

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**A translocação pigmentar em cromatóforos ovarianos do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi* (Crustacea, Decapoda): do receptor aos motores moleculares**

Sarah Ribeiro Milograna

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Ribeirão Preto - SP

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**A translocação pigmentar em cromatóforos ovarianos do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi* (Crustacea, Decapoda): do receptor aos motores moleculares**

Sarah Ribeiro Milograna

Orientador: Dr. John Campbell McNamara

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Ribeirão Preto - SP

2010

## Ficha Catalográfica

Milograna, SR

A translocação pigmentar em cromatóforos ovarianos do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi* (Crustacea, Decapoda): do receptor aos motores moleculares. Ribeirão Preto, 2010.

116 p. : Il. ; 29,7 cm

Bibliografia: p. 95- 116

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Biologia Comparada.

Orientador: McNamara, John Campbell.

1. Cromatóforos. 2. Sinalização intracelular  
3. Translocação pigmentar. 4. Motores moleculares. 5.  
Mudança de cor

Capa: Micrografia de cromatossomos fixados no estado disperso, evidenciando a miosina II não-muscular. Marcação com anticorpo policlonal anti-miosina II não-muscular (Verde). Imagem adquirida em microscópio confocal TCS SP5. Escala= 20  $\mu$ M.

Aos meus pais,  
Wanya e Tulio, com todo o meu amor e gratidão.

*“Eles nunca me disseram que seria fácil, só disseram que VALERIA A PENA!”*

## Índice

Agradecimentos.....	vi
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	viii
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. <u>Adaptação cromática</u> .....	1
1.2. <u>A mudança de cor cromotora em camarões palemonídeos</u> .....	4
1.3. <u>Neuropeptídeos da família AKH/RPCH e seus receptores</u> .....	7
1.4. <u>A dependência de íons para a indução da agregação</u> .....	9
<u>pigmentar e receptores ionotrópicos</u> .....	10
1.5. <u>Os segundos mensageiros da agregação pigmentar</u> .....	11
1.6. <u>Cascatas de sinalização induzidas por Ca<sup>2+</sup>/GMPc</u> .....	13
1.7. <u>O citoesqueleto e os motores moleculares</u> .....	15
1.8. <u>Proteínas cinases e fosfatases reguladoras da miosina</u> .....	18
2. Objetivos.....	20
2.1 <u>Objetivo geral</u> .....	20
2.2 <u>Objetivos específicos</u> .....	20
3. Materiais e Métodos.....	22
3.1. <u>Coleta e manutenção dos camarões</u> .....	22
3.2. <u>Preparação do ovário contendo os cromatossomos</u> .....	22

3.3. <u>Solução fisiológica utilizada na perfusão</u> .....	23
3.4. <u>O sistema de perfusão e a quantificação da translocação pigmentar</u> .....	23
3.5. <u>Experimentos Fisiológicos</u> .....	24
3.5.1. Experimento controle a 5 nM- caracterização da preparação.....	25
3.5.2. GDP- $\beta$ -S a $10^{-5}$ M - inibição de GPCR.....	26
3.5.3. Antagonista da proteína G (AntPG) a $5 \times 10^{-6}$ M – inibição de GPCR.....	26
3.5.4. CNQX a $5 \times 10^{-5}$ M - inibição de receptor de glutamato não-NMDA.....	26
3.5.5. AMPA a $3 \times 10^{-5}$ M - ativação de receptor de glutamato não-NMDA.....	26
3.5.6. L-NAME a $5 \times 10^{-3}$ M - inibição da NOS.....	26
3.5.7. Rp-sGMPc-trietilamina (sGMPc) a $3 \mu$ M - inibição específica da PKG.....	27
3.5.8. Cantaridina a $10 \mu$ M - inibição da MLCP.....	27
3.5.9. ML-7 a $10 \mu$ M – inibição da MLCK.....	27
3.5.10. H-1152 a $5 \times 10^{-8}$ - Inibição altamente específica da ROCK.....	27
3.5.11. Y-27632 a $3 \times 10^{-6}$ – inibição da ROCK.....	27
3.5.12. Blebistatina a $10 \mu$ M – inibição específica da miosina II não-muscular.....	28

3.6. <u>Análise quantitativa dos experimentos fisiológicos</u> .....	28
3.7. <u>Análises estatísticas</u> .....	29
3.8. <u>Preparação imunocitoquímica para microscopia de fluorescência</u> .....	29
3.8.1 Dissecção, fixação e permeabilização dos ovários.....	29
3.8.2. Bloqueio dos sítios inespecíficos.....	30
3.8.3 Marcação com anticorpos primários.....	30
3.8.4. Marcação com anticorpos secundários conjugados a fluoróforos.....	31
3.8.5. Pós-fixação facultativa.....	32
3.8.6. Montagem das lâminas.....	32
3.8.7. Marcação dos microfilamentos de actina.....	33
3.8.9. Observação por microscopia de fluorescência.....	33
4. Resultados .....	34
4.1. <u>RPCH-controle</u> .....	34
4.2. <u>Receptores associados à proteína G (GDP-β-S e Antagonista da proteína     G)</u> .....	36
4.3. <u>Receptores de glutamato não-NMDA (CNQX e AMPA)</u> .....	39
4.4. <u>Óxido nítrico sintase (L-NAME)</u> .....	43
4.5. <u>Proteína cinase G (Rp-sGMPC-trietilamina)</u> .....	45
4.6. <u>Fosfatase (MLCP) e cinase (MLCK) da cadeia leve da miosina (Cantaridina e     ML-7)</u> .....	47
4.7. <u>Cinase da proteína Rho (Y-27632 e H-1152)</u> .....	51
4.8. <u>Miosina-II não-muscular (Blebistatina)</u> .....	54



4.9. <u>Microscopia de imunofluorescência de citoesqueleto e motores moleculares</u> .....	56
4.9.1. Autofluorescência.....	56
4.9.2. Controle.....	58
4.9.3. Os microfilamentos de actina.....	58
4.9.4 Os microtúbulos.....	60
4.9.5. Os motores moleculares.....	62
5. Discussão.....	72
5.1. <u>O Receptor do RPCH</u> .....	72
5.2. <u>A cascata de sinalização do GMPc</u> .....	76
5.3. <u>A regulação da miosina durante a translocação pigmentar</u> .....	79
5.4. <u>Os motores moleculares e a translocação dos grânulos de pigmento pelo citoesqueleto</u> .....	81
5.4.1. A miosina.....	81
5.4.2. Os microfilamentos de actina.....	84
5.4.3. Os microtúbulos.....	85
5.4.4. A cinesina e a dineína.....	86
5.4.5. Interações complexas entre motores moleculares e o citoesqueleto.....	87
6. Conclusão.....	92
7. Perspectivas futuras.....	94
8. Referências Bibliográficas.....	95

## **Agradeço a**

Meu orientador Prof. Dr. John Campbell McNamara, por todos os conhecimentos ensinados. Pela sabedoria de sua orientação cuidadosa, presente em todos os momentos com atitudes surpreendentemente sensatas. Agradeço imensamente por todos esses anos de convívio, nos quais pude absorver seu exemplo de profissionalismo, coerência e paixão pela ciência. Pelo apoio forte, que me foi essencial em muitos momentos, pela amizade e pela confiança em mim depositada.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, representado pela Coordenadora Profa. Dra. Márcia Maria Gentili Bitondi e pelo Vice-coordenador Prof. Dr. Ricardo Macedo Correa e Castro, pelo acolhimento enquanto pós-graduanda.

Ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, representado pelo chefe Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo e pela a suplente Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo, e a todos os seus funcionários.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (processo #2008/52647-0) pelo apoio em forma de Bolsa de Mestrado.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, IBAMA, pela autorização (autorização 18559-1) para as coletas dos camarões *Macrobrachium olfersi*.

Ao CEBIMar (projeto #2005/13) por disponibilizar estadias, refeições, suporte técnico e infra-estrutura para manutenção dos camarões durante as coletas, e a todos os seus funcionários, pelo ajuda e convivência agradável.

À Prof. Dra. Munira Muhammad Abdel Baqui pelo ensinamento da técnica de imunohistoquímica e pelas análises e micrografias realizadas no Microscópio Confocal. Obrigada por sua disponibilidade, paciência e pela companhia agradável. Agradeço também ao Prof. Dr. Roy Larson por ter nos cedido anticorpos do departamento de

Biologia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, e à Hellen Cristina Ferreira Ishikawa, que produziu o anticorpo anti-miosina II não-muscular.

Ao Prof. Dr. Wagner Ferreira, pela disponibilização do Microscópio de Epifluorescência da FFCLRP-USP, e ao José, pelo auxílio na utilização do mesmo e pela disponibilidade.

À Prof. Dra. Tiana Kolsdorf e à Marina Singarete, pela disponibilização do Freezer -80°C da FFCLRP-USP para o armazenamento do GDP- $\beta$ -S durante o período deste experimento.

À Dra. Márcia Regina Ribeiro e à Fernanda Tinti Bell pelo material de estudo, artigos e anotações deixados no laboratório, fontes de ajuda e inspiração.

Aos queridos colegas de laboratório Cláudia Doi Antunes, Rogério Faleiros e Samuel Coelho de Faria pelo apoio e companheirismo em todos os momentos, pela amizade, e pelas interessantes discussões e compartilhamento de idéias ao longo desses anos.

À técnica Suzie Keiko, do Laboratório de Fisiologia de Crustáceos do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto pelo apoio técnico tão competente, pela enorme prestatividade, e pela amizade.

Aos motoristas da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras pela condução do Toyota até São Sebastião e pela ajuda nas coletas dos camarões. E ao Sr. Valdemar, por facilitar de bom grado nosso acesso ao Rio Paúba.

À toda a minha família e aos meus amigos queridos, que me dão todo o apoio sempre. Especialmente, a meus pais, pela formação proporcionada, por estarem sempre tão motivados e confiantes na minha caminhada, e à Julia.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para a execução deste trabalho.

**Lista de Abreviaturas e Siglas**

A23187: ionóforo de cácio

AKAP: proteína ancoradora de cinase A

AKHs: hormônios adipocinéticos

AMPA: [(+)- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-ácido propiônico hidrato]

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

AntPG: Antagonista da proteína G

ATP: adenosina trifosfato

ATPase: enzima que cataliza a hidrólise de adenosina trifosfato

BSA: soro de albumina bovino

CaM: calmodulina

CaMK: cinase da calmodulina

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3 diona

dbAMPC: dibutilil adenosina monofosfato cíclico

db-cGMP: dibutilil guanosina monofosfato cíclico

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

EHNA: eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil) adenina

EPM: erro padrão da média

ERK1: cinase regulada por sinal extracelular 1

FITC: fluoresceína isotiocianato

GC-S: guanilato ciclase citosólica

GDP: guanosina difosfato

GDP- $\beta$ -S: guanosina 5'-0-(2-tiodifosfato) sal trilitio

Gly: glicina

GMPC: guanosina 3',5' monofosfato cíclico

GPCRs: receptor sete passos transmembrânico associado à proteína G

GTP: guanosina trifosfato

GTPases: enzima que cataliza a hidrólise de guanosina trifosfato

H-1152: -(S)-(+)-Metil-1-[4-metil-5-isoquinolinil]sulfonil] homopiperazina.2HCl

H8: N-[2-(Metilamina)etil]-5-isoquinolinasulfonamida . 2 HCl

H9: N-(2-Aminoetil)-5-isoquinolinasulfonamida dihidrochloridro

HEK293: células renais embrionárias humanas 293

HEPES: 4-(2-hidroxi-etil)-1-ácido sulfídrico etanopiperazina

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IC<sub>50</sub>: metade da concentração máxima inibitória

InsPn: inositol fosfato

KHC: cadeia pesada da cinesina

KT5283: (9S,10R,12R)-2,3,9,10,11,12-Hexahidro-10-metoxi-2,9-di metil-1-oxo-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-k 1]pirrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocina-10-ácido carboxílico, metil ester

L-NAME: N $\omega$ -Nitro-L-arginina metil ester hidrocloreto

LY83583: 6-anilino-5,8-quinolinediona,

M<sub>2</sub>: receptor muscarínico

MFs: microfilamentos de actina

ML-7: 1-(5-iodonaftaleno-1-sulfonil)homopiperazina HCl

MLCK: cinase da cadeia leve da miosina

MLCP: fosfatase da cadeia leve de miosina

MLC: cadeias leves da miosina

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

MTs: microtúbulos

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo-P

NMDA: N-metil D-Aspartato

NMHC: cadeia pesada dimérica da miosina

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

ODQ: 1H-[1,2,4]oxadiazol-[4,3-a]quinoxalina-1-ona

PBS: solução bifosfato de sódio

PCH: cromatoforotropina agregadora de pigmento

PDH: cromatoforotropina dispersora de pigmento

PF: paraformaldeído

pGlu: piroglutamato

Phe: fenilalanina

PKA: proteína cinase A

PKC: proteína cinase C

PKG: proteína cinase G

PRK-2: proteína cinase relacionada à proteína cinase C

proteína G: proteína heterotrimérica ligadora de GTP

REL: retículo endoplasmático liso

ROCK: cinase da proteína Rho

RPCH: hormônio agregador de pigmento vermelho

RPDH: hormônio dispersor de pigmento vermelho

RPE: epitélio pigmentar retinular

SFP: salina fisiológica padrão

sGMPc: rp-sGMPc-trietilamina

SIN-1: 3-morfolinosidnonimina

SNK: teste Student-Newman-Keuls

SNP: nitroprussiato de sódio

SSC: salina sem cácio

Trp: triptofano

UV: radiação ultra-violeta

UV: ultravioleta A

UVB: ultravioleta B

X: média

Y-27632:(+)-(R)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil)ciclohexanocarboxamida  
dihidrocloridro

ZnPPIX: zinco protoporfirina IX

## Resumo

Para estudar os mecanismos celulares que levam à mudança de cor cromotora em crustáceos investigamos os cromatóforos ovarianos vermelhos do camarão de água doce *Macrobrachium olfersi*. A natureza do receptor do hormônio agregador de pigmento vermelho (RPCH) localizado na membrana plasmática é desconhecida. Muitos eventos das cascatas de sinalização induzidas por  $\text{Ca}^{2+}$  e GMPc, assim como os tipos de motores moleculares por elas ativados, são ainda obscuros. Avaliamos, farmacologicamente, pela perfusão *in vitro* dos cromatossomos com pigmentos inicialmente dispersos, possíveis funções do receptor acoplado à proteína G (GPCR), de receptores de glutamato não-NMDA (rGlu), da óxido nítrico sintase (NOS), da proteína cinase G (PKG), da cinase (MLCK) e da fosfatase (MLCP) da cadeia leve da miosina, da proteína cinase Rho (ROCK) e da miosina II não-muscular no mecanismo que induz a translocação pigmentar. Também investigamos a presença de microfilamentos de actina, microtúbulos, miosinas, cinesina e dineína, por microscopia de fluorescência. A inibição do GPCR com GDP- $\beta$ -S (10  $\mu\text{M}$ ) não tem efeito significativo, mas com AntPG (5  $\mu\text{M}$ ) a agregação induzida por RPCH é inibida em  $\approx 50\%$ , e tem velocidade máxima de  $13,3 \pm 2,1 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-controle,  $16,7 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,85$ ), seguida de dispersão espontânea. A inibição de rGlu com CNQX (50  $\mu\text{M}$ ) causa sutil hiperdispersão e inibe  $\approx 25\%$  da agregação induzida por RPCH, com velocidade máxima de  $16 \pm 1,5 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-controle,  $P=0,95$ ). A estimulação de rGlu com AMPA (30  $\mu\text{M}$ ) causa forte hiperdispersão ( $\approx 115\%$ ) e não afeta a agregação em relação ao RPCH-controle (velocidade máxima de  $16,3 \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,86$ ). Com a inibição da NOS por L-NAME (5 mM), a agregação induzida por RPCH dura 14 min e chega aos  $43,5 \pm 10\%$  de dispersão, com velocidade máxima de  $11,1 \pm 1,3 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-controle,  $P=0,38$ ). Com a PKG inibida por rp-sGMPc-trietilamina (3  $\mu\text{M}$ ), a agregação induzida por RPCH chega aos  $36,2 \pm 5,6\%$  de dispersão em 12 min, com velocidade máxima de  $16,9 \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-controle,  $P=0,626$ ), seguida de dispersão espontânea. A inibição da MLCP com cantaridina (10  $\mu\text{M}$ ) acelera a fase rápida da agregação induzida pelo RPCH ( $25,1 \pm 2,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P= 0,017$ ) e inibe sutilmente sua fase final ( $9,2 \pm 5,1\%$  após 30 min). A inibição da MLCK com ML-7 (10  $\mu\text{M}$ ) não afeta significativamente a agregação induzida pelo RPCH, que atinge  $8,7 \pm 3,14\%$  de dispersão com velocidade máxima de  $14,1 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-controle,  $P= 0,277$ ). As inibições da ROCK com Y-27632 a 3  $\mu\text{M}$  e H-1152 a 50 nM afetam a agregação pigmentar induzida por

RPCH em  $15,4 \pm 4,8\%$  e  $32,8 \pm 14,3\%$ , e as velocidades máximas são similares ao RPCH-controle, de  $18 \pm 3,5 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $P=0,86$ ) e  $13,9 \pm 2,3 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $P=0,9$ ), respectivamente. Com H-1152 ocorre dispersão espontânea; e com ambos os compostos a dispersão durante a lavagem do RPCH é acelerada. A inibição da miosina II não-muscular com blebistatina reduz a resposta ao RPCH, havendo agregação até os  $47 \pm 6,2\%$  em 16 min, com velocidade máxima de  $9,1 \pm 1,5 \mu\text{m}/\text{min}$ , (= RPCH-controle,  $P=0,007$ ), seguida de dispersão espontânea; a dispersão com a lavagem do RPCH ocorre normalmente. Por microscopia de fluorescência foram identificados microtúbulos, presentes nas extensões celulares com o pigmento agregado; microfilamentos de actina, aparentemente formando trilhos aos grânulos pigmentares; miosina II não-muscular, em associação ao citoesqueleto; miosina esquelética e muscular, cinesina e dineína, em associação aos grânulos pigmentares. Evidenciamos que o receptor do RPCH pode ser do tipo GPCR. Os receptores pGlu não parecem ter papel na transdução de sinal deste neuropeptídeo. A NOS, a PKG, a MLCP e a ROCK têm papéis importante na agregação pigmentar, mas a MLCK aparentemente não. Sugerimos que o RPCH se acopla a um receptor associado à proteína  $G_0$  na membrana plasmática, e concomitantemente à elevação da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , desencadeia a ativação da NOS, que produz NO, estimulando da GC-S a liberar GMPc. Este segundo mensageiro ativa a PKG, que fosforila um sítio de ativação da miosina. O movimento da miosina é impulsionado por ciclos de fosforilação/defosforilação em um sítio regulatório de suas cadeias leves, catalizados pela MLCP e pela ROCK. Um dos tipos de miosina ativada pela PKG pode ser a miosina II não-muscular, que parece efetuar principalmente a fase lenta da agregação pigmentar. Outras miosinas e a dineína possivelmente também participam da agregação, enquanto que a cinesina parece ter papel na dispersão pigmentar.



