 72-76, 1980.
- OSHIMA, N. Direct reception of light by chromatophores of lower vertebrates. *Pigment Cell Res*, v. 14 p. 312-319, 2001.
- OSHIMA, N. *et al.* Light-induced pigment aggregation in xanthophores of the medaka *Oryzias latipes*. *Pigment Cell Res*, v. 11, p. 362-367, 1998.
- OSHIMA, N.; YOKOZEKI, A. Direct control of pigment aggregation and dispersion in tilapia erythrophores by light. *Zool Sci*, v. 16, p. 51-54, 1999.

- PANDA, S. *et al.* Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science*, v. 298, p. 2213-2216, 2002.
- PANDA, S. *et al.* Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, v. 301, p. 525-527, 2003.
- PITTENDRIGH, C. S. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* v. 25, p. 159-184, 1960.
- PIUHOLA, J.; SZOKODI, I.; RUSKOAHO, H. 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, p. 338-344, 2007.
- PROVENCIO, I. *et al.* Melanopsin: an opsin in melanophores, brain, and eyes. *Proc Natl Acad Sci*, v. 95, p. 340-345, 1998.
- 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, p. 551-558, 2006.
- REITER, R. T. Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol*, v. 79, p. C153-C158, 1991.
- REPERT, S.; WEAVER, D. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*, v. 63, p. 647-676, 2001.
- 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, p. 125-134, 2005.
- ROLLAG, M. D. *et al.* Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms*, v. 18, p. 227-234, 2003.
- RUBANYI, G. M.; POLOKOFF, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, v. 46, p. 325-415, 1994.
- RUFFOLO, R. F. *et al.* Structure and function of α -adrenoceptors. *Pharmacol Rev*, v. 43, p. 475-505, 1991.
- SAITO, Y. *et al.* Detection and characterization of endothelin-1-like immunoreactivity in rat plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 163, p. 1512-1516, 1989.
- SAKURAI, T. *et al.* Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, v. 348, p. 732-735, 1990.
- SAKURAI, T. *et al.* Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci*, v. 13, p. 103-108, 1992.
- SATO, M. *et al.* Direct effects of visible and UVA light on pigment migration in erythrophores of Nile tilapia. *Pigment Cell Res*, v. 17, p. 519-524, 2004.
- SCOTT, M; SUZUKI, I; ABDEL-MALEK, Z. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by

paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res*, v. 5, p. 433-439, 2002.

SELDENRIJK, R. *et al.* Morphological and physiological aspects of melanophores in primary culture from tadpoles of *Xenopus laevis*. *Cell and Tissue Research*, v.198, p. 397-409, 1979.

SHRAGA-LEVINE, Z.; SOKOLOVSKY, M. cGMP formation in rat atrial slices is ligand and endothelin receptor subtype specific. *Circ Res*, v. 78, p. 424-430, 1996.

SOKOLOVSKY, M. Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Trends Biochem Sci*, v. 16, p. 261-264, 1991.

SOKOLOVSKY, M.; SHRAGA-LEVINE, Z.; GALRON, R. Ligand-specific stimulation/inhibition of cAMP formation by a novel endothelin receptor subtype. *Biochemistry*, v. 33, p. 11417-11419, 1994.

STJERNQUIST, M. Endothelins-vasoactive peptides and growth factors. *Cell Tissue Res*, v. 292, p. 1-9, 1998.

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-S335, 2004.

TAKAHASHI, J. S. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Rev Neurosci.*, v. 18, p. 531-553, 1995.

TUREK, F. W. Circadian rhythms. *Hormone Res*, v. 49, p. 109-113, 1988.

- VISCONTI, M. A. *et al.* Elasmobranch color change: a short review and novel data on hormone regulation. *J Exp Zool*, v. 284, p. 485-491, 1999.
- WELSH, D. K. *et al.* Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, v. 14, p. 697-706, 1995.
- WHITMORE, D. *et al.* Light acts on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature*, v. 404, p. 87-91, 2000.
- WOLF, S. *et al.* Stimulation of serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 gene expression by endothelin-1. *Biochem Pharmacol*, v. 71, p. 1175-1183, 2006.
- YADA, Y. *et al.* Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J Biol Chem*, v. 266, p.18352-18357, 1991.
- YAMAMOTO, T. *et al.* Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol Biol*, v. 5, p. 18, 2004.
- YAMAZAKI, S. *et al.* Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. v. 5466, p.682-685, 2000.
- YANAGISAWA, H. *et al.* Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development*, v. 125, p. 825-836, 1998.

YANAGASAWA, M. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, v. 332, p. 411-415, 1988.

YOHN, J. J. *et al.* Cultured human keratinocytes synthesize and secrete endothelin-1. *J Invest Dermatol*, v. 100, p. 23-26, 1993.