## Abstract

To study the cellular mechanisms that lead to chromatophore color changes in crustaceans, we investigated the red ovarian chromatophores of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersi*. The nature of the receptor for red pigment concentrating hormone (RPCH) in the plasma membrane is unknown. Many events of the induced  $\text{Ca}^{2+}$  and GMPc signaling cascades, as well as types of molecular motors activated are still obscure. We evaluated, using pharmacological perfusions *in vitro* of chromatossomes with initially dispersed pigments, putative functions of a G protein coupled receptor (GPCR), non-NMDA glutamate receptors (rGlu), nitric oxide synthase (NOS), protein kinase G (PKG), myosin light chain kinase (MLCK) and phosphatase (MLCP), Rho protein kinase (ROCK) and non-muscular myosin II in the mechanism that induces pigment translocation. We also investigated by fluorescence microscopy the presence of myosins, kinesin, dinein, actin microfilaments and microtubules. GPCR inhibition with 10  $\mu\text{M}$  GDP- $\beta$ -S has no significant effect, but 5  $\mu\text{M}$  PGAnt inhibits  $\approx 50\%$  of RPCH-triggered aggregation, that has maximum velocity of  $13,3 \pm 2,1 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-control,  $16,7 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,85$ ), followed by spontaneous dispersion. rGlu inhibition with 50  $\mu\text{M}$  CNQX causes subtle hyperdispersion and inhibits  $\approx 25\%$  RPCH induced aggregation, with a maximum velocity of  $16 \pm 1,5 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-control,  $P=0,95$ ). rGlu stimulation with 30  $\mu\text{M}$  AMPA causes strong pigment hyperdispersion ( $\approx 115\%$ ) but does not affect aggregation compared to RPCH-control ( $16,3 \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$  maximum velocity,  $P=0,86$ ). NOS inhibition with 5 mM L-NAME affects RPCH-triggered aggregation, that lasts 14 min and reaches  $43,5 \pm 10\%$  dispersion, with maximum velocity of  $11,1 \pm 1,3 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-control,  $P=0,38$ ). PKG inhibition with 3  $\mu\text{M}$  rp-cGMPs-thietylamine affects RPCH-triggered aggregation, that lasts 2 min and reaches  $36,2 \pm 5,6\%$  dispersion with maximum velocity of  $16,9 \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-control,  $P=0,626$ ), followed by spontaneous dispersion. MLCP inhibition with 10  $\mu\text{M}$  cantharidin accelerates the RPCH-triggered aggregation fast phase ( $25,1 \pm 2,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,017$ ) and subtly inhibits final aggregation ( $9,2 \pm 5,1\%$  after 30 min). MLCK inhibition with 10  $\mu\text{M}$  ML-7 does not significantly affect RPCH-induced aggregation, that reaches  $8,7 \pm 3,14\%$  dispersion with a maximum velocity of  $4,1 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-control,  $P=0,277$ ). ROCK inhibition with 3  $\mu\text{M}$  Y-27632 or 50 nM H-1152 decreases RPCH-triggered pigment aggregation by  $15,4 \pm 4,8\%$  and  $32,8 \pm 14,3\%$ ; maximum velocities are similar to RPCH-control,  $18 \pm 3,5 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $P=0,86$ ) and  $13,9 \pm 2,3 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $P=0,9$ ), respectively. H-

1152 induces spontaneous dispersion; dispersion during RPCH washout is accelerated by both Y-27632 and H-1152. Non-muscular myosin II inhibited with blebbistatin reduces the response to RPCH, aggregation reaching  $47 \pm 6,2\%$  in 16 min, with a maximum velocity of  $9,1 \pm 1,5 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-control,  $P= 0,007$ ), followed by spontaneous dispersion; RPCH washout leads to normal dispersion. Microtubules are present in the cellular extensions in chromatophores with aggregated pigments; actin microfilaments, apparently form trails to associate with pigment granules; non-muscular myosin II is associated with the cytoskeleton; skeletal and muscular myosin, kinesin and dinein, associated with the granules, were revealed by fluorescence microscopy. We showed that the RPCH receptor may be a GPCR. A pGlu receptor does not seem to be present and play a role in signal transduction. NOS, PKG, MLCP and ROCK play important roles in pigment aggregation, although MLCK apparently does not. We suggest that RPCH binds to a  $G_0$  protein coupled receptor in the plasma membrane, and together with cytosolic  $[\text{Ca}^{2+}]$  increase, triggers NOS activation, producing NO, that stimulates GC-S to release cGMP. This second messenger activates PKG, that phosphorylates an activation site on myosin, whose movements are driven by a phosphorylation/dephosphorylation cycle at a regulatory site on the myosin light chain, catalyzed by MLCP and ROCK. One of the PKG activated myosins may be non-muscular myosin II, which seems to effect mainly the slow phase of pigment aggregation. Other myosins and dinein possibly also participate in pigment aggregation, while kinesin seems to play a role in pigment dispersion.

## 1. Introdução

### 1.1. Adaptação cromática

Padrões de coloração animal são tradicionalmente apreciados como modelo para estudos empíricos e para a geração e teste de teorias centrais na biologia evolutiva (Cott, 1940; Ford, 1945; Darwin, 1859; Poulton, 1890; Majerus, 1998). A coloração animal instiga a curiosidade científica não apenas devido ao apelo estético, mas por constituir um aspecto fascinante da diversidade biológica que influencia componentes de desempenho e aptidão dos indivíduos (Forsman, 2008). A coloração tem papel proeminente na sinalização para escolha de parceiro (Andersson, 1994), na sinalização de alerta usada para deter ataques de potenciais predadores (Ruxton *et al.*, 2004) e na camuflagem, mecanismo crucial de defesa para considerável parcela do reino animal (Southerland *et al.*, 2008).

O arsenal de estratégias de camuflagem por mudança de cor varia desde o escurecimento/clareamento para imitação de substrato até respostas mais chamativas como aposematismo, mimetismo, disruptão (Stevens & Merilaita, 2009a), entre outras. Alguns animais apresentam resposta predador-específica, utilizando-se conjuntamente de padrões de coloração e comportamento (Stuart-Fox & Moussalli, 2009). O octopus *Thaumoctopus mimicus* mimetiza um repertório impressionante de animais venenosos (Norman *et al.* 2001). A lula *Sepia officinalis* distingue entre seus predadores aqueles que a reconhecem visualmente, e os confundem com aparências específicas (Langridge *et al.*, 2007). Camaleões desaparecem-se imitando o substrato também de maneira distinta diante de cada predador (Stuart-Fox & Moussalli, 2008). Alguns isópodes marinhos adotam colorações disruptivas (Merilaita, 1998; Hanlon & Messenger, 1988), que conferem aparência de falsas bordas, escondendo o verdadeiro formato do corpo (Stevens

& Marilaita, 2009b). Mais de 300 espécies de aranhas, pertencentes a 13 famílias, mimetizam formigas (Cushing 1997; Nelson & Jackson 2007a; Théry & Casas, 2009).

Nos animais ectotérmicos, a cor influencia na regulação da temperatura corpórea (Forsman, 2008). Em peixes, répteis, anfíbios e crustáceos, a temperatura é um dos estímulos que afetam a liberação de hormônios que controlam a distribuição pigmentar (Fernandez & Bagnara, 1991; Castrucci *et al.*, 1997; Visconti *et al.*, 1999; Hoglund *et al.* 2002). O escurecimento e o branqueamento resultantes acarretam em absorção e reflexão de calor, respectivamente (Stuart-Fox *et al.*, 2009). A temperatura determina a disponibilidade energética para locomoção, afetando as capacidades de forrageamento, de fuga de predadores e a competição interespecífica por parceiros sexuais (Huey & Kingsolver, 1989).

Outra função da pigmentação é a proteção contra a radiação ultravioleta (UV), essencial à sobrevivência de alguns organismos cujo DNA é altamente suscetível à degradação e que enfrentam períodos de elevada exposição à luz solar, como o krill antártico. Dependente também da proteção por camuflagem nas colunas de água translúcidas, o crustáceo alterna rapidamente entre a transparência e uma aparência escura que protege contra a luz UV, balanceando entre ambas as necessidades (Auerswald *et al.*, 2008).

Como ilustrado por esses exemplos, há interações complexas entre as funções da mudança cromática, e apesar dos esforços, entender tais interações é um importante desafio a biólogos evolucionistas (Stuart-Fox & Moussalli 2008). Por ser uma característica altamente relevante à evolução, os padrões de coloração são modelos de estudo de seleção, microevolução e ecologia (Forsman, 2008).

A habilidade de mudar de cor é um atributo da existência de células pigmentares especializadas, genericamente conhecidas como cromatóforos, que podem ser mono ou

policromáticos, contendo pigmentos de cor vermelha, amarela, laranja, azul, marrom, preta ou branca (Rao, 1985). Há dois principais tipos de mudança cromática: (i) a cromogênica ou morfológica, baseada na alteração do número e tipo de cromatóforos em períodos variáveis de dias a meses, envolvendo síntese de pigmentos e possivelmente ativação de genes e (ii) a cromomotora ou fisiológica, resultante da translocação bidirecional de grânulos de pigmento no citoplasma dos cromatóforos, exceto em moluscos cefalópodes (Nery & Castrucci, 1997); é muito mais rápida, podendo levar de segundos a horas (Thurman, 1988; Stuart-Fox & Moussali, 2009).

Mudanças de cor cromomotora e cromogênica estão interligadas, e sua relação é explanada pela Lei de Babak: quando o pigmento permanece disperso ou agregado por um extenso período (dias, meses) devido à estabilidade prolongada das condições de luminosidade e substrato, a concentração de pigmentos e/ou o número de cromatóforos aumenta ou diminui (Auerswald *et al.*, 2008).

A mudança de cor *cromomotora* ocorre em uma ampla variedade de invertebrados e vertebrados ectotérmicos incluindo crustáceos (Thurman, 1988), insetos (Hinton & Jarman, 1972; Filshie *et al.*, 1975), cefalópodes (Norman, 2000; Hanlon, 2007), anfíbios (King *et al.*, 1994; Garcia & Sih, 2003), répteis (Cooper & Greenberg, 1992) e peixes (Kodric-Brown, 1998). Geralmente é uma resposta imediata a um estímulo ambiental, como coloração do substrato, intensidade luminosa, ou mudança no contexto social. Pode ser controlada pelo sistema neuromuscular (cefalópodes; Messenger, 2001) ou pelo neuroendócrino na maioria dos outros taxons (Nery & Castrucci, 1997; Stuart-Fox & Moussali, 2009).

Um dos modelos para estudo de mudanças de cor é o grupo dos crustáceos, e principalmente os Decapoda têm sido extensivamente investigados (Auerswald *et al.*, 2008). Dentro dos decápodes, as relações da coloração com o comportamento e a

estrutura social têm sido bastante investigadas em caranguejos, nos quais são altamente complexas. As mudanças de cor são dirigidas por ritmo endógeno sincronizado com regimes tidais (Rao, 1985; Thurman, 1988; Granato *et al.*, 2004) e estão relacionadas à atração sexual, *status* social, camuflagem, sinalização para confundir pássaros e regulação térmica (Thurman, 1990). São ainda moduladas por motivação e estresse, interações agonísticas intraespecíficas, propriedades da dieta e do substrato, por idade e por genética populacional (Hemmi *et al.*, 2006; Detto *et al.*, 2006).

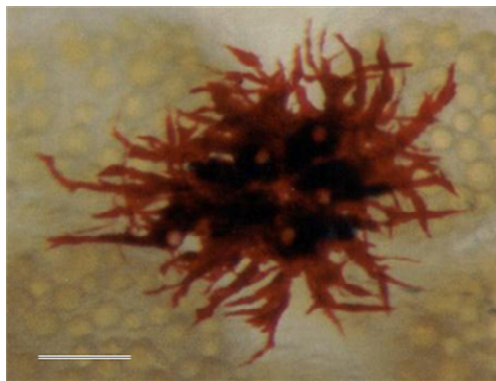
Para o estudo dos mecanismos fisiológicos intracelulares em cromatóforos que levam à mudança de cor cromomotora, no entanto, os camarões representam um modelo mais adequado, já que em muitos caranguejos a amplitude deste processo não é tão notável (Fingerman & Rosenberg, 1988). O presente trabalho destina-se à investigação com enfoque comparativo desses mecanismos no camarão de água doce *Macrobrachium olfersi*, cujo comportamento e demais relações funcionais da adaptação cromática são obscuros.

O gênero *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Caridea: Palemonidae) constitui um dos mais diversos, abundantes (cerca de 260 espécies) e distribuídos gêneros de crustáceos (Murphy & Austin, 2005), espalhado globalmente por regiões tropicais e subtropicais (Pereira *et al.*, 2002). A maior diversidade de espécies ocorre na região Indopacífica, embora as Américas do Sul e Central também acomodem um número substancial. Habitam uma ampla variedade de ambientes, de riachos em diversas altitudes a estuários e lagoas costeiras (Murphy & Austin, 2005).

## **1.2. A mudança de cor cromomotora em camarões palemonídeos**

Como nos demais crustáceos, os cromatóforos em *Macrobrachium* são assimétricos, constituídos por um corpo celular ou pericário que contém o núcleo e a

principal massa de grânulos de pigmento, e de uma ou duas extensões celulares, ramificadas em um padrão reticulado de finos dendritos através dos quais os pigmentos migram (Robison & Charlton, 1973; McNamara, 1981; McNamara & Taylor, 1987). Ultra-estruturalmente, são compostos por microfilamentos de actina (MFs), feixes de microtúbulos (MTs), retículo endoplasmático liso (REL) bem desenvolvido e mitocôndrias semi-esféricas (McNamara & Ribeiro, 1999; McNamara & Taylor, 1987). Os cromatóforos representam a menor unidade funcional do sistema de efetadores pigmentares, e em *M. olfersi* são monocromáticos, tipicamente ligados em grupos de 10 a 12, formando os cromatossomos (Fig. 1) (McNamara, 1981; McNamara & Ribeiro, 1999).



**Figura 1.**  
**Cromatossomo vermelho, multicelular,**  
**do ovário do camarão, *Macrobrachium***  
***olfersi*. Escala = 50  $\mu$ m.**

McNamara JC & Ribeiro MR

Estes efetadores multicelulares localizam-se principalmente na epiderme do integumento do crustáceo, embora um número considerável se disponha sobre órgãos como o ovário, e os sistemas nervoso central e somato-gástrico (Fingerman, 1985). No ovário, os cromatossomos localizam-se no tecido da cápsula fibrosa que o reveste, adjacentes a fibroblastos.

Os cromatóforos ovarianos de *M. olfersi* apresentam dois tipos de grânulos pigmentares vermelhos, um irregular, limitado por membrana, que possui material elétron denso e diâmetro de <450 nm, visível ao microscópio de luz; e outro menor,

esférico, sem membrana, constituído de material elétron lucente, com diâmetro de <140 nm e invisível ao microscópio de luz (McNamara & Ribeiro, 1999).

Hormônios peptídicos neurosecretados e antagonicos, as cromatoforotropinas, produzidas e liberadas na hemolinfa pelo complexo órgão-X/glândula do seio localizado nos pedúnculos ópticos e por outros órgãos neuro-hemais do sistema nervoso central regulam a translocação centrípeta e centrífuga dos grânulos de pigmento em decápodes (Rao, 1985). A regulação se dá em resposta à percepção da *taxa de albedo*, ou diferença entre a iluminação que incide dorsalmente aos pedúnculos ópticos e a luz refletida do substrato, que atinge ventralmente o mesmo órgão sensorial (Rao, 1985). Os neuropeptídeos são frequentemente específicos para cada tipo pigmentar, embora genericamente denominados de cromatoforotropinas agregadoras (PCHs) ou dispersoras (PDHs) de pigmento (Josefsson, 1983; Rao & Fingerman, 1983; Fingerman, 1985).

Os PDHs existem em várias formas análogas em crustáceos e insetos (Rao & Riehm, 1989), e são os principais neurohormônios envolvidos na adaptação cromática em caraguejos e isópodes. No caranguejo *Uca rapax*, o  $\alpha$  e o  $\beta$ -PDH causam dispersão pigmentar dose-dependente. Em *Ligia exotica*, apenas o  $\alpha$ -PDH induz dispersão dose-dependente, enquanto o  $\beta$ -PDH causa uma resposta parcial dose-independente. Em *Macrobrachium acanthurus*, o  $\alpha$ -PDH causa dispersão parcial dose-dependente, mas o  $\beta$ -PDH não apresenta efeito (Tuma *et al.*, 1993). O  $\alpha$  e o  $\beta$ -PDH induzem dispersão pigmentar dose-dependente em *M. potiuna* (Britto *et al.*, 1990). Em *M. olfersi*, o  $\alpha$ -PDH desencadeia dispersão pigmentar parcial (50%) seguida de agregação pigmentar (Ribeiro, 1998). Já o PCH causa agregação apenas em camarões, induzindo resposta completa em cromatóforos de *M. acanthurus* (Tuma *et al.*, 1993).

Nos camarões carídeos, as cromatoforotropinas são chamadas de hormônio agregador de pigmento vermelho (RPCH) e hormônio dispersor de pigmento vermelho



(RPDH). O RPCH também induz a agregação de outros pigmentos escuros em cromatóforos de carídeos (Fernlund & Josefsson, 1968, 1972; Josefsson, 1983).

### **1.3. Neuropeptídeos da família AKH/RPCH e seus receptores**

O RPCH, um pequeno e altamente conservado octapeptídeo, isolado e caracterizado a partir dos pedúnculos ópticos de *Pandalus borealis* (Panbo-RPCH, Fernlund & Josefsson, 1968), foi o primeiro neuropeptídeo a ser sequenciado de um invertebrado (Fernlund & Josefsson, 1972). Depois disso, foi encontrado em muitos outros decápodes (Rao, 2001; Marco *et al.*, 2002): *Cancer magister*, *Carcinus maenas*, *Orconectes limosus* (Gaus *et al.*, 1990), *Penaeus japonicus* (Yang *et al.*, 1999), *Callinectes sapidus* (Klein *et al.*, 1995), *Liocarcinus puber*, *Nephrops norvegica*, *Pacifastacus leniusculus*, *Procambarus clarkii*, *Palaemon squilla*, *Palaemonetes pugio*, *Homarus americanus*, *Cardiosoma carnifex* (Gaus *et al.*, 1990; Rodriguez-Sosa *et al.*, 1994).

Após a descoberta de vários hormônios adipocinéticos (AKHs) estruturalmente relacionados em insetos, Panbo-RPCH foi agrupado à família AKH/RPCH (Gade *et al.*, 1997; Zralá, 2010). Seus membros têm uma estrutura primária característica: comprimento da cadeia de 8–10 aminoácidos; N-terminal bloqueado por piroglutamato (pGlu); C-terminal bloqueado por um carboxamido; aminoácidos aromáticos em posições 4 (geralmente Phe) e 8 (sempre Trp); um resíduo Gly sempre na posição 9; os peptídeos são em sua maioria desprovidos de cargas (Gade & Marco, 2009). A sequência primária do RPCH é pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp amida (Fernlund & Josefsson, 1968). Estudos de atividade/estrutura demonstram que apenas um dipeptídeo formado por um resíduo Trp adicionado ao resíduo de outro aminoácido pode desencadear a agregação pigmentar (Josefson, 1983).

O complexo órgão-X/glândula do seio nos pedúnculos ópticos de crustáceos, fonte de Panbo-RPCH, assim como as células neurosecretoras da glândula neuroendócrina *corpora cardíaca*, conectada com o cérebro do inseto, onde os AKHs são sintetizados, são de forma simplificada análogos ao sistema hipotálamo-hipófise de vertebrados (Scharrer & Scharrer, 1944). Embora o Panbo-RPCH tenha primariamente atividade cromatoforotrópica em crustáceos (Fernlund & Josefsson, 1972) e os AKHs tenham papel crucial no metabolismo energético em insetos, estes neuropeptídeos têm efeito neuromodulador em ambos os grupos de artrópodes (Zralá *et al.*, 2010).

O RPCH em alguns crustáceos (i.e. Dappu-RPCH, cladóceros) assemelha-se estruturalmente mais aos AKHs do que ao Panbo-RPCH (Christie *et al.*, 2008), e em isópodes e no lagostim *Procambarus clarkii* é envolvido em funções outras que a migração pigmentar (Rao & Riehm, 1988; Tuma *et al.*, 1993).

O Panbo-RPCH foi encontrado também em algumas espécies de insetos heterópteros (Zralá *et al.*, 2010) e aumenta os níveis de glucose e trealose na hemolinfa em *P. scaber*, quando experimentalmente administrado. Com base nesses dados, Socha e colaboradores (2004) sugerem que o papel dos membros da família AKH/RPCH é determinado por características dos receptores das espécies, e não pela estrutura e origem do hormônio.

O receptor do RPCH na membrana celular de cromatóforos nunca foi diretamente estudado e é de classe ainda desconhecida (Ribeiro & McNamara, 2009). A injeção de dopamina *in vivo* causa dispersão pigmentar em cromatóforos pretos e agregação em cromatóforos vermelhos no caranguejo *Gecarcinus lateralis*; ambos os efeitos são bloqueados por haloperidol, antagonista da dopamina (Martinez *et al.*, 1985). Os autores sugerem que haja um sistema mediado por receptor de dopamina no organismo do caranguejo.

Experimentos com toxina do cólera e toxina pertussis sugerem que receptores AKH são acoplados à proteína  $G_s$  (proteínas ligantes de GTP heterotriméricas estimulatórias). O GDP- $\beta$ -S inibe a ativação de fosforilases por AKH I, II e III, corroborando essa sugestão (Van der Horst *et al.*, 1999).

A proteína G heterotrimérica e seus cognatos receptores de membrana (GPCRs) constituem a maior família de proteínas sinalizadoras transmembrânicas (Ugur *et al.*, 2005). Apesar da diversidade estrutural, a fase inicial da sinalização iniciada pela maioria dos GPCRs é notavelmente uniforme: o receptor ativo cataliza a troca de GDP por GTP na proteína G, a partir do que  $G\alpha$ -GTP e  $G\beta\gamma$  separam-se, habilitando-se a ativar ou inibir vários efetadores, que variam de enzimas produtoras de segundos mensageiros solúveis a canais iônicos na membrana plasmática (Natochin *et al.*, 2001; Kobilka, 2007). Os GPCRs respondem a diversos estímulos externos (luz, odorantes) e do organismo (hormônios, neurotransmissores,  $Ca^{2+}$  extracelular, atividade enzimática) (Gurevich & Gurevich, 2007). A utilização de GDP- $\beta$ -S, um análogo não hidrolisável do GDP, competitivamente inibe a proteína G, a 2  $\mu$ M, em neurônios da medula espinhal de rato *in vitro* (Natochin *et al.*, 2001), e a 200 mM, em células HEK293 de *Drosophila* (Smart *et al.*, 2008). O peptídeo Antagonista da proteína G, a 20  $\mu$ M, inibe receptores colinérgicos muscarínicos isolados *in vitro* a partir de cérebro bovino (Mukai *et al.*, 1992).

#### **1.4. A dependência de íons para a indução da agregação pigmentar e receptores ionotrópicos**

Em camarões carídeos, o RPCH requer cálcio extracelular para induzir e sustentar a agregação pigmentar (Fingerman, 1969; Robison & Charlton, 1973; Lambert & Fingerman, 1979; McNamara & Taylor, 1987; Britto *et al.*, 1990; McNamara & Ribeiro, 1999). Em adição ao papel inequívoco do  $Ca^{2+}$  para que ocorra a agregação

pigmentar, outros mecanismos podem estar envolvidos na ação das cromatoforotropinas em crustáceos (Fingerman & Connel, 1968; Freeman *et al.*, 1968) e vertebrados (Kinosita, 1953; Lerner & Takahashi, 1956; Van de Verdonk, 1962; Novales, 1967). O hormônio estimulador de melanócitos é dependente de Na<sup>+</sup> em *Rana pipiens* (Novales, 1962) e de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> ou colina em *Squalus acanthias* (Novales & Novales, 1966). Milograna *et al.*, (2010) sugerem que a dependência de íons como Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> para a movimentação pigmentar em tão variados taxons pode derivar de pequenas e localizadas mudanças no potencial de membrana dessas células não-excitáveis. Estas mudança na potencial de membrana poderiam estar relacionadas à participação dos íons na transdução de sinal das cromatoforotropinas. Milograna *et al.*, (2010) evidenciam a possível participação de canais de K<sup>+</sup> durante a transdução de sinal do RPCH.

Receptores ionotrópicos de glutamato são proteínas integrais de membrana compostas por quatro grandes subunidades que formam um canal iônico central. As subunidades dos receptores de glutamato conhecidos, como AMPA kainato, NMDA, e  $\delta$ , possuem sequências bastante similares, sugerindo grande proximidade estrutural (Traynelis *et al.*, 2010).

O CNQX, a 10<sup>-3</sup> M, inibe a atividade de receptores de glutamato não-NMDA, em terminais sensoriais em *Procambarus clarkii* (Catter & Ray, 1998). A 200 mM, inibe neurônios estomatogátricos de lagosta em cultura (Cleland & Selverston, 1998; Feinstein *et al.*, 1998). O AMPA, a 50 nM, estimula receptores de glutamato não-NMDA em cultura de células do inseto *Spodoptera frugiperda* (Kawamamoto *et al.*, 1994).

### **1.5. Os segundos mensageiros da agregação pigmentar**

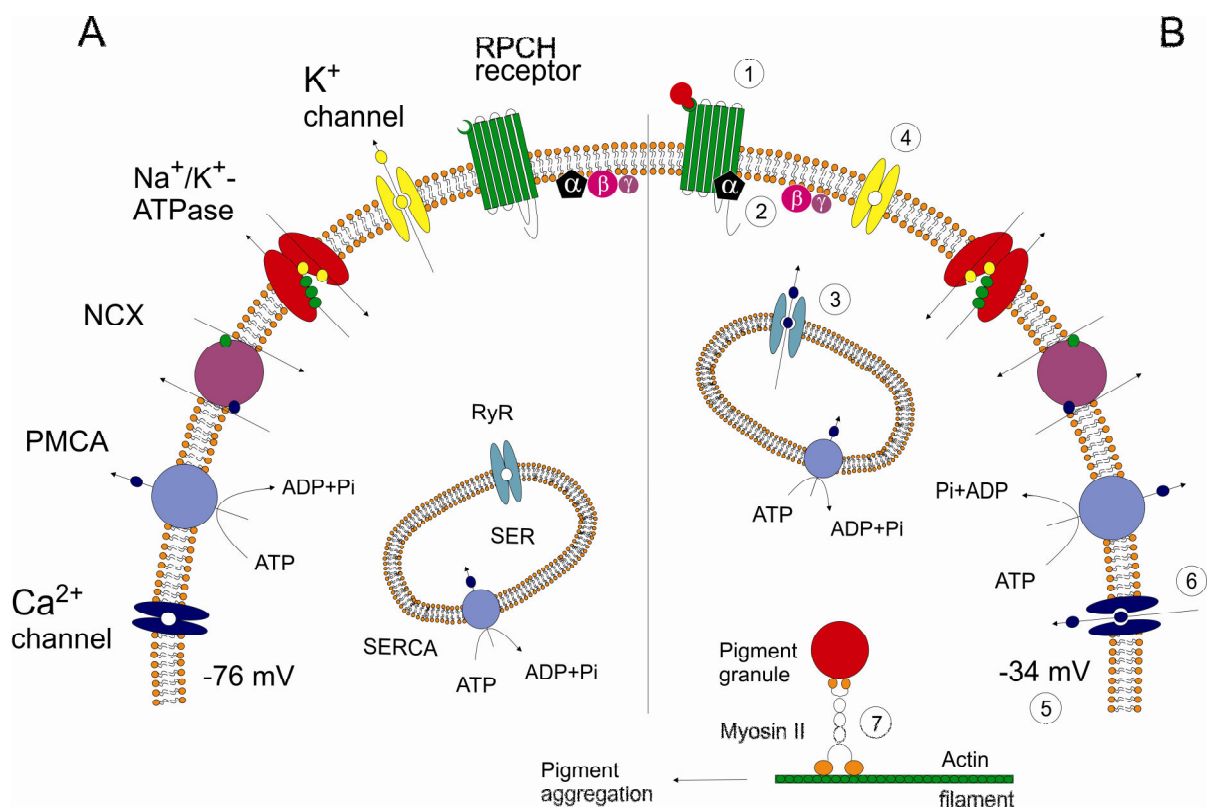
As cromatoforotropinas produzem a translocação pigmentar por induzirem uma série de eventos intracelulares que ainda não são bem conhecidos. Entretanto, a cinética da agregação pigmentar (McNamara & Ribeiro, 1999) e o papel dos segundos mensageiros  $\text{Ca}^{2+}$  e guanosina 3',5' monofosfato cíclico (GMPc) citoplasmático (Lambert & Fingerman, 1977, 1978; Nery *et al.*, 1997; McNamara & Ribeiro, 1999, 2000; Ribeiro & McNamara, 2007; 2009) no mesmo mecanismo estão bem estabelecidos.

Em cromatóforos ovarianos de *M. olfersi*, o acoplamento do RPCH a seu receptor causa a elevação da concentração intracelular de GMPc (Ribeiro & McNamara, 2009) e de  $\text{Ca}^{2+}$  (McNamara & Ribeiro, 2000; Ribeiro & McNamara, 2007; Milograna *et al.*, 2010). O  $\text{Ca}^{2+}$  provém duplamente de fontes intra e extracelulares, a partir de uma seqüência de eventos finamente regulada (Ribeiro & McNamara, 2007; Milograna *et al.*, 2010). Inicialmente ocorre liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do REL (Ribeiro & McNamara, 2007; Milograna *et al.*, 2010), seguida de indução da despolarização da membrana, pelo fechamento de canais de  $\text{K}^+$ , que gera influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular por canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem (Figura 2) (Milograna *et al.*, 2010).

O ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  e o db-cGMP induzem agregação pigmentar completa e reversível com cinética idêntica à do RPCH (McNamara & Ribeiro, 2000; Ribeiro & McNamara, 2009). A agregação pigmentar em cromatóforos de carídeos também parece estar associada com um decréscimo na concentração de cAMP (Fingerman, 1969; Nery *et al.*, 1997).

Entretanto, GMPc induz a dispersão pigmentar dose-dependente em cromatóforos pretos, brancos e vermelhos *in vitro* de caranguejos (*Uca pugilator*) (Ribeiro & McNamara, 2009). Além disso, a distribuição de grânulos pigmentares não-estimulados em cromatóforos pretos *in vitro* de caranguejos braquiúros é exatamente

oposta àquela correspondente em cromatóforos de camarões palemonídeos: em braquiúros, estes pigmentos naturalmente agregam (Lambert & Fingerman, 1976; Kulkarni & Fingerman, 1986), mas em palemonídeos dispersam (Fingerman *et al.*, 1975; Lambert & Fingerman, 1979; McNamara & Taylor, 1987; Tuma *et al.*, 1993). Assim, nestes dois taxons de crustáceos, os motores moleculares opostos que efetuam a translocação de grânulos pigmentares (Boyle & McNamara, 2006) estão aparentemente acopladas à mesma via de sinalização (Ribeiro & McNamara, 2009).



**Fig 2. Modelo esquemático proposto para a elevação da  $[Ca^{2+}]_i$  durante a transdução de sinal desencadeada pelo acoplamento do RPCH ao seu receptor na membrana plasmática e a agregação pigmentar resultante. (A) Estado de repouso, pigmento disperso, RPCH não acoplado ao receptor. (B) O receptor se liga a um hipotético receptor 7 passos na membrana, dando início à transdução de sinal (ativação de proteína G, liberação de  $Ca^{2+}$  do SER por canais de rianodina, fechamento dos canais de  $K^+$ , despolarização da membrana, influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular), que leva à agregação dos pigmentos, transportados pelo sistema miosina/actina (modificado de Milograna *et al.*, 2010).**

### **1.6. Cascatas de sinalização induzidas por Ca<sup>2+</sup>/GMPc**

Não está exatamente claro como o GMPc e o Ca<sup>2+</sup> ativam o mecanismo de agregação pigmentar. O Ca<sup>2+</sup> livre no citosol pode atuar sobre várias proteínas alvo como a proteína cinase C (PKC) e a proteína cinase dependente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (Ca<sup>2+</sup>/CaM) cuja ativação leva a diversas respostas celulares (Michel *et al.*, 2007; Kheifets & Mochly-Rosen, 2007). A agregação pigmentar induzida por PCH em eritróforos de *M. potiuna* é dependente do complexo Ca<sup>2+</sup>/CaM (Nery *et al.*, 1997). O envolvimento da PKC na translocação pigmentar e também da Ca<sup>2+</sup>/CaM na agregação do pigmento vermelho em cromatóforos ovarianos de *M. olfersi* foi mostrado por Bell (2004). A PKA ativada leva à dispersão pigmentar (Bell *et al.*, 2005) como também o faz o AMPc exógeno (Nery & Castrucci, 1998). O aumento da concentração intracelular de AMPc pela ativação da adenilato ciclase, induzida pela toxina do cólera, inibe parcialmente e reduz a velocidade da agregação pigmentar, efeito possivelmente relacionado à ativação da PKA (Bell, 2008).

A Ca<sup>2+</sup>/calmodulina regula ou induz a atividade enzimática da óxido nítrico sintase (NOS), uma heme-proteína da “família dos citocromos”. Estas geram óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina, em uma reação que requer oxigênio, NADPH, flavinas e biopterinas (Moncada *et al.*, 1991; Murad, 1994).

São conhecidas três isoformas de NOS, duas constitutivas, a endotelial e a neuronal, e uma induzível (Bredt & Snyder, 1990; Lyons *et al.*, 1992; Nishida *et al.*, 1992). O NO induz a dispersão pigmentar em melanóforos de teleósteos Hayashi and Fujii (2001) e pode ter um papel na agregação pigmentar em melanóforos de *Xenopus laevis* Nilsson *et al.* (2000). O NO parece afetar proteínas citoesqueléticas, reduzindo o conteúdo intracelular de filamentos de actina F em granulócitos e prolongando a agregação homotípica (Forslund *et al.*, 2000). A NOS em melanóforos de *Xenopus laevis*

pode ser inibida por incubação com 1 mM de L-NAME (Nilsson *et al.*, 2000). O L-NAME, a 100  $\mu$ M, inibe a NOS em coração de lagosta (Casares *et al.*, 2006).

O GMPc envolvido na cascata de sinalização do RPCH é aparentemente produzido por guanilato ciclase citosólica (GC-S), ativada por NO (Ribeiro & McNamara, 2009). A cascata do GMPc é  $Ca^{2+}$  dependente, possivelmente no nível de ativação da guanilato ciclase (Ribeiro & McNamara, 2009). Parece haver no mínimo um ponto de *cross-talk* regulatório entre as cascatas de ambos os segundos mensageiros nestas células, e o  $Ca^{2+}$  citosólico deve modular diversos passos do final desta cascata (Ribeiro & McNamara, 2009).

O GMPc pode regular proteína cinase G (PKG), canais iônicos e fosfodiesterases (Wong & Garbers, 1992; Lincoln & Cornwell, 1993; Schmidt *et al.*, 1993). Em crustáceos, componentes da via NO/cGMP têm sido identificados em diversos sistemas que envolvem a percepção sensorial como redes neurais que controlam a olfação (Johansson *et al.*, 1996; Scholz *et al.*, 1998; Johansson & Mellon, 1998), a visão (Lee *et al.*, 2000), comportamentos motores rítmicos (Scholz *et al.*, 1996, 2001), comportamento de escape (Aonuma *et al.*, 2000) e neurosecreção (Lee *et al.*, 2000).

Assim, hipotetiza-se que uma das vias de sinalização induzidas pelo  $Ca^{2+}$  em resposta ao RPCH seja: o  $Ca^{2+}$  ocupa seus sítios de ligação com a calmodulina (CaM), formando o complexo  $Ca^{2+}$ /CaM, que ativa a cinase da calmodulina (CaMK); a CaMK estimula a NOS a sintetizar NO, que ativa a GC-S; esta produz e libera GMPc no citosol, levando à ativação da PKG. Esta via ocorre na regulação do ritmo circadiano em mamíferos em resposta à luz (Golombeck *et al.*, 2004).

O estado de distribuição pigmentar resultante em um dado momento pode refletir o grau de ativação de reguladores específicos do final da cascata de sinalização como proteínas cinases G, C, e A e a cinase dependente de  $Ca^{2+}$ /CaM, a fosforilação dos



motores moleculares como miosina e cinesina (Boyle & McNamara, 2006, 2008) e seus reguladores específicos dependentes de cinase (Ribeiro & McNamara, 2009).

Rp-sGMPc-trietilamina é um inibidor específico da ativação por GMPc da PKG, permeável à membrana plasmática (Sanches *et al.*, 2003; Leffler *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2005), utilizado à concentração de 5  $\mu$ M para inibir a PKG em miócitos de rato (Su *et al.*, 2008).

### **1.7. O citoesqueleto e os motores moleculares**

Os componentes dinâmicos do citoesqueleto são os microtúbulos e os microfilamentos de actina. A tubulina está presente em células em um “pool” citoplasmático de dímeros de  $\alpha/\beta$  tubulina (Inoue & Salmon, 1995). Estudos de ultraestrutura mostram que cromatóforos ovarianos de *M. olfersi* contêm tanto microtúbulos quanto microfilamentos (Ribeiro & McNamara, 2001).

As três classes de motores moleculares – cinesinas, dineínas e miosinas – estão envolvidas em uma variedade de movimentos biológicos como mitose, transporte axoplásmico e secreção. Estruturalmente, os motores consistem de duas partes funcionais: um domínio motor que se acopla reversivelmente ao citoesqueleto e converte energia química em movimento; e a cauda, que interage com o cargo, diretamente ou por cadeias leves acessórias (Karcher *et al.*, 2002).

Cinesinas são motores moleculares envolvidos no transporte de organelas, proteínas complexa e mRNA, no movimento de cromossomos e fuso mitótico durante a mitose e a meiose, dependente de ATP e de microtúbulos (Hirokawa 1998; Vale, 2003). Consistem de duas cadeias pesadas (KHCs) e um terminal formado por duas cadeias leves. As KHCs possuem um domínio motor, que se liga a microtúbulos, um domínio em  $\alpha$ -hélice envolvido na dimerização e um domínio cauda C-terminal. A cinesina

convencional (I) é altamente expressa em melanócitos de mamíferos, e participa do transporte de melanossomos (Hara *et al.*, 2000; Vancoillie *et al.*, 2000). Em melanóforos de *Xenopus laevis*, a dispersão requer a cinesina II (Rogers & Gelfand, 1998; Gross *et al.*, 2002).

O movimento retrógrado em direção ao pólo negativo é realizado pela dineína, que se associa ao cargo por um complexo formado por multisubunidades chamada dinactina, a qual pode exercer diversas atividades regulatórias. (Hirokawa 1998; Vale, 2003; Karki & Holzbaur, 1999; Barral & Seabra, 2004). A dineína citoplasmática participa no movimento de melanossomos em humanos e anfíbios (Byers *et al.*, 2000; Vancoillie *et al.*, 2000). A ATPase associada a microtúbulo é um membro da superfamília de proteínas da dineína e é composta de duas cadeias pesadas e múltiplas cadeias intermediárias, cadeias leves intermediárias e cadeias leves (Vale, 2003). O número e a diversidade de subunidades sugerem a existência de múltiplas aloformas funcionalmente diversas da dineína (Reilein *et al.*, 2003; Barral & Seabra, 2004).

As miosinas constituem uma grande superfamília de pelo menos 20 classes de proteínas motoras dependentes de actina (Thompson & Langford, 2002; Richards & Cavalier-Smith, 2005). A participação da miosina-actina no transporte granular foi demonstrada em melanóforos de ratos (Wu *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998), peixes (Rodionov *et al.*, 1998; Rodionov *et al.*, 2003), e anfíbios (Rogers & Gelfand, 1998; Rogers *et al.*, 1999), e no qual também participam a cinesina e dineína (Tuma & Gelfand, 1999). Muitas classes de miosina como I, V, VI, VII e X participam no transporte intracelular de diversas organelas membranosas durante a endocitose, a exocitose e a fagocitose (Krendel & Mooseker, 2005).

A miosina II não-muscular é uma proteína hexamérica composta por duas cadeias pesadas diméricas (NMHCs), um par de cadeias leves regulatórias (MLCs) e um

par de cadeias leves essenciais (Conti & Adelstein, 2008). Esta miosina só recentemente foi reconhecida como motor do transporte de vesículas, além das funções na clivagem, formação de fuso, atividade contrátil de lamelipódio, forças tracionadoras na migração e motilidade celular (Svitkina *et al.*, 1997; Saitoh *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2004). Além disso, uma miosina II não-muscular recentemente identificada em células epiteliais pigmentares tem sido encontrada em colocalização com vesículas intracelulares e pode ter função de transporte (Linz-McGillem & Alliegro, 2003).

O conhecimento acerca do mecanismo de translocação pigmentar em cromatóforos de invertebrados é escasso (McNamara & Ribeiro, 1999). McNamara & Ribeiro (1999) sugerem que a fase lenta da agregação pigmentar pode resultar de uma interação actina-miosina; sugerem ainda que a miosina sustenta o estado de agregação, regulada por proteínas  $Ca^{2+}$ -dependentes. A inibição da miosina em cromatóforos ovarianos vermelhos de *M. olfersi* com pigmentos dispersos causa hiper-dispersão pigmentar, sugerindo que a miosina permanece ativa no estado disperso (Boyle & McNamara, 2006). Segundo Boyle & McNamara (2006), o motor molecular agregador de pigmento poderia ser a miosina II ou a miosina XII, e o dispersor, a cinesina.

A beblastatina é um inibidor específico da atividade ATPásica da miosina II não-muscular, permeável à membrana plasmática, utilizado em ouriços-do-mar (Stack *et al.*, 2006), ratos (Matson *et al.*, 2006), fibroblastos amebóides (Isawaki & Wang, 2008), endocitose de células dendríticas (Holt *et al.*, 2007) e migração de células endoteliais (Kolega, 2006); sem nenhuma reatividade apreciável com outros membros da superfamília da miosina (Dou *et al.*, 2007; Farman *et al.*, 2008).

### **1.8. Proteínas cinases e fosfatases reguladoras da miosina**

A cadeia leve da miosina (MLC) é uma subunidade que regula a atividade contrátil em células não-musculares. A fosforilação da serina 19 (Ser 19) da MLC é requerida para a formação do complexo actina-miosina, dando início à atividade ATPásica que muda a conformação das cabeças dos dímeros de miosina e leva ao deslizamento da molécula de miosina ao longo do filamento de actina (Fajmut & Brumen, 2007). A MLC pode ser fosforilada no resíduo Ser 19 pela cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) ou pela cinase da proteína Rho (ROCK) (Kamm & Stull, 2001; Amano *et al.*, 1996). Ambas as cinases têm funções complementares na regulação da adesão em leucócitos (Smith *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002; Chilcoat *et al.*, 2008).

A defosforilação da MLC é realizada pela fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), levando ao desacoplamento das cabeças de miosina dos filamentos de actina, ou apenas mantendo os sítios ligantes das pontes cruzadas defosforilados (Rembold & Murphy, 1990). A ROCK aumenta a fosforilação da MLC por fosforilação do resíduo Ser 19 (Amano *et al.*, 1996) e por inibir a atividade da MLCP (Feng *et al.*, 1999; Chilcoat *et al.*, 2008).

Os processos relacionados à ativação/inativação da MLCK parecem depender da decodificação de sinal induzido por  $Ca^{2+}$  e pela PKA neste nível da cascata de sinalização (Howe, 2004; Mbikou *et al.*, 2006), assim como a MLCP pode ser regulada pela PKG (Bonnevier & Arner, 2004).

A cantaridina inibe a MLCP na musculatura lisa dos vasos deferentes de porco da Guiné (Khattab *et al.*, 2007). O ML-7 é um inibidor orgânico e permeável à membrana plasmática da MLCK frequentemente utilizados em diversos estudos funcionais (Saitoh *et al.*, 1987).

A ROCK foi o primeiro efetador de Rho GTPases descoberto, que são reguladoras pivô de muitos aspectos do comportamento celular, como motilidade celular, proliferação e apoptose e têm um papel central em muitas respostas motoras que envolvem o citoesqueleto de actina e a rede de microtúbulos (Riento & Ridley, 2003).

O estudo farmacológico de diversos inibidores estabelece que o Y-27632 e o H-1152 inibem especificamente a ROCK a  $IC_{50}$  de 0,012  $\mu$ M e 0,162  $\mu$ M, e inibem outras proteínas cinases a partir das concentrações de 6  $\mu$ M e >200  $\mu$ M, respectivamente. O H-1152 é o mais específico entre todos os inibidores de ROCK (Tamura *et al.*, 2005).

Neste trabalho, baseado nos estudos da cascata de sinalização que induz a agregação pigmentar, evidências em melanóforos de outros grupos (Nery & Castrucci, 1997; Provencio *et al.*, 1998; Hermans, 2003) e homologia estrutural com o AKH, investigamos se o receptor do RPCH é do tipo sete passos transmembrânico associado à proteína G. Devido à dependência iônica para que ocorra a translocação pigmentar e a evidências de participação de canais de  $Ca^{2+}$  e  $K^+$  da membrana plasmática na transdução de sinal do RPCH (Milograna *et al.*, 2010), avaliamos também a participação de receptores ionotrópicos não-NMDA.

Intentamos elucidar um pouco mais sobre os diversos eventos no citoplasma de cromatóforos que promovem a movimentação pigmentar. Questões macroevolutivas, ecológicas e comportamentais fogem ao escopo deste estudo. O entendimento destes mecanismos celulares, quando inseridos em um contexto amplo e de longo prazo, é fundamental para a compreensão da evolução dos cromatóforos e dos mecanismos de mudança de cor em animais, aspectos relevantes à evolução dos crustáceos.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Identificar o tipo de receptor do RPCH e proteínas intracelulares regulatórias da translocação pigmentar, como enzimas, cinases, fosfatases e motores moleculares ativadas/desativadas durante as cascatas de sinalização do  $Ca^{2+}$  e do GMPC.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Investigar o tipo de receptor do RPCH, inibindo o receptor de membrana do tipo sete passos transmembrânico associado à proteína G com GDP- $\beta$ -S e Antagonista da proteína G; inibindo com CNQX e estimulando com AMPA o receptores de glutamato não-NMDA;

2. Avaliar se a óxido nítrico sintase (NOS) é ativada consequentemente à ação do RPCH, por inibição com L-NAME;

3. Investigar o papel da proteína cinase G (PKG) na agregação pigmentar, inibindo-a com Rp-sGMPC-trietilamina;

4. Avaliar o papel da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) na fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC) durante a translocação pigmentar, inibindo-a com ML-7;

5. Avaliar o papel da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) na defosforilação da MLC durante a translocação pigmentar, pela inibição com cantaridina;

6. Investigar o papel da cinase da proteína Rho na fosforilação da MLC durante a translocação pigmentar, pela inibição com Y-27632 e com H-1152;

7. Investigar se a miosina II não-muscular é um motor molecular da agregação, inibindo sua atividade com blebistatina;

8. Localizar e estudar a disposição dos microfilamentos de actina, dos microtúbulos, das miosinas em geral, da miosina II não-muscular, da cinesina e da dineína, por imunohistoquímica e microscopia de fluorescência.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Coleta e manutenção dos camarões**

Com o apoio logístico do Centro de Biologia Marinha da USP em São Sebastião-SP, a cada dois meses foram coletadas aproximadamente 30 fêmeas do camarão *Macrobrachium olfersi*, com comprimento rostro-télson próximo a 5 cm. Devidamente licenciadas pelo IBAMA (Autorização 18559-1), as coletas foram realizadas na vegetação marginal do rio Paúba (23°47.842'S; 45°32.574'O) com o auxílio de uma peneira de aço de malha de 3 mm. Os camarões foram acondicionados em galões de 30 litros contendo água doce aerada e capim, retirados de seu ambiente natural.

Depois de transportados ao Laboratório de Fisiologia de Crustáceos do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-SP, USP, foram mantidos em tanques contendo 60 litros de água continuamente aerada, trazida do local de coleta, e refúgios na forma de tijolos furados, sendo alimentados em dias alternados com legumes e verduras, e/ou carnes cruas.

#### **3.2. Preparação do ovário contendo os cromatossomos**

Antes de cada experimento, alguns camarões foram mantidos por no mínimo 2 h em um recipiente de plástico preto, para induzir a dispersão dos pigmentos vermelhos nos cromatossomos ovarianos. Um camarão, preferencialmente ao estágio C (entremudas) do ciclo de muda (Peebles, 1977), foi escolhido pela dimensão de seu ovário, e pelo número e estado de distribuição pigmentar dos cromatossomos em sua superfície. As disseções foram feitas sob estereomicroscópio, em uma salina fisiológica específica para *M. olfersi* (ver 3.3), com o auxílio de tesoura de iridectomia e pinça de relojoeiro fina. Os camarões foram transeccionados entre o cefalotórax e o abdômen, e as metades



anteriores dos ovários, seccionadas transversalmente, foram transferidas para uma câmara de perfusão contendo a mesma salina.

### **3.3. Solução fisiológica utilizada na perfusão**

Para manter o volume celular dos cromatóforos, a **salina fisiológica padrão (SFP)** utilizada foi preparada com uma osmolalidade de aproximadamente 360 mOsm/kg H<sub>2</sub>O medida em microsmômetro a pressão de vapor (Wescor modelo 5500), com base na osmolalidade da hemolinfa de *M. olfersi* (cerca de  $364 \pm 1,9$  mOsm/kg H<sub>2</sub>O; McNamara & Ribeiro, 1999).

Para a preparação da SFP, utilizaram-se os principais cátions da hemolinfa na forma de cloretos, com concentrações iônicas baseadas em Prosser (1973), McNamara *et al.* (1990) e Ribeiro & McNamara (2007): em mM, Na<sup>+</sup> 180, K<sup>+</sup> 5, Ca<sup>2+</sup> 5,5 e Mg<sup>2+</sup> 1. A salina foi tamponada com bicarbonato de sódio (2,5 mM) e HEPES (5 mM), e o pH ajustado para 7,4, adicionando-se ainda glicose a 2 mM como substrato exógeno, uma vez que os experimentos foram realizados *in vitro*.

Foi utilizada também uma **salina fisiológica sem cálcio (SSC)** contendo 2 mM EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético; Sigma, St Louis, MO, USA) em substituição ao Ca<sup>2+</sup>, sendo este presente apenas em concentração residual aproximada de  $9 \times 10^{-11}$  M.

### **3.4. O sistema de perfusão e a quantificação da translocação pigmentar**

Os ovários foram fixados com microagulhas de prata em uma câmara de perfusão composta de um bloco acrílico com uma pequena cavidade cilíndrica central, de 154 µl de volume, 7 mm de diâmetro por 7 mm de profundidade, com o fundo recoberto por uma camada de resina Sylgard.

O sistema de perfusão utilizado foi composto por esta câmara, que recebeu duas agulhas #30-20 diametralmente opostas, ligadas por cânulas de polietileno a uma válvula multidirecional e a duas seringas de vidro, onde foram aplicadas as soluções perfusoras.

A câmara foi fechada com uma lamínula vedada com graxa de silicone, e perfundida com um fluxo de aproximadamente 0,7 ml de salina/min determinado pela gravidade e pela pressão da coluna líquida nas seringas (20 cm). O deslocamento dos grânulos de pigmento foi observado a cada 2 minutos em um estéreo-microscópio Wild M10 acoplado a uma câmara de vídeo SONY DXC 151A CCD, por luz transmitida e incidente, a um aumento de 200 vezes, utilizando-se uma escala ocular calibrada (3,52  $\mu\text{m}$ /intervalo).

Foi utilizado apenas um cromatossomo com diâmetro entre 170 e 250  $\mu\text{m}$  por preparação.

### **3.5. Experimentos Fisiológicos**

Para induzir a agregação pigmentar, utilizou-se o hormônio agregador de pigmento vermelho (RPCH) a 5 nM (Peninsula Laboratories, CA, USA). Previamente a cada série experimental, preparou-se uma solução estoque de RPCH; GDP- $\beta$ -S (guanosina 5'-0-(2-tiodifosfato) sal trilitio); Antagonista da proteína G (pGlu-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-D-Trp-Met-NH<sub>2</sub>), CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3 diona); AMPA [( $\pm$ )- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-ácido propiônico hidrato]; L-NAME (N $\omega$ -Nitro-L-arginina metil ester hidrocloreto); Rp-sGMPc-trietilamina; Cantaridina (3',7'-dimetilhexahidro-4,7-epoxiisobenzofurano-1,3-diona); ML-7 [1-(5-iodonaftaleno-1-sulfonil)homopiperazina HCl]; H-1152P [-(S)-(+)-Metil-1-[(4-metil-5-isoquinolinil)sulfonil] homopiperazine.2HCl]; Y-27632 dicloreto monohidratado e Blebistatina (1-fenil-1,2,3,4-tetrahydro-4-hidroxipirolo[2.3-b]-7-metilquinolin-4-ona),

diluídos em água destilada ou DMSO (Tabela 1). Antes da perfusão, alíquotas destas soluções estoque foram dissolvidas em 20 ml de salina fisiológica padrão (SFP).

**Tabela 1. Concentração final, diluente, efeito principal e origem dos reagentes utilizados nos protocolos experimentais.**

Reagente	Concentração final (M)	Diluente	Efeito Principal	Origem
RPCH	$5 \times 10^{-9}$	Água destilada	Agregador do pigmento vermelho	Península Lab., USA
GDP- $\beta$ -S	$10^{-5}$	Água destilada	Inibidor de receptor associado à proteína G	Sigma-Aldrich, USA
Antagonista da proteína G	$5 \times 10^{-6}$	DMSO	Inibidor da ativação de $G_{\alpha 1}$ ou $G_{\alpha 0}$ em receptor muscarínico colinérgico	Sigma-Aldrich, USA
CNQX	$5 \times 10^{-5}$	DMSO	Antagonista de receptor de glutamato não-NMDA	Sigma-Aldrich, USA
AMPA	$3 \times 10^{-5}$	DMSO	Agonista de receptor de glutamato não-NMDA	Sigma-Aldrich, USA
L-NAME	$5 \times 10^{-3}$	Água destilada	Inibidor da NOS	Sigma-Aldrich, USA
Rp-sGMPc-trietilamina	$3 \times 10^{-6}$	Água destilada	Inibidor específico de PKG	Sigma-Aldrich, USA
Cantaridina	$10^{-5}$	DMSO	Inibidor da MLCP	Sigma-Aldrich, USA
ML-7	$10^{-5}$	DMSO	Inibidor da MLCK	Sigma-Aldrich, USA
H-1152	$5 \times 10^{-8}$	Água destilada	Inibidor altamente específico da ROCK	Alexis Biochemical, USA
Y-27632	$3 \times 10^{-6}$	Água destilada	Inibidor específico da ROCK	Sigma-Aldrich, USA
Blebistatina	$10^{-5}$	DMSO	Inibidor específico da miosina II não-muscular	Sigma-Aldrich, USA

### 3.5.1. Experimento controle a 5 nM- caracterização da preparação

Os experimentos RPCH-controle consistiram da perfusão dos cromatóforos na seqüência: (i) SFP, 10 min, para estabilizar a preparação; (ii) SFP + RPCH, 30 min; (iii) SFP, 30 min para averiguar a reversibilidade da agregação pigmentar. (N=12).

### **3.5.2. GDP- $\beta$ -S a $10^{-5}$ M - inibição de GPCR**

Este composto é altamente instável e por isto foram preparados e imediatamente congelados em metanol e gelo seco, sendo armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Seguiu-se o protocolo: (i) SFP, 10 min; (ii) SFP + GDP- $\beta$ -S, 20 min; (iii) SFP + GDP- $\beta$ -S + RPCH, 30 min; (iv) SFP + GDP- $\beta$ -S, 30 min. (N=7).

### **3.5.3. Antagonista da proteína G (AntPG) a $5 \times 10^{-6}$ M - inibição de GPCR**

Seguiu-se o protocolo: (i) SFP + DMSO (0,5%), 10 min; (ii) SFP + AntPG, 30 min; (iii) SFP + AntPG + RPCH, 30 min; (iv) SFP + AntPG, 30 min. (N=7).

### **3.5.4. CNQX a $5 \times 10^{-5}$ M - inibição de receptor de glutamato não-NMDA**

O seguinte protocolo experimental e a preparação prévia da solução com o CNQX foram realizados no escuro devido à fotossensibilidade do reagente: (i) SFP + DMSO (0,5%), 10 min; (ii) SFP + CNQX, 30 min; (iii) SFP + CNQX + RPCH, 30 min; (iv) SFP + CNQX, 30 min. (N=7).

### **3.5.5. AMPA a $3 \times 10^{-5}$ M - ativação de receptor de glutamato não-NMDA**

Seguiu-se o protocolo: (i) SFP + DMSO (0,5%), 10 min; (ii) SFP + AMPA, 30 min; (iii) SFP + AMPA + RPCH, 30 min; (iv) SFP + AMPA, 30 min. (N=8).

### **3.5.6. L-NAME a $5 \times 10^{-3}$ M - inibição da NOS**

Seguiu-se o protocolo: (i) SFP, 10 min; (ii) SFP + L-NAME, 30 min; (iii) SFP + L-NAME + RPCH, 30 min; (iv) SFP + L-NAME, 30 min. (N=7).

### **3.5.7. Rp-sGMPc-trietilamina (sGMPc) a 3 $\mu$ M - inibição específica da PKG**

A preparação da solução com o rp-sGMPc-trietilamina e os experimentos foram realizados no escuro devido à fotossensibilidade deste composto: (i) SFP, 10 min; (ii) SFP + sGMPc, 30 min; (iii) SFP + sGMPc + RPCH, 30 min; (iv) SFP + sGMPc, 30 min. (N=10).

### **3.5.8. Cantaridina a 10 $\mu$ M - inibição da MLCP**

Devido à fotossensibilidade da cantaridina, a preparação da solução e o seguinte protocolo experimental foram realizados no escuro: (i) SFP + DMSO (0,5%), 10 min; (ii) SFP + cantaridina, 30 min; (iii) SFP + cantaridina + RPCH, 30 min; (iv) SFP + cantaridina, 30 min. (N=7).

### **3.5.9. ML-7 a 10 $\mu$ M – inibição da MLCK**

Realizou-se a perfusão de: (i) SFP + DMSO (0,5%), 10 min; (ii) SFP + ML-7 (30 min); (iii) SFP + ML-7 + RPCH 30 min; (iv) SFP + ML-7 (30 min). (N=9).

### **3.5.10. H-1152 a 5 x 10<sup>-8</sup> - Inibição altamente específico da ROCK**

Devido à fotossensibilidade do H-1152, a preparação da solução e o seguinte protocolo experimental foram realizados no escuro: (i) SFP, 10 min; (ii) SFP + H-1152, 30 min; (iii) SFP + H-1152 + RPCH, 30 min; (iv) SFP + H-1152, 30 min. (N=7).

### **3.5.11. Y-27632 a 3 x 10<sup>-6</sup> – inibição da ROCK**

Seguiu-se o protocolo: (i) SFP, 10 min; (ii) SFP + Y-27632, 30 min; (iii) SFP + Y-27632 + RPCH, 30 min; (iv) SFP + Y-27632, 30 min. (N=8).

### 3.5.12. Blebistatina a 10 $\mu\text{M}$ – inibição específica da miosina II não-muscular

Seguiu-se o protocolo: (i) SFP + DMSO (0,5%), 10 min; (ii) SFP + blebistatina, 20 min; (iii) SFP + blebistatina + RPCH, 30 min; (iv) SFP + blebistatina, 30 min, (v) SSC + blebistatina, 30 min. (N=9).

### 3.6. Análise quantitativa dos experimentos fisiológicos

Os diâmetros dos cromatossomos foram medidos da ponta de uma extensão celular à ponta de outra diametralmente oposta, utilizando-se uma escala ocular calibrada (1 intervalo = 3,52  $\mu\text{m}$ ). Essas medidas foram convertidas em micrômetros e transformadas em porcentagem de dispersão (%) e em velocidade de translocação pigmentar (em  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) em função do tempo, a partir das fórmulas:

$$1. \text{ Grau de dispersão pigmentar (\%)} = \frac{\text{diâmetro medido} - \text{diâmetro mínimo} \times 100}{\text{diâmetro máximo} - \text{diâmetro mínimo}}$$

$$2. \text{ Velocidade de translocação pigmentar (\mu m/min)} = \frac{\text{diâmetro medido}_{(t+1)} - \text{diâmetro medido}_{(t)}}{2 \text{ min (intervalo de observação)} \times 2 \text{ (correção por movimento bidirecional)}}$$

onde 't' é igual a um momento específico da perfusão e 't+1' é a próxima medida após 't' (2 min). Os valores do grau de dispersão e da velocidade de translocação foram obtidos a partir da mesma série de dados em cada experimento.

Após tabulação, os valores das médias (X) e erros padrão da média (EPM), referentes ao grau de dispersão pigmentar e às velocidades de translocação para o conjunto de replicatas, a cada intervalo de medida, foram obtidos utilizando-se a planilha do aplicativo estatístico Statgraphics para Windows 5.0 Plus. Estes valores foram

plotados graficamente em função do tempo, utilizando-se o aplicativo Slide Write 5.01 Plus para Windows.

### **3.7. Análises estatísticas**

Para se avaliar os efeitos dos inibidores testados sobre a velocidade de translocação, foram empregadas análises estatísticas paramétricas. Utilizou-se uma Análise de Variância de um único fator (o tratamento = controle, tratados com GDP- $\beta$ -S, AntPG, CNQX, AMPA, L-NAME, Rp-sGMPc-trietilamina, Cantaridina, ML-7, H-1152, Y-27632 e Blebistatina), seguida do teste Student-Newman-Keuls (SNK) para identificar as médias diferentes. Efeitos e diferenças foram considerados significativos em nível de  $P=0,05$ . Para tal utilizou-se o aplicativo para Windows SigmaStat 2.03 (SPSS Inc., Chicago, IL). Os valores em porcentagem de dispersão pigmentar resultantes dos efeitos do RPCH e/ou reagentes, e também de sua lavagem do perfusato não foram comparados estatisticamente, mas são apresentados descritivamente. Os dados constam como média  $\pm$  EPM (N).

### **3.8. Preparação imunocitoquímica para microscopia de fluorescência**

#### **3.8.1 Dissecção, fixação e permeabilização dos ovários**

Ovários em qualquer estágio do ciclo de mudas foram dissecados em SFP como descrito na seção 3.2, porém não foram seccionados transversalmente. Os ovários inteiros foram transferidos a uma Solução bifosfato de sódio (PBS) contendo paraformaldeído (PF; Sigma-Aldrich, USA) a 4% e Triton-X (Sigma-Aldrich, USA) a 0,3%, por 15 minutos, à temperatura ambiente. A solução de PBS é composta por: em

mM, 100 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 100 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, com pH 7,4. A fixação/permeabilização foi testada em SFP, mas observou-se melhor preservação e fixação das estruturas em PBS.

O paraformaldeído é um fixador de tecidos, que os enrijece sem danificar a composição intracelular. A fixação é essencial para a posterior separação entre a cápsula ovariana e o ovário, e para a retificação do tecido na montagem da lâmina. O Triton-X é um permeabilizador, que abre poros na membrana plasmática permitindo a penetração das moléculas de anticorpos e a marcação de seus antígenos.

### **5.8.2. Bloqueio dos sítios inespecíficos**

Os ovários foram transferidos a uma solução de PBS e glicina a 100 mM, para lavagem e remoção do paraformaldeído. A glicina tem a função de neutralizar as moléculas de paraformaldeído impregnadas nos tecidos, viabilizando a interação de outros compostos. Os ovários foram lavados por 3 vezes, cada uma por 5 minutos, à temperatura ambiente e incubados por 1 hora, à temperatura ambiente com PBS-bloqueio contendo 0,1% Triton-X, 2% Soro de albumina bovino (BSA), 5% Soro de Cabra (Sigma-Aldrich, USA). Os bloqueadores foram centrifugados a 12.000 rpm por 1 minuto previamente à preparação da solução. Este bloqueio tem função de ocupar os sítios moleculares, reduzindo sua afinidade pelas moléculas de anticorpos, e restringindo a ligação destes apenas a seus epítopos específicos, pelos quais têm elevada afinidade.

### **5.8.3 Marcação com anticorpos primários**

Os ovários foram transferidos a microtubos tipo *Eppendorf* contendo PBS-bloqueio à qual foram adicionados os anticorpos primários (Tabela 2) previamente centrifugados a 12.000 rpm por 1 min. Os microtubos foram armazenados por 48 horas a



4°C. Os anticorpos primários reconhecem e associam-se a seus epítopos específicos nas proteínas de interesse.

**Tabela 2. Concentração final, efeito principal, produção e origem dos anticorpos primários utilizados nos protocolos experimentais.**

Anticorpo	Concentração final (M)	Produzido Em	Origem
Anti- $\beta$ -tubulina monoclonal	1:100	Camundongo	Sigma-Aldrich, USA
Anti-miosina esquelética e muscular lisa policlonal	1:50	Coelho	Sigma-Aldrich, USA
*Anti-miosina II não-muscular policlonal	1:100	Pintainho	Cedido por Prof. Dr. Roy Larson
Anti-cinesina monoclonal (Clone IBII)	1:100	Fluido ascítico de rato	Sigma-Aldrich, USA
Anti-dineína monoclonal (cadeia pesada)	1:100	Rato	Sigma-Aldrich, USA

\* Os anticorpos policlonais anti-miosina II não-muscular usados foram produzidos e purificados por afinidade contra a fração S4 de cérebro de pintainhos, sem apresentar reação cruzada com a miosina V; por Hellen Cristina Ferreira Ishikawa.

#### 5.8.4. Marcação com anticorpos secundários conjugados a fluoróforos

Os ovários foram lavados em PBS para a remoção de compostos em excesso, por 3 vezes, cada uma por 5 minutos, à temperatura ambiente.

Após a lavagem, foram incubados com solução de PBS e anticorpos secundários conjugados a fluoróforos Alexa-488 (Tabela 3) por 3 horas à temperatura ambiente. O Alexa-488 tem máxima absorção em 495 nm e máxima emissão em 519 nm (verde). Os anticorpos secundários reconhecem e ligam-se aos anticorpos primários, e os fluoróforos tornam-se visíveis no Microscópio de Fluorescência quando excitados pela luz fluorescente, evidenciando nos cromatóforos as proteínas marcadas pelos anticorpos. Nesta etapa e em todas as subseqüentes, a preparação foi coberta com papel alumínio ou mantida em recipiente escuro, para evitar que a luz excitasse os fluoróforos e reduzisse sua intensidade na visualização ao microscópio.

**Tabela 3. Concentração final, produção, origem e anticorpos primários reconhecidos pelos anticorpos secundários (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Roy Larson) utilizados nos protocolos experimentais.**

Anticorpo/ fluoróforo	Concentra- ção final (M)	Especificação*	Origem	Anticorpo primário
GAR Alexa - 488	1:400	<sup>1</sup> Cabra anti-coelho IgG (H+L)	Invitrogen, USA	Anti-miosina esque- lética e muscular lisa Anti-miosina II não-muscular
GAM Alexa - 488	1:400	<sup>2</sup> Cabra anti- camundongo IgG (H+L)	Invitrogen, USA	Anti- $\beta$ -tubulina Anti-cinesina Anti-dineína

\*são preparados a partir de anticorpos purificados por afinidade que reagem com cadeias pesadas IgG e todas as classes de imunoglobulinas de <sup>1</sup>coelho ou <sup>2</sup>camundongo, e produzidos em cabra.

Os ovários foram lavados 3 vezes em PBS, cada uma por 5 minutos, à temperatura ambiente.

#### 5.8.5. Pós-fixação facultativa

Em caso de os tecidos estarem insuficientemente rígidos, dificultando a delicada remoção da cápsula e a estabilização para montagem da lâmina, os ovários foram refixados em solução de PBS e PF a 4%, por 15 minutos à temperatura ambiente. Depois foram novamente lavados 3 vezes em PBS, cada uma por 5 min, à temperatura ambiente.

#### 5.8.6. Montagem das lâminas

As cápsulas ovarianas foram cuidadosamente removidas, em imersão a PBS, com auxílio das mesmas tesouras e pinças utilizadas para dissecação (ver 3.2). As cápsulas foram lateralmente seccionadas e as porções superiores estendidas e separadas do restante do ovário como películas. Estas foram transferidas ao centro das lâminas com

uma gota de *Vectashield Mounting Medium*, estendidas para a planificação dos cromatóforos, e recobertas por lamínulas. As lamínulas foram vedadas com esmalte cosmético. As lâminas foram estocadas na geladeira, no escuro.

#### **5.8.7. Marcação dos microfilamentos de actina**

A marcação dos microfilamentos de actina foi realizada diferencialmente, por não envolver anticorpos. Para o reconhecimento de microfilamentos de actina, foi utilizado o composto Faloidina-FITC (faloidina associada a fluoresceína isotiocianato; Sigma-Aldrich, USA). A faloidina é uma toxina do cogumelo *Amanita phalloides*, que se acopla a polímeros de actina F, estabilizando-os (Wehland *et al.*, 1977). A fluorescência do FITC tem máxima excitação em 495 nm e máxima emissão em 520 nm.

Os ovários foram dissecados, fixados e permeabilizados (ver seção 5.8.1.); lavados 3 vezes em PBS, cada uma por 5 minutos; incubados em solução de PBS e faloidina-FITC (300 nM) por 3 horas à temperatura ambiente; novamente lavados; facultativamente pós-fixados (ver seção 5.8.5.) e montados em lâmina (ver seção 5.8.6.).

#### **5.8.9. Observação por microscopia Confocal**

As imagens foram adquiridas nos Microscópios Confocais Leica TCS SP5 e SP2 do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), em colaboração com a Profa. Dra. Munira Muhammad Abdel Baqui.

## 4. Resultados

Alguns reagentes foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração máxima de 0,5% (McNamara & Ribeiro, 2000), que não afeta células. O DMSO em SFP foi perfundido nos primeiros 10 minutos de estabilização da preparação antes da perfusão com compostos no mesmo diluídos, para a certificação de que não afeta o estado de distribuição pigmentar dos cromatossomos.

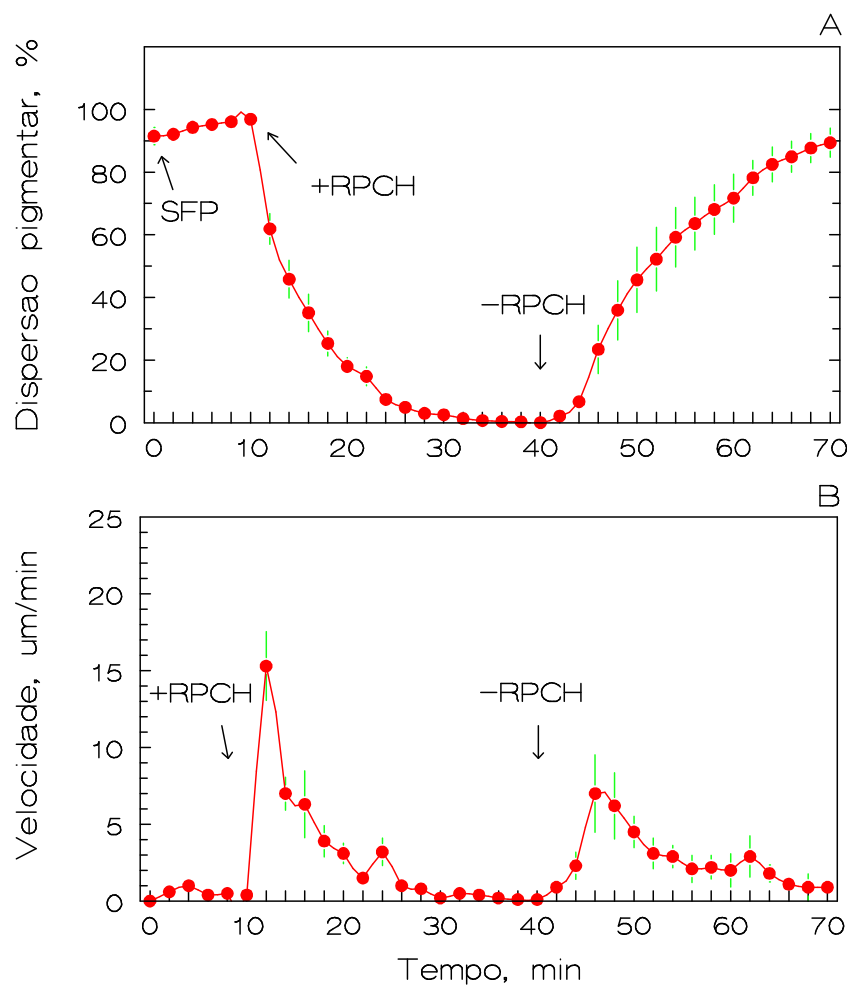
### 4.1. RPCH-controle

O RPCH induz agregação pigmentar máxima em 28 min. Aproximadamente 50% da agregação pigmentar ocorre nos primeiros 2-4 min. A dispersão observada após a retirada do RPCH atinge 89,4% (N=12) em 30 min de perfusão com SFP (Fig. 3A).

O perfil da velocidade de agregação pigmentar é formado por duas fases bem definidas: (i) a fase rápida, correspondente a um pico de 2 min (Fig. 3B: minuto 12) com elevada velocidade, que caracteriza a velocidade máxima de translocação e (ii) a fase lenta, composta por um *plateau* de velocidade intermediária, que dura 10 min (Fig. 3B: minutos 14-24) e um período de reduzida e decrescente velocidade, até cessar-se o movimento.

A média da velocidade após 2 minutos de perfusão de RPCH (minuto 12), em que se pode observar o maior pico de velocidade de agregação (Fig. 3B), é de  $15,3 \pm 2,2$   $\mu\text{m}/\text{min}$ . No entanto, em alguns animais a velocidade máxima de agregação não ocorre neste mesmo minuto, sendo o pico retardado. Por isso, a média da velocidade máxima de agregação de todas as amostras é de  $16,7 \pm 1,6$   $\mu\text{m}/\text{min}$ , e será este o valor usado para comparação com os grupos experimentais nas análises estatísticas. No *plateau*, a velocidade média de agregação é de  $2,9$   $\mu\text{m}/\text{min}$ .

A velocidade de dispersão atinge um pico após 6 minutos de lavagem do RPCH (minuto 46) de  $7,0 \pm 2,5 \mu\text{m}/\text{min}$ , e a partir deste momento decai lentamente até cessar. A média da velocidade de dispersão é de  $2,7 \mu\text{m}/\text{min}$  (Fig. 3B).



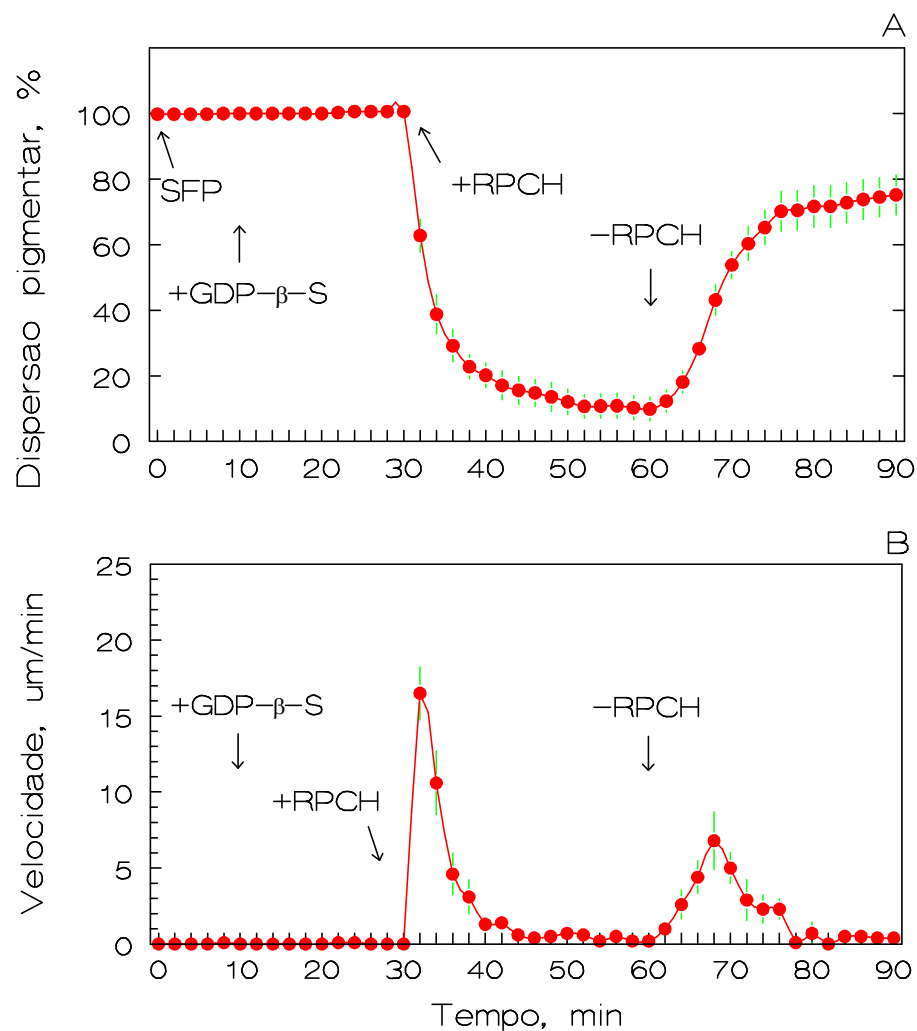
**Figura 3.** Decurso temporal do grau de dispersão (%) (A) e da velocidade de translocação ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (B) pigmentar em cromatossomos ovarianos do camarão *M. olfersi* durante perfusão com e sem RPCH a 5 nM. Note em A, que ocorre agregação completa da massa pigmentar após 28 min de perfusão. Em B, a fase rápida de agregação é composta por um pico (minuto 12) e um *plateau* que compreende o período entre os minutos 14 e 24. Durante a dispersão, a velocidade aumenta, atinge um pico (minuto 46) e depois decresce até cessar. Os dados são  $M \pm \text{EPM}$ ,  $N=12$ .

#### 4.2. Receptores associados à proteína G (GDP- $\beta$ -S e Antagonista da proteína G)

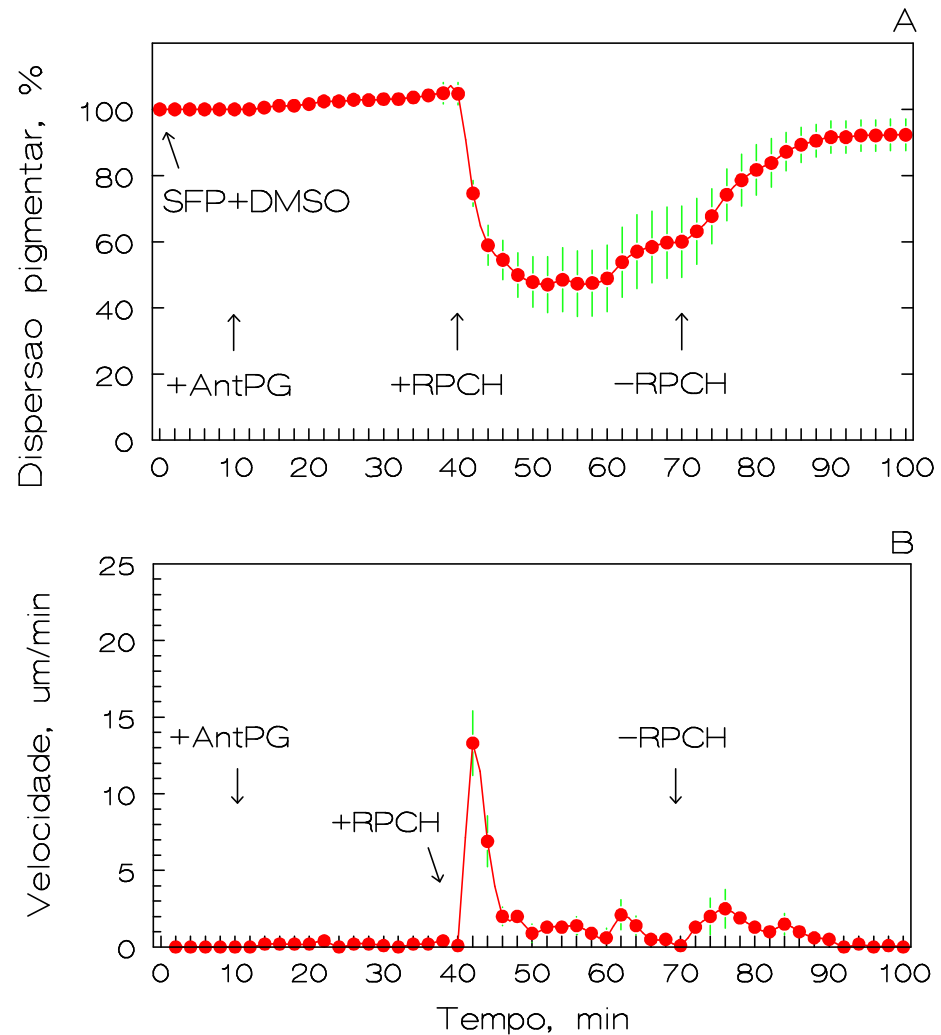
Perfusões com GDP- $\beta$ -S, inibidor de receptores associados à Proteína G, a 10  $\mu$ M, e AntPG, inibidor de receptores associados à proteína G<sub>oi</sub>/G<sub>o0</sub>, a 5  $\mu$ M, não causam efeito por si. Com a adição do RPCH na perfusão com GDP- $\beta$ -S a agregação quase se completa (90%) após 30 minutos ( $9,9\% \pm 3,6\%$ ; Fig. 4A), mas na perfusão com AntPG é fortemente inibida (Fig. 5A). Na última, a agregação dura apenas 12 min, chegando a  $47 \pm 8,5\%$  de dispersão pigmentar, e é seguida de dispersão espontânea, atingindo  $60 \pm 10,8\%$  ao final da perfusão com RPCH. Após 30 min de lavagem do RPCH, a dispersão atinge  $75,2 \pm 6,1\%$  na perfusão com GDP- $\beta$ -S e  $92,3 \pm 4,8\%$  com AntPG.

Dois minutos após perfusão de GDP- $\beta$ -S e AntPG com RPCH observa-se um pico das médias de velocidade de  $16,5 \pm 1,7 \mu\text{m}/\text{min}$  (Fig. 4B) e  $13,3 \pm 2,1 \mu\text{m}/\text{min}$  (Fig. 5B), respectivamente. As velocidades máximas médias são de  $18,5 \pm 0,8 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-controle,  $16,7 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,90$ ) e  $13,3 \pm 2,1 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-controle,  $16,7 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,85$ ). A média das velocidades do *plateau*, que dura 10 min no experimento com GDP- $\beta$ -S, é  $4,2 \mu\text{m}/\text{min}$ , mas com AntPG esta fase desaparece. A dispersão espontânea com RPCH +AntPG atinge uma velocidade máxima média de  $2,1 \pm 1 \mu\text{m}/\text{min}$ . Com GDP- $\beta$ -S e AntPG a dispersão durante a lavagem do RPCH tem velocidades máximas de  $6,8 \pm 1,9 \mu\text{m}/\text{min}$  e  $2,5 \pm 1,2 \mu\text{m}/\text{min}$ , que posteriormente decrescem até cessar. As velocidades médias da dispersão pigmentar são de  $2 \mu\text{m}/\text{min}$  e  $0,9 \mu\text{m}/\text{min}$ , respectivamente.

A forte inibição por AntPG da agregação pigmentar induzida pelo RPCH e a dispersão espontânea indicam que receptores associados à proteína G estão envolvidos, ao menos parcialmente, na transdução de sinal do RPCH, e possivelmente sejam seu próprio receptor agonista.



**Figura 4.** Decurso temporal do grau de dispersão (%) (A) e da velocidade de translocação ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (B) pigmentar em cromatossomos ovarianos de *M. olfersi* em resposta a perfusões com RPCH a 5 nM e GDP- $\beta$ -S, inibidor de receptor associado à proteína G, a 10  $\mu\text{M}$ . O efeito do composto na agregação é muito sutil (A). Dados são  $X \pm \text{EPM}$ ,  $N=7$ .



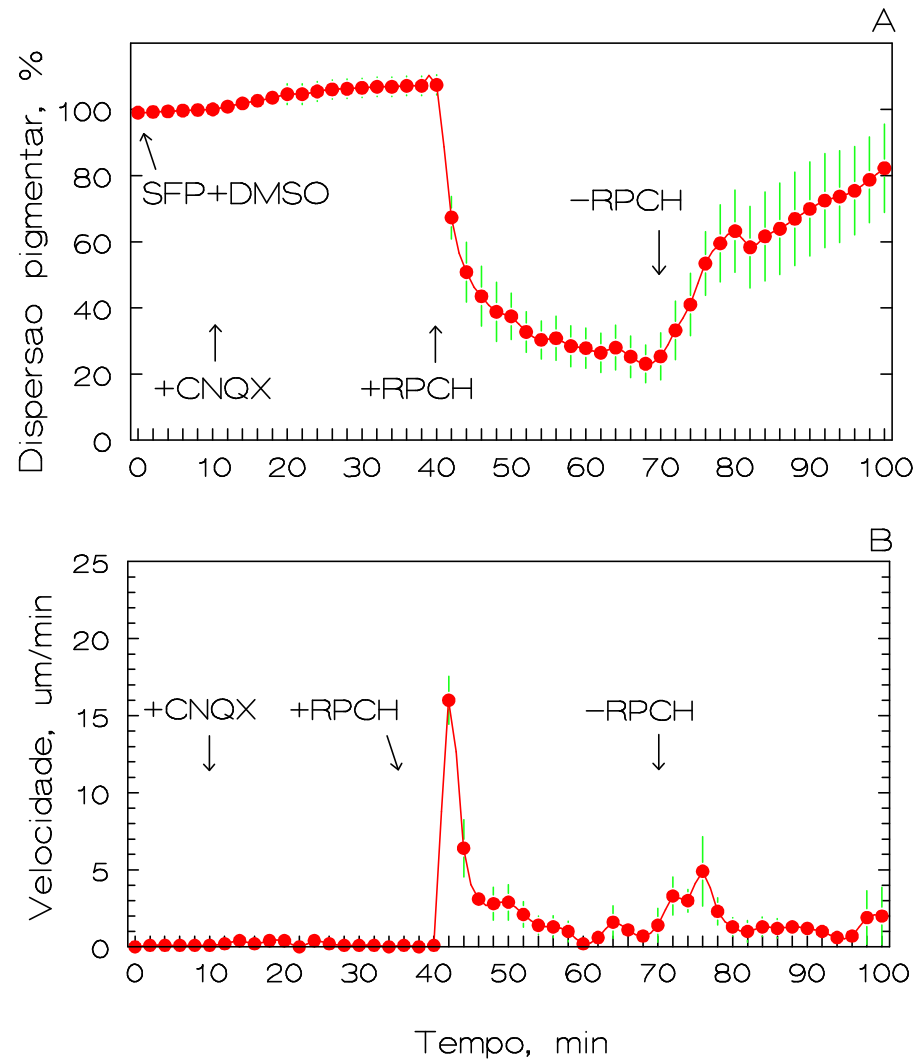
**Figura 5.** Decurso temporal do grau de dispersão (%) (A) e da velocidade de translocação ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (B) pigmentar em cromatossomos ovarianos de *M. olfersi* em resposta a perfusões com RPCH a 5 nM e Antagonista da proteína G a 5  $\mu\text{M}$ . A agregação desencadeada pelo RPCH é fortemente inibida e ocorre dispersão espontânea (A), porém a velocidade da fase rápida não é afetada. Dados são  $\bar{X} \pm \text{EPM}$ ,  $N=7$ .



### **4.3. Receptores de glutamato não-NMDA (CNQX e AMPA)**

O CNQX, um potente antagonista de receptores de glutamato não-NMDA, foi testado a 100  $\mu\text{M}$  (N=2, dados não mostrados), e apresentou em média a mesma resposta de 50  $\mu\text{M}$ , concentração eleita para o experimento. A perfusão com CNQX por si causa hiperdispersão, que chega a  $107,4\% \pm 3$  após 30 min. CNQX inibe parcialmente a agregação induzida por RPCH, e os cromatossomos ficam  $25 \pm 7\%$  dispersos ao final de 30 min. Ao lavar o RPCH do perfusato por 30 min, a dispersão pigmentar atinge  $82,2 \pm 13\%$  (Fig. 6A).

O perfil de velocidade de agregação desencadeada por RPCH + CNQX não difere do RPCH-controle. O pico das médias de velocidade é  $16 \pm 1,5 \mu\text{m}/\text{min}$ , coincidente com a velocidade máxima média (= RPCH-controle,  $16,7 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$ , P=0,95). O *plateau* dura 10 min e tem velocidade média de  $3,5 \mu\text{m}/\text{min}$ . A dispersão apresenta uma velocidade máxima de  $4,9 \pm 2,2 \mu\text{m}/\text{min}$  e velocidade média de  $1,8 \mu\text{m}/\text{min}$  (Fig. 6B).



**Figura 6.** Decurso temporal do grau de dispersão (%) (A) e da velocidade de translocação ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (B) pigmentar em cromatosomos ovarianos de *M. olfersi* em resposta a perfusões com RPCH (5 nM) e CNQX, antagonista do receptor de glutamato não-NMDA, a 50  $\mu\text{M}$ . CNQX causa ligeira hiperdispersão e inibe cerca de 25% da agregação induzida pelo RPCH (A), porém sem afetar a velocidade da fase rápida (B). Dados são X + EPM, N=7.

O AMPA, agonista do receptor de glutamato não-NMDA, a 30  $\mu$ M, causa por si forte hiperdispersão, levando a  $114,2 \pm 3,6\%$ . Com a adição do RPCH, a agregação pigmentar quase se completa em 30 min, levando a  $4,5 \pm 2,3\%$  de dispersão. Após 30 min de lavagem do RPCH, a dispersão atinge  $95 \pm 4,6\%$  (Fig. 7A).

O perfil de velocidade também se mostra similar ao RPCH-controle, com pico de velocidade de  $15,9 \pm 1,5 \mu\text{m}/\text{min}$ , velocidade máxima média de  $16,3 \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$ , e estatisticamente semelhante à do RPCH-controle ( $16,7 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,86$ ). O *plateau* dura 10 min e tem média de  $4,3 \mu\text{m}/\text{min}$ . A velocidade máxima de dispersão é  $6,4 \pm 1,7 \mu\text{m}/\text{min}$  (minuto 78) e a média é  $2,3 \mu\text{m}/\text{min}$  (Fig. 7B).

A inibição parcial da agregação pelo inibidor do receptor de glutamato não-NMDA, em conflito com a indução de forte hiperdispersão pelo estimulador de mesmo não esclarecem o papel deste receptor na translocação pigmentar e sugerem que este não está diretamente envolvido na transdução de sinal desencadeada pelo RPCH.

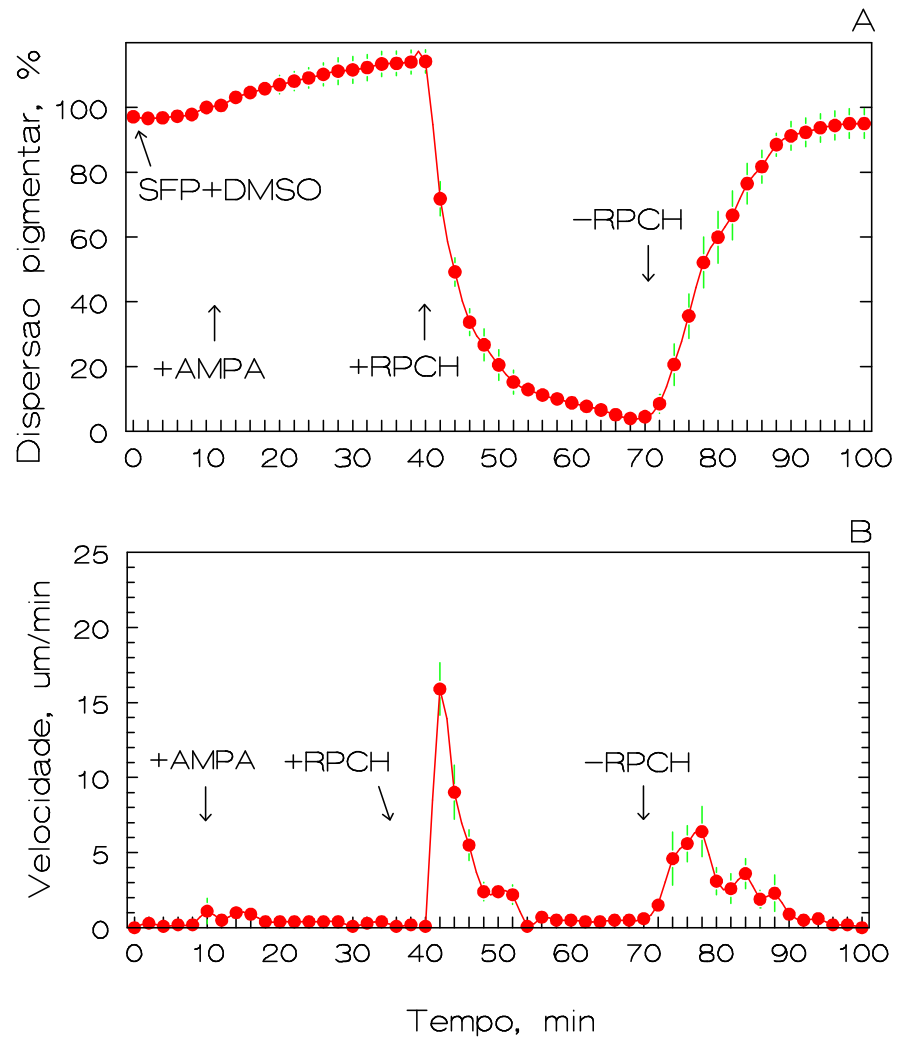


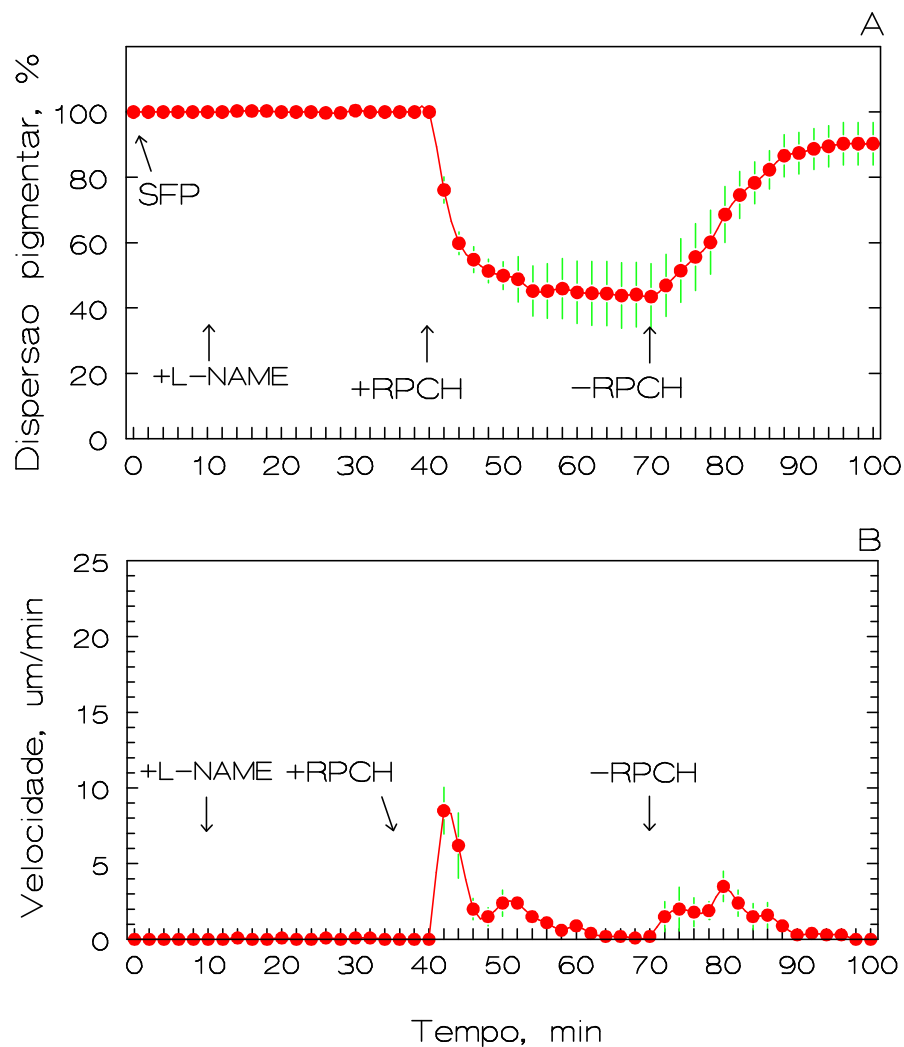
Figura 7. Decurso temporal do grau de dispersão (%) (A) e da velocidade de translocação ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (B) pigmentar em cromatossomos ovarianos de *M. oleari* em resposta a perfusões com RPCH (5 nM) e AMPA, agonista do receptor de glutamato não-NMDA, a 30  $\mu\text{M}$ . Observe em A que o AMPA causa por si notável hiperdispersão, e não afeta a agregação pigmentar induzida pelo RPCH. Dados são  $\bar{X}$  + EPM, N=8.

#### 4.4. Óxido nítrico sintase (L-NAME)

O L-NAME, inibidor da NOS, primeiramente testado a 1 (N=2) e 3 mM (N=2; dados não mostrados), desempenhou maior efeito a 5 mM. O composto não causa efeito por si, mas inibe fortemente a agregação induzida pelo RPCH interrompendo o movimento pigmentar após 14 min de perfusão com RPCH. Após 30 min de perfusão os cromatossomos apresentam  $43,5 \pm 10\%$ . Após 30 min de lavagem, a dispersão atinge  $90,3 \pm 6,5\%$  (Fig. 8A).

O pico de velocidade é de  $8,5 \pm 1,5 \mu\text{m}/\text{min}$ , a velocidade máxima média é de  $11,1 \pm 1,3 \mu\text{m}/\text{min}$ , (= RPCH-controle,  $16,7 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,38$ ), e o *plateau*, de  $2,9 \mu\text{m}/\text{min}$  em média, que dura 10 min. A velocidade máxima de dispersão é  $3,5 \pm 1 \mu\text{m}/\text{min}$  (minuto 80) e a média é  $1,2 \mu\text{m}/\text{min}$  (Fig 8B).

O efeito de forte inibição indica que a NOS tem um papel importantíssimo na cascata do RPCH, provavelmente sendo um elemento central de ativação de proteínas da cascata do GMPC.



**Figura 8.** Decurso temporal do grau de dispersão (%) (A) e da velocidade de translocação ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (B) pigmentar em cromatosomos ovarianos de *M. olfersi* em resposta a perfusões com RPCH (5 nM) e L-NAME, inibidor da NOS, a 5 mM. A agregação pigmentar desencadeada por RPCH é fortemente inibida. O efeito do L-NAME é completamente reversível. Dados são  $\bar{X} \pm \text{EPM}$ , N=7.

#### **4.5. Proteína cinase G (Rp-sGMPC-trietilamina)**

A perfusão de rp-sGMPC-trietilamina, inibidor da PKG, a 3  $\mu$ M, por si causa uma sutil dispersão de  $99,4 \pm 0,6$  para  $103,6 \pm 3,6$  % em 30 minutos (Fig. 9A). A adição do RPCH causa agregação pigmentar apenas incompleta (67%), atingindo-se os  $36,2 \pm 5,6$ % de dispersão, que dura 12 min. A partir do minuto 52, ocorre uma leve dispersão espontânea, na presença do RPCH, que atinge  $41,2 \pm 9,2$ % ao final dos 30 minutos de perfusão com RPCH. Com a lavagem do RPCH, curiosamente os pigmentos levam 6 min até iniciar a sua dispersão, que ao final de 30 min da perfusão de SFP atinge 70%.

A média do pico de velocidade observado no minuto 42 (Fig 9B) é de  $14,4 \pm 2,5$   $\mu$ m/min. A média das velocidades máximas de agregação é de  $16,9 \pm 1,8$   $\mu$ m/min, estatisticamente semelhante ao RPCH-controle ( $P=0,94$ ). O *plateau* dura apenas 4 min, com média de 5,9  $\mu$ m/min. A velocidade de dispersão não apresenta um pico característico, atingindo máxima velocidade de  $2,7 \pm 1$   $\mu$ m/min, com média de 0,9  $\mu$ m/min.

Aparentemente, a PKG é ativada durante a cascata de sinalização do GMPC desencadeada pelo RPCH e tem um papel muito importante na fosforilação de proteínas durante a agregação pigmentar, já que a inibição dessa cinase interrompe o mecanismo logo após a fase inicial rápida.

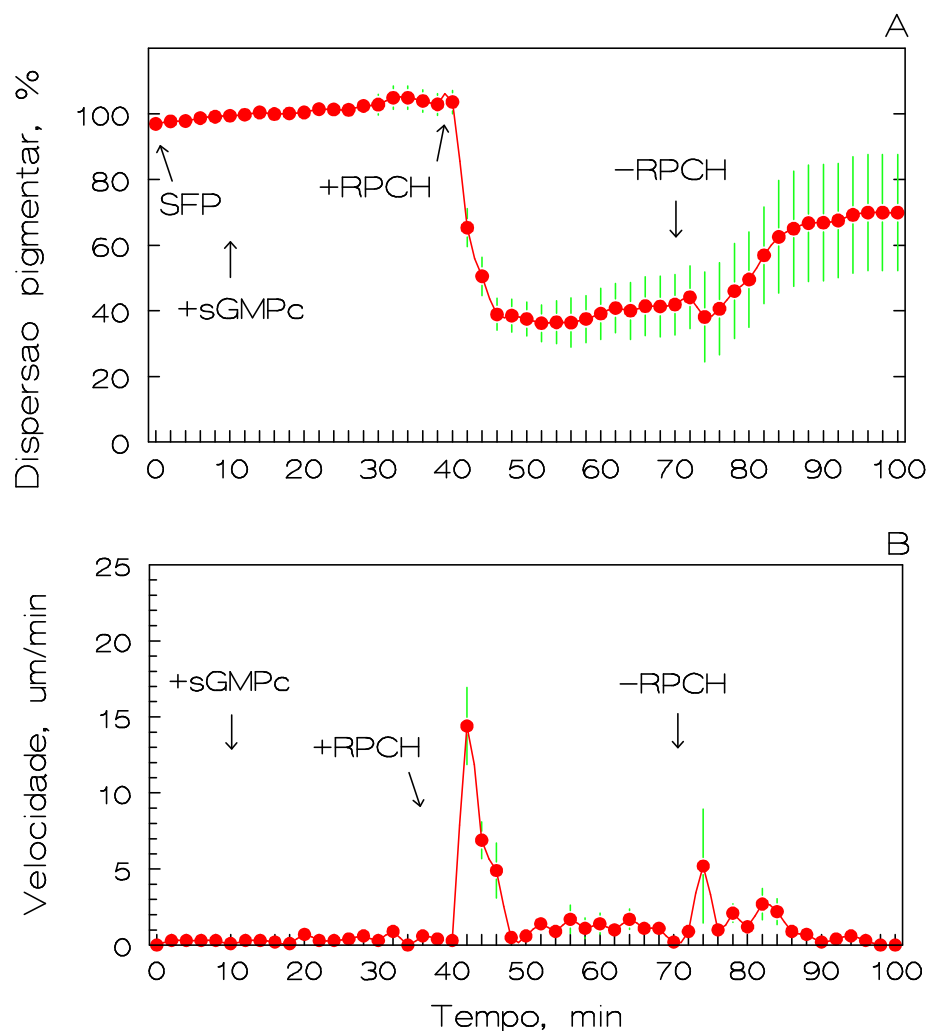


Figura 9. Decurso temporal do grau de dispersão (%) (A) e da velocidade de translocação ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (B) pigmentar em cromatossomos ovarianos de *M. oleari* em resposta a perfusões com RPCH (5 nM) e Rp-sGMPc-trietilamina, inibidor altamente específico da PKG, a 3  $\mu\text{M}$ . Note que a fase lenta da agregação induzida por RPCH é fortemente inibida e que após sua lavagem, a dispersão atinge aproximadamente 70% (A). Dados são  $\bar{X} + \text{EPM}$ ,  $N=10$ .



#### **4.6. Fosfatase (MLCP) e cinase (MLCK) da cadeia leve da miosina (Cantaridina e ML-7)**

Cantaridina, inibidora da MLCP, a 10  $\mu\text{M}$ , por si leva à hiperdispersão pigmentar (106,7%). Com a adição do RPCH, a agregação quase se completa (95%) após 24 minutos ( $4,4\% \pm 2,6$ ). Entretanto, nos últimos 6 minutos de perfusão há uma leve dispersão espontânea ( $9,2 \pm 5,1\%$ ). Com a lavagem do RPCH, a dispersão atinge os  $85,1 \pm 11,1\%$  ao final da perfusão (Fig. 10A).

Dois minutos após perfusão com RPCH (min 42) observa-se um pico das médias de velocidade de  $22,7 \pm 2,2 \mu\text{m}/\text{min}$ . A velocidade máxima média é de  $25,1 \pm 2,6 \mu\text{m}/\text{min}$ , maior que a do RPCH-controle ( $16,7 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,015$ ). O *plateau*, que dura 8 min, tem média de  $6,1 \mu\text{m}/\text{min}$ . A dispersão apresenta uma fase inicial rápida, com velocidade máxima de  $8,2 \pm 1,4 \mu\text{m}/\text{min}$ , que posteriormente decresce até cessar. A velocidade média é de  $2,4 \mu\text{m}/\text{min}$  (Fig. 10B).

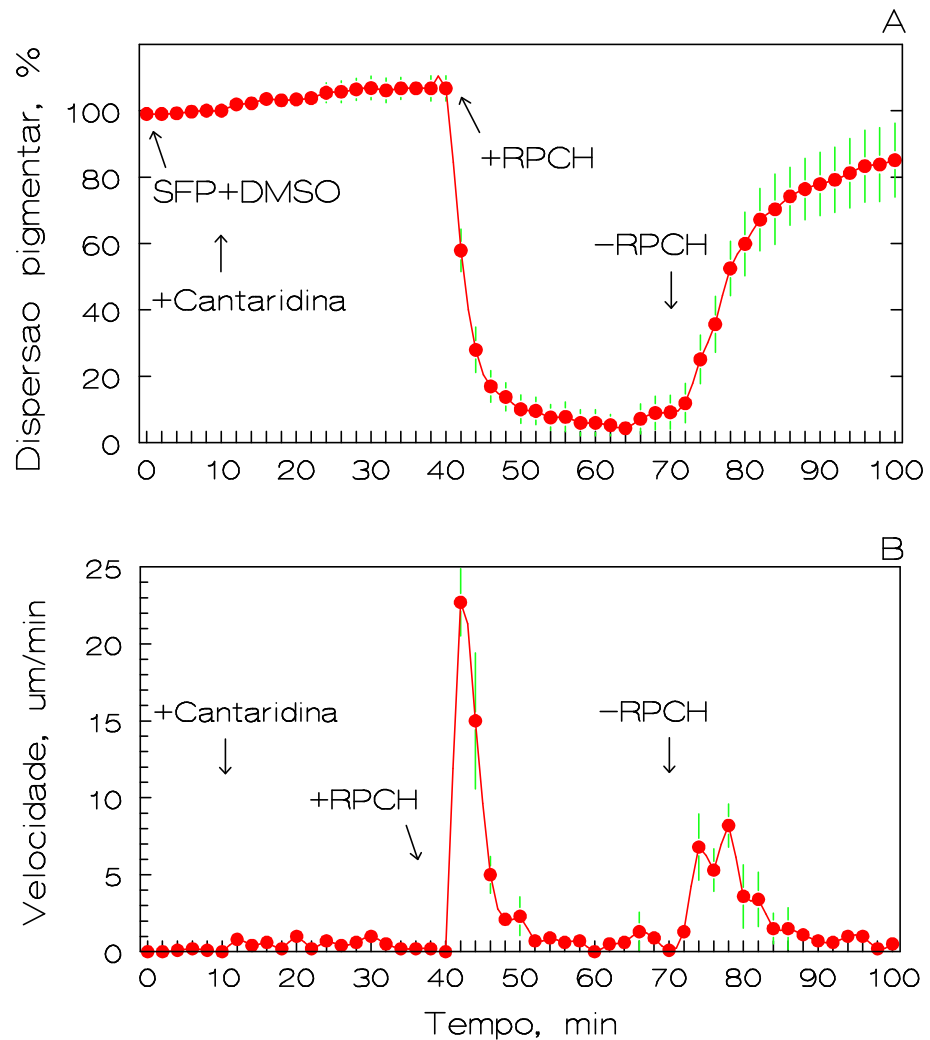


Figura 10. Decurso temporal do grau de dispersão (%) (A) e da velocidade de translocação ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (B) pigmentar em cromatossomos ovarianos de *M. olfersi* em resposta a perfusões com RPCH (5 nM) e Cantaridina, inibidor da MLCP, a 10  $\mu\text{M}$ . Note em A que a Cantaridina por si induz ligeira hiperdispersão, acelera a agregação induzida por RPCH, que se completa em 24 min e é subsequenciada por uma ligeira dispersão espontânea. A velocidade máxima de agregação (B) é maior que no RPCH-control (Figura 3 B), e a dispersão após a lavagem também é rápida. Dados são  $\bar{X} + \text{EPM}$ , N=7.

O ML-7, inibidor da MLCK, foi empregado a 10  $\mu\text{M}$  (N=9) e a 20  $\mu\text{M}$  (N=4; dados não mostrados). A concentração de 10  $\mu\text{M}$  foi escolhida para caracterizar o efeito da inibição da cinase da cadeia leve da miosina, devido a sua utilização mais freqüente na literatura (ver Discussão, seção 5.2).

ML-7 a 10  $\mu\text{M}$  não apresenta efeito por si. A adição do RPCH causa agregação pigmentar incompleta em 30 min de perfusão ( $8,7 \pm 3,14\%$  de dispersão). Com a retirada do RPCH da perfusão, a dispersão pigmentar atinge os  $75,8 \pm 10,3\%$  em 30 minutos (Fig. 11A).

Dois minutos após a perfusão com RPCH (min 42), observa-se um pico de velocidade de  $14,1 \pm 0,7 \mu\text{m}/\text{min}$ , que neste caso é coincidente com a velocidade máxima média, e estatisticamente semelhante à do RPCH-controle ( $16,7 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,277$ ). O *plateau* dura apenas 4 min, com média de  $2,8 \mu\text{m}/\text{min}$ . A velocidade de dispersão é lenta e decrescente durante a lavagem do RPCH, apresentando média de  $1 \mu\text{m}/\text{min}$  (Fig. 11B).

A MLCP parece regular a função da miosina durante a agregação pigmentar já que, quando mantida no seu estado fosforilado, a MLC acelera a fase rápida da translocação pigmentar. Quanto a MLCK, entretanto, não se pôde identificar um papel significativo, já que a velocidade de agregação não é afetada, e ocorre apenas uma pequena inibição ao final do mecanismo de agregação.

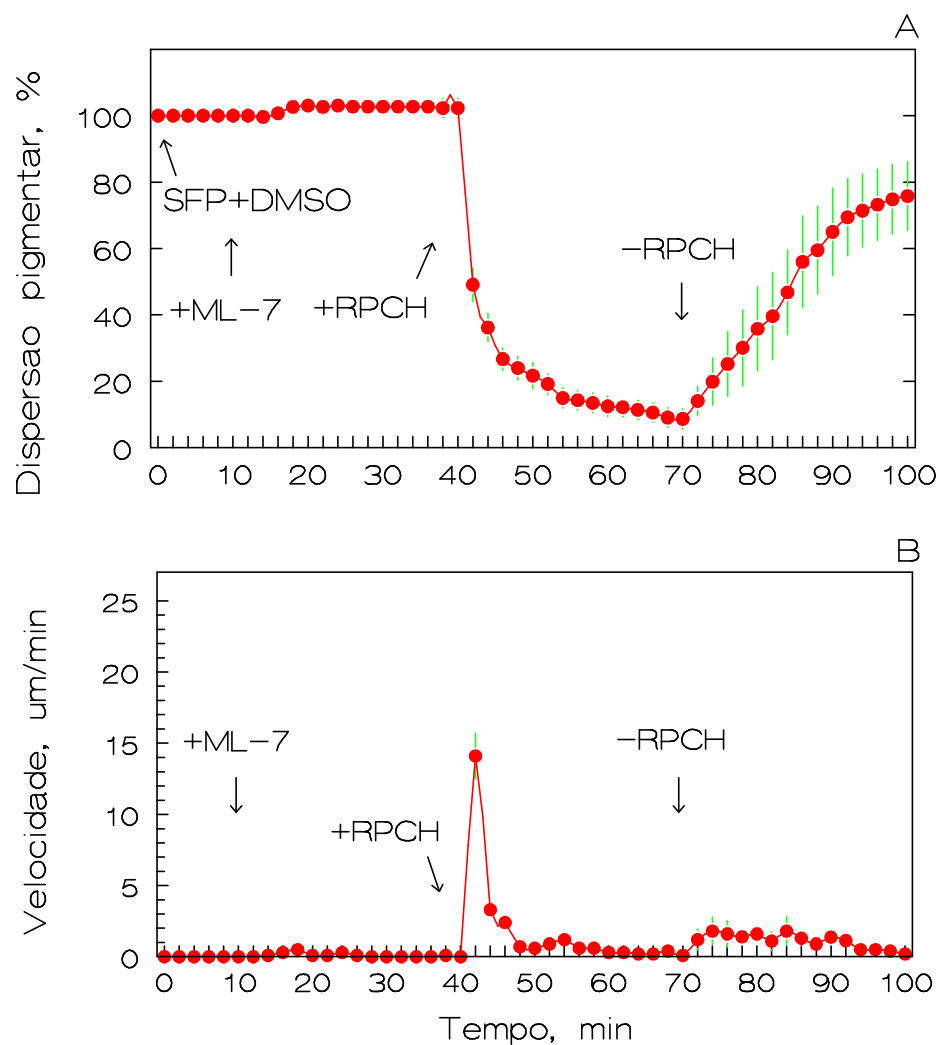


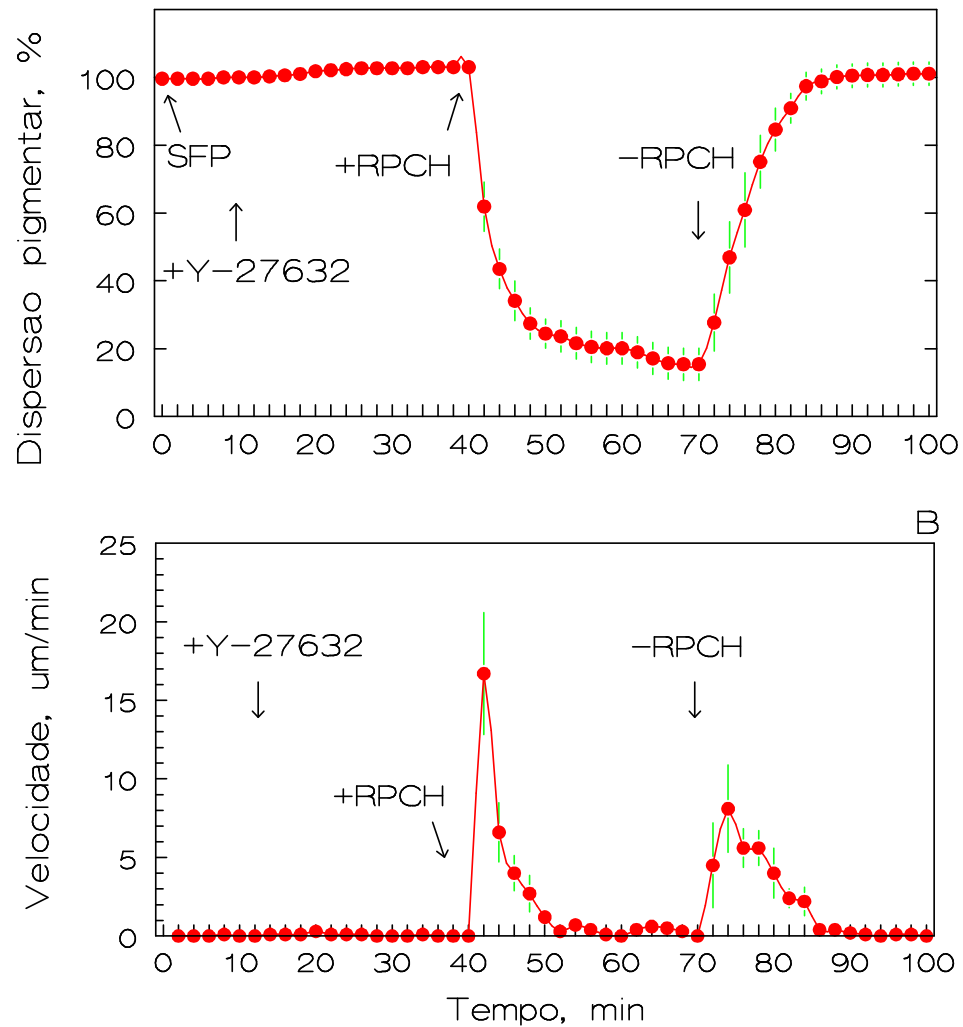
Figura 11. Decurso temporal do grau de dispersão (%) (A) e da velocidade de translocação ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (B) pigmentar em cromatossomos ovarianos de *M. olfersi* em resposta a perfusões com RPCH (5 nM) e ML-7, inibidor da MLCK, a 10  $\mu\text{M}$ . A inibição da agregação induzida pelo RPCH pelo ML-7 é muito sutil (A). Dados são X + EPM, de N=9.

#### **4.7. Cinase da proteína Rho (Y-27632 e H-1152)**

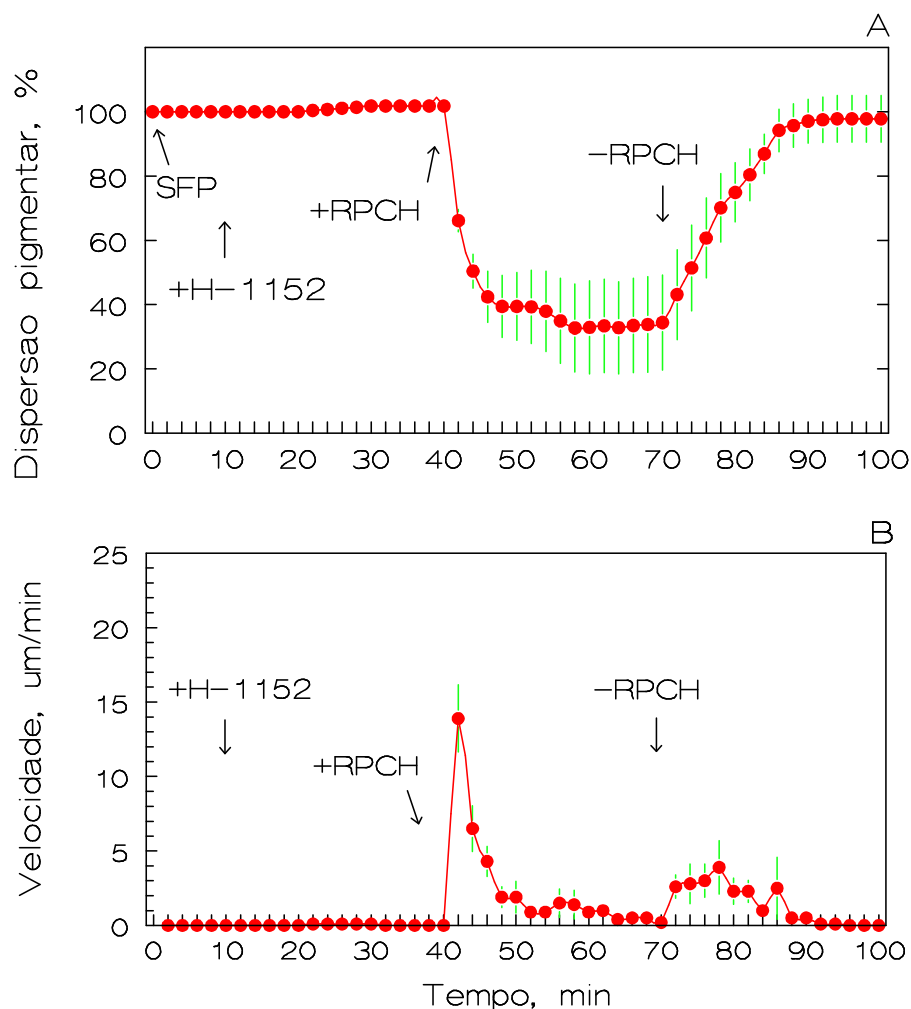
Para a escolha da concentração mais adequada dos reagentes para estes experimentos, foram realizados ensaios prévios com 1 (N=3) e 2  $\mu\text{M}$  (N=1) de Y-27632 e com 25 nM (N=3) de H-11522 (dados não mostrados). Perfusões com Y-27632 a 3  $\mu\text{M}$  e H-1152 a 50 nM, inibidores da ROCK, não causam efeito por si. Ambos inibem parcialmente a agregação desencadeada pelo RPCH, mas o efeito do H-1152 é mais drástico. Com Y-27632 +RPCH, após 30 minutos os cromatossomos atingem  $15,4 \pm 4,8\%$  (Fig. 12A), e com H-1152 +RPCH chegam ao grau mínimo de  $32,8 \pm 14,3\%$  após 24 min (Fig. 13A), seguindo-se discreta dispersão espontânea para  $34,4 \pm 14,8\%$  até o final da perfusão com RPCH. O efeito desses compostos é altamente reversível, e atinge-se  $101,1 \pm 3,4\%$  e  $97,8 \pm 7,3$ , respectivamente, após 30 min de perfusão sem RPCH.

Dois minutos após perfusão de Y-27632 e H-1152 com RPCH observa-se um pico das médias de velocidade de  $16,7 \pm 3,9 \mu\text{m}/\text{min}$  (Fig. 12B) e  $13,9 \pm 2,3 \mu\text{m}/\text{min}$  (Fig. 13B), respectivamente. As velocidades máximas médias são de  $18 \pm 3,5 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-controle,  $16,7 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,86$ ) e  $13,9 \pm 2,3 \mu\text{m}/\text{min}$  (= RPCH-controle,  $16,7 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,9$ ). O *plateau* de velocidade dura 8 min e tem média de  $3,6 \mu\text{m}/\text{min}$  com ambos os compostos. Com Y-27632 e H-1152 a dispersão durante a lavagem do RPCH tem velocidades máximas de  $8,1 \pm 2,8 \mu\text{m}/\text{min}$  (min 74) e  $3,4 \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$  (min 78) e médias de  $2,2 \mu\text{m}/\text{min}$  e  $1,4 \mu\text{m}/\text{min}$ , respectivamente.

Os compostos inibiram parcialmente a agregação, e parecem ter facilitado a dispersão, indicando que a cinase da proteína Rho tem um papel na fosforilação da cadeia leve da miosina presente nos cromatóforos, sendo um importante elemento estimulatório do movimento de agregação pigmentar.



**Figura 12.** Decurso temporal do grau de dispersão (%) (A) e da velocidade de translocação ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (B) pigmentar em cromatossomos ovarianos de *M. oleari* em resposta a perfusões com RPCH (5 nM) e Y-27632, inibidor da ROCK, a 3  $\mu\text{M}$ . A agregação induzida pelo RPCH é inibida em cerca de 15% (A), na fase lenta. A dispersão durante a lavagem do RPCH ocorre rapidamente. Dados são  $\bar{X} + \text{EPM}$ ,  $N=8$ .



**Figura 13.** Decurso temporal do grau de dispersão (%) (A) e da velocidade de translocação ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (B) pigmentar em cromatossomos ovarianos de *M. olfersi* em resposta a perfusões com RPCH (5 nM) e H-1152, inibidor altamente específico de ROCK, a 50 nM. Observe em A que a agregação desencadeada pelo RPCH é inibida em cerca de 40%, e que ao final da perfusão há uma leve tendência à dispersão espontânea. A inibição se dá principalmente na fase lenta, já que a velocidade máxima (B) é semelhante à do RPCH-controle (Figura 3 B). A dispersão durante a lavagem do RPCH ocorre rapidamente. Dados são  $\bar{X} + \text{EPM}$ ,  $N=7$ .

#### **4.8. Miosina-II não-muscular (Blebistatina)**

A blebistatina a 10  $\mu\text{M}$  não causa efeito por si. A adição do RPCH induz apenas 52% de agregação pigmentar, que dura 16 minutos ( $47 \pm 6,2\%$ ), seguida de leve dispersão pigmentar espontânea. Ao final dos 30 min de perfusão com RPCH obteve-se  $50,8 \pm 6,8\%$  de dispersão. A lavagem do RPCH com SFP leva a  $79,5 \pm 6,7\%$  em 30 min. Com a retirada do  $\text{Ca}^{2+}$  da perfusão, a dispersão chega a  $95,1 \pm 1,7\%$  após 30 min adicionais de lavagem (Figura 14A).

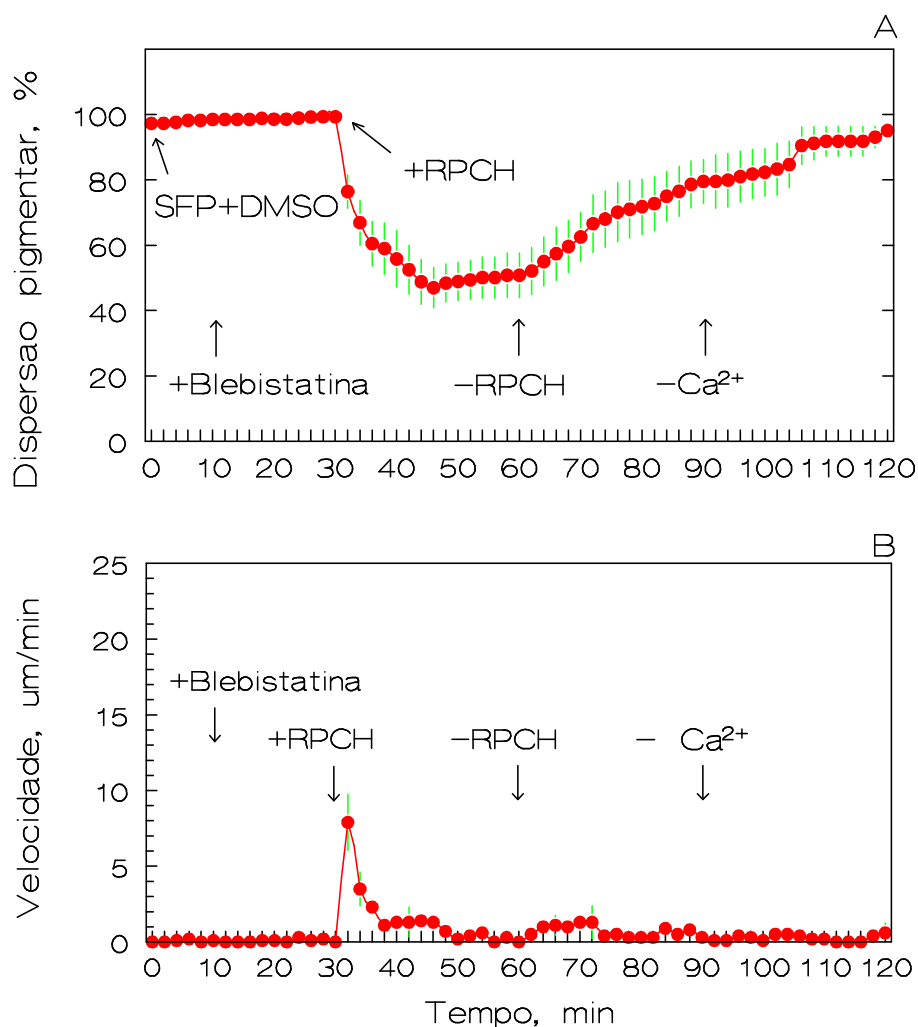
Dois minutos após a perfusão com RPCH (min 32), observa-se um pico de velocidade de  $7,9 \pm 1,8 \mu\text{m}/\text{min}$ . A velocidade máxima média é de  $9,1 \pm 1,5 \mu\text{m}/\text{min}$ , estatisticamente semelhante à do RPCH-controle ( $16,7 \pm 1,6 \mu\text{m}/\text{min}$ ,  $P=0,055$ ). Nota-se um *plateau* que dura apenas 4 min, com média de  $2,9 \mu\text{m}/\text{min}$  (Figura 14B).

A velocidade de dispersão não apresenta fase rápida, mantendo-se reduzida e oscilante, com média de  $0,7 \mu\text{m}/\text{min}$  durante a perfusão com SFP. A média de velocidade do período de lavagem sem  $\text{Ca}^{2+}$  é de  $0,25 \mu\text{m}/\text{min}$ .

Foram realizados dois ensaios com 50 e 100  $\mu\text{M}$  (dados não mostrados) para checar possíveis aumentos dose-resposta de efeito, mas não houve diferença considerável.

A miosina II não-muscular parece ser uma das classes de motor molecular ativadas durante a agregação pigmentar em cromatóforos de *M. olfersi*.





**Figura 14.** Decurso temporal do grau de dispersão (%) (A) e da velocidade de translocação ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) (B) pigmentar em cromatossomos ovarianos de *M. olfersi* em resposta a perfusões com RPCH (5 nM) e Blebistatina, inibidor da miosina II não-muscular, a 10  $\mu\text{M}$ . A agregação desencadeada pelo RPCH é fortemente inibida (A) desde a fase rápida (B) e ocorre dispersão espontânea durante a perfusão do RPCH. A blebistatina não inibe a dispersão pigmentar. Dados são  $X \pm \text{EPM}$ . N=9.

#### **4.9. Microscopia de imunofluorescência de citoesqueleto e motores moleculares**

##### **4.9.1. Autofluorescência**

Os pigmentos vermelhos contidos em grânulos nos cromatossomos ovarianos de *M.olfersi* são intensamente autofluorescentes. Em micrografia obtida a partir de lâmina contendo tecido não marcado por anticorpos ou fluoróforos (Fig. 15), observa-se o pigmento vermelho, que absorve luz no comprimento de onda entre 400 e 600 nm, com pico de absorbância em 500 nm, e a emite com pico em 568,2 nm (Boyle, 2005), na região citoplasmática dos cromatóforos. A autofluorescência não é evidenciada por todo o cromatossomo, já que a imagem mostrada (Fig. 15) representa apenas um plano seccionado, e não capta toda a área pigmentada (Fig 15C).

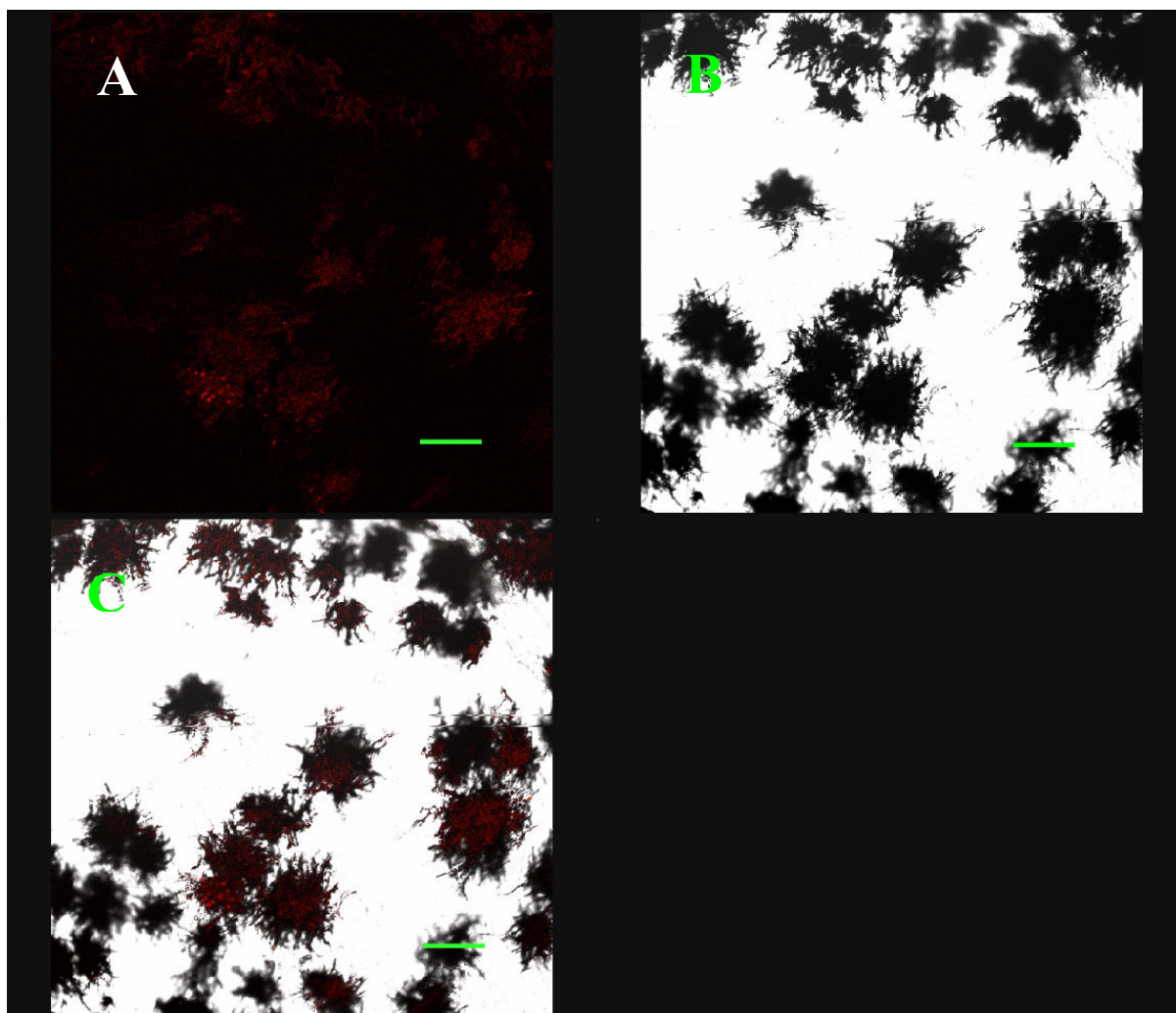


Figura 15. Micrografia obtida a partir de cromatossomos fixados no estado disperso, sem marcação com anticorpos. (A) Autofluorescência dos pigmentos (Vermelho), (B) campo claro – cromatossomos com pigmentos dispersos, (C) Autofluorescência dos pigmentos (Vermelho), com a subtração do fundo. As imagens foram adquiridas no microscópio confocal TCS SP2. Escala= 85  $\mu$ M.

#### **4.9.2. Controle**

As preparações sem o anticorpo primário, tanto com o anticorpo secundário GAM Alexa-488 quanto com o GAR Alexa-488, não evidenciaram marcação de nenhuma área em destaque, mas apenas um sinal verde sutil, igualmente distribuído pelo tecido (dados não mostrados).

#### **4.9.3. Os microfilamentos de actina**

Os microfilamentos de actina são abundantes nos fibroblastos constituintes da cápsula ovariana que reveste e sustenta os cromatossomos (Fig. 16). Os microfilamentos sobrepõem-se aos cromatossomos, e devido à sua elevada concentração, mesmo onde a actina aparece colocalizada com os mesmos (Fig. 16D), não se pode precisar se está presente intracelularmente. Entretanto, os microfilamentos acompanham perfeitamente algumas das extensões celulares preenchidas por pigmentos (Fig. 16E, *a e b*), aparentemente formando trilhos por onde os mesmos são transportados. O aperfeiçoamento da metodologia de marcação com a Faloidina-FITC, talvez após digestão parcial da cápsula ovariana, ou ainda em cultura celular, técnicas até hoje não desenvolvidas neste modelo experimental, é requerido para que se obtenha a visualização comprobatória da actina em cromatóforos por microscopia de fluorescência, bem como para a melhor compreensão de sua disposição intracelular e funcionalidade.

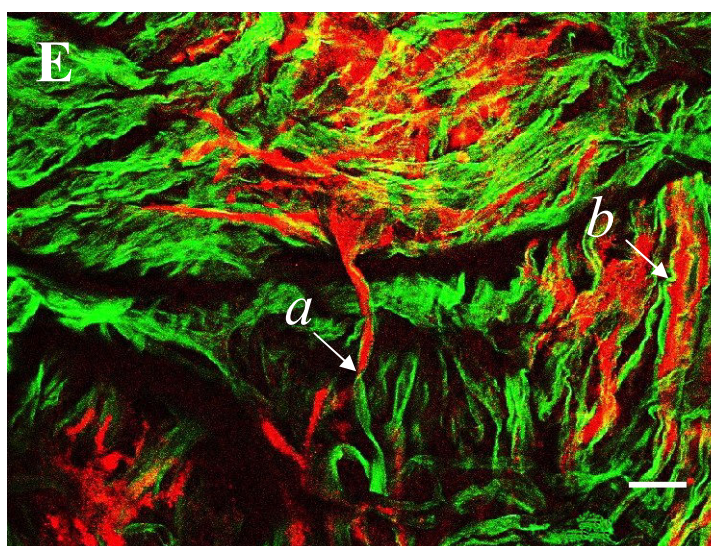
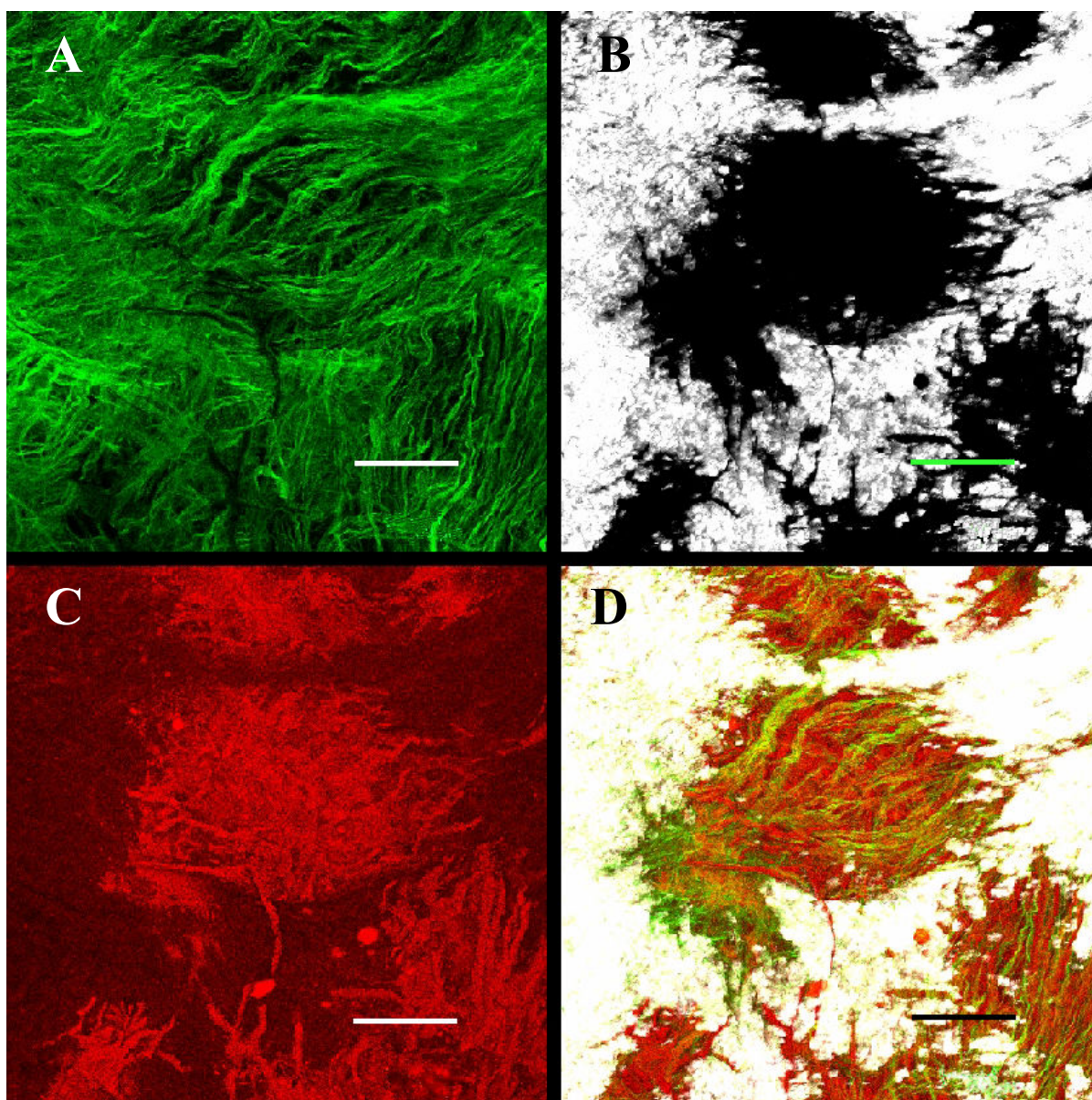


Figura 16. Micrografias evidenciando a abundância de microfilamentos de actina nos fibroblastos da cápsula ovariana, que recobrem cromatossomos dispersos. (A) Faloidina-FITC (verde), (B) campo claro, (C) autofluorescência dos pigmentos (Vermelho), (D) superimposição das imagens, com subtração do fundo. Escala= 55 $\mu$ M. (E) Detalhe aumentado da superimposição das imagens, em fundo escuro. Note em *a* e *b*, que os microfilamentos de actina envolvem as extensões celulares pigmentadas. Escala= 9,5  $\mu$ M. As imagens foram adquiridas no microscópio confocal TCS SP5.

#### **4.9.4 Os microtúbulos**

O citoesqueleto dos cromatóforos é rico em microtúbulos. Estes permanecem polimerizados ao longo das extensões celulares quando os grânulos pigmentares estão agregados, evidenciados em verde (Fig. 17A e D). As extensões celulares não são visíveis em campo claro (Fig 17B), já que estão desprovidas de pigmento. Os microtúbulos vão das extensões celulares ao centro do cromatossomos, justapostos aos pigmentos (Fig. 17 A e C).

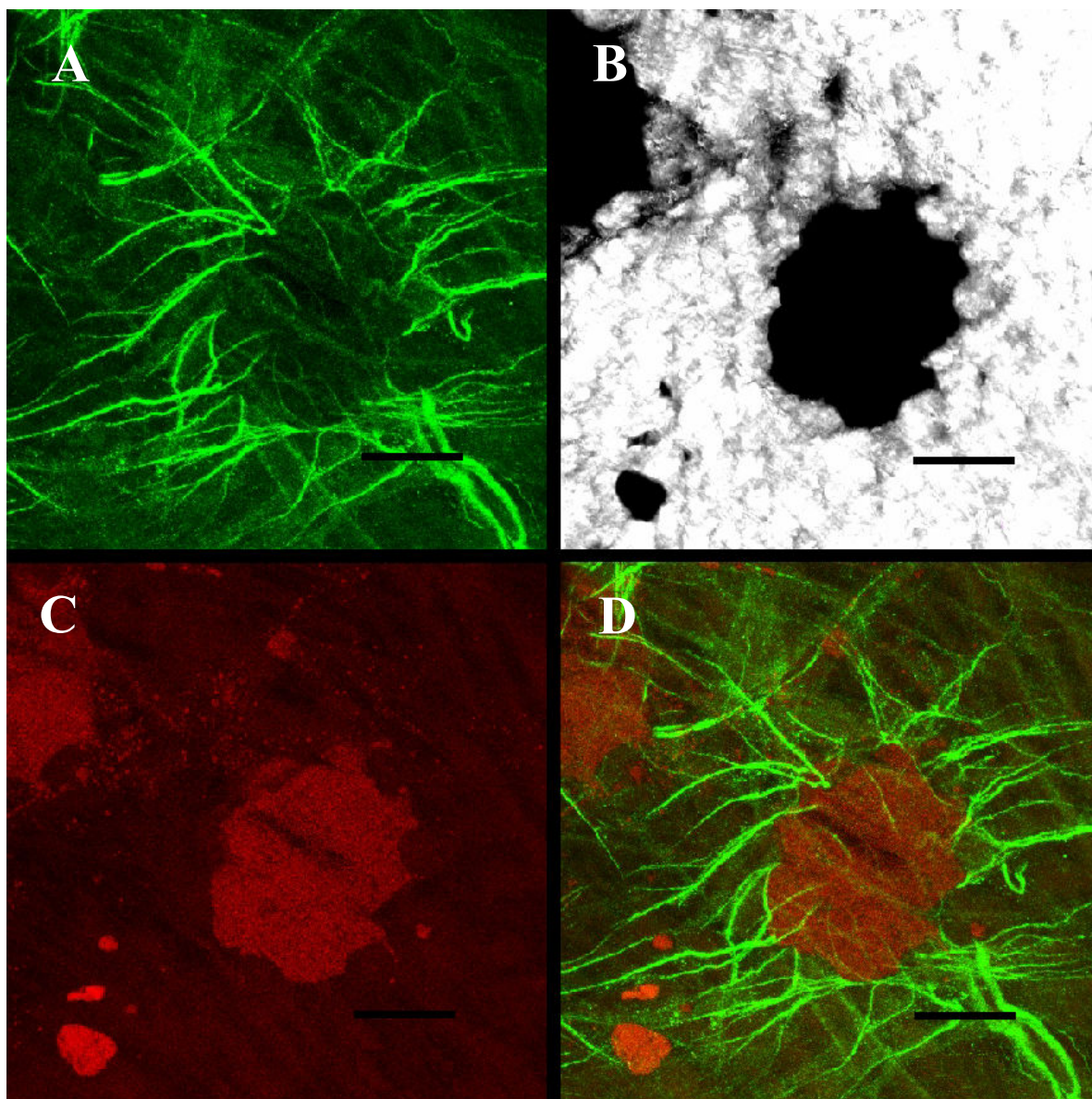


Figura 17. Micrografia de cromatossomos fixados no estado agregado evidenciando os microtúbulos nas extensões celulares e também em meio aos pigmentos. A) Anticorpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina (Verde), (B) campo claro – cromatossomos com pigmentos agregados, (C) autofluorescência dos pigmentos (Vermelho), (D) superimposição das imagens. As imagens foram adquiridas no microscópio confocal TCS SP5. Escala=26  $\mu$ M.

#### **4.9.5. Motores moleculares**

A miosina esquelética e muscular é abundante nos cromatossomos (Fig. 18). Diferentemente dos microtúbulos, sua área de ocupação se restringe à região preenchida por pigmento, indicando que está diretamente associada aos grânulos pigmentares.

A miosina II não-muscular localiza-se em toda a área dos cromatossomos (Figuras 19 e 20), ou seja, além dos locais preenchidos por pigmentos, o que fortemente evidencia sua associação ao citoesqueleto, e não aos grânulos pigmentares.

A cinesina (Figs. 21, 22, 23 e 24) e a dineína (Figs. 25 e 26) também foram identificadas. Como a miosina esquelética e muscular, acompanham as regiões preenchidas por grânulos, aparentemente estando associadas aos mesmos, o que sugere serem motores moleculares da translocação pigmentar.



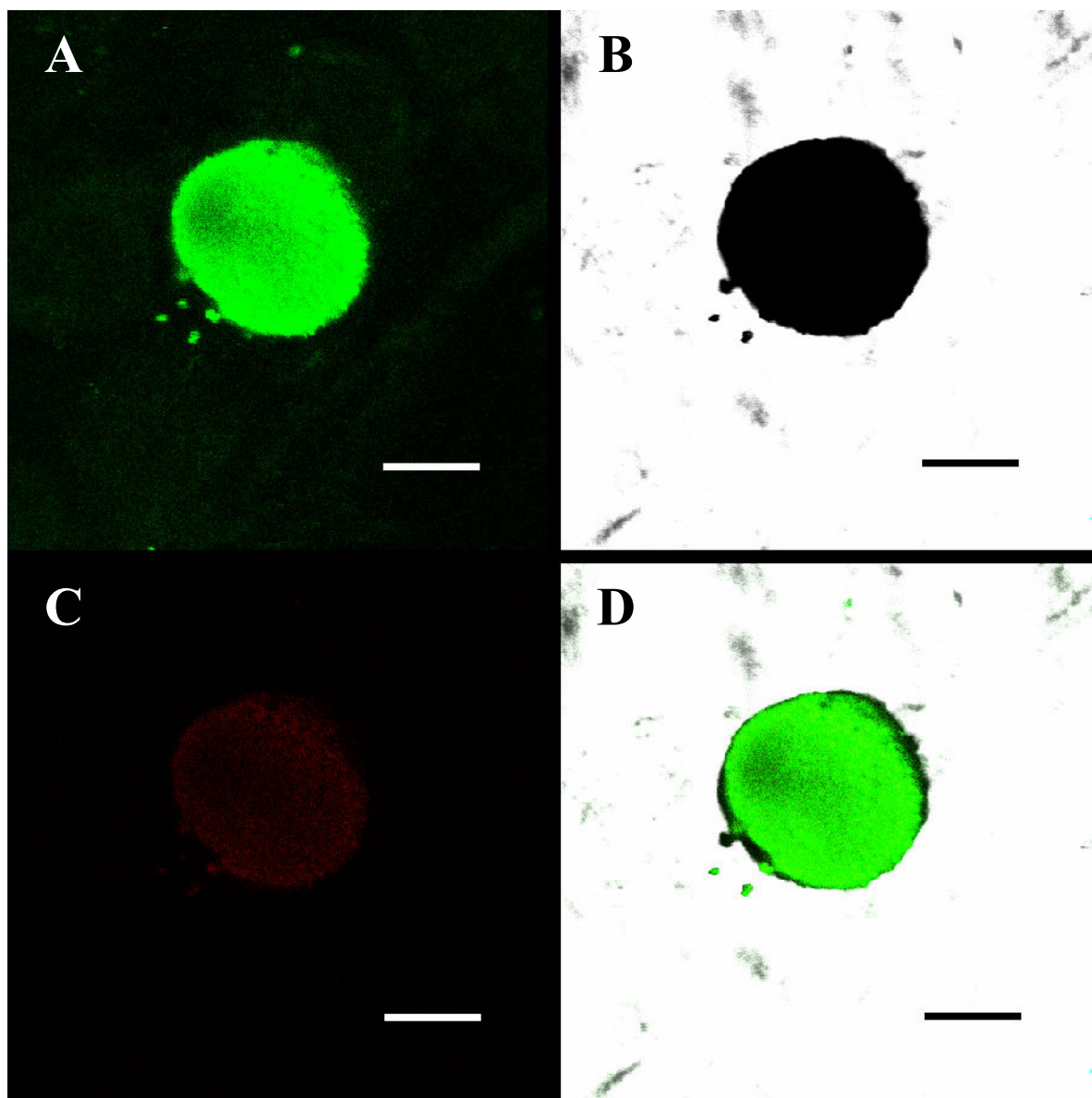


Figura 18. Micrografia de cromatossomos fixados no estado agregado mostrando miosina, de classe não identificada, fortemente evidenciada em colocação com o pigmento. (A) Anticorpo policlonal anti-miosina esquelética e muscular (Verde), (B) campo claro – cromatossomo agregado, (C) autofluorescência dos pigmentos (Vermelho), (D) superimposição de A e B, com subtração do fundo.) Sobreposição de cortes (série Z) adquirida em microscópio confocal TCS SP5. Escala= 8  $\mu$ M.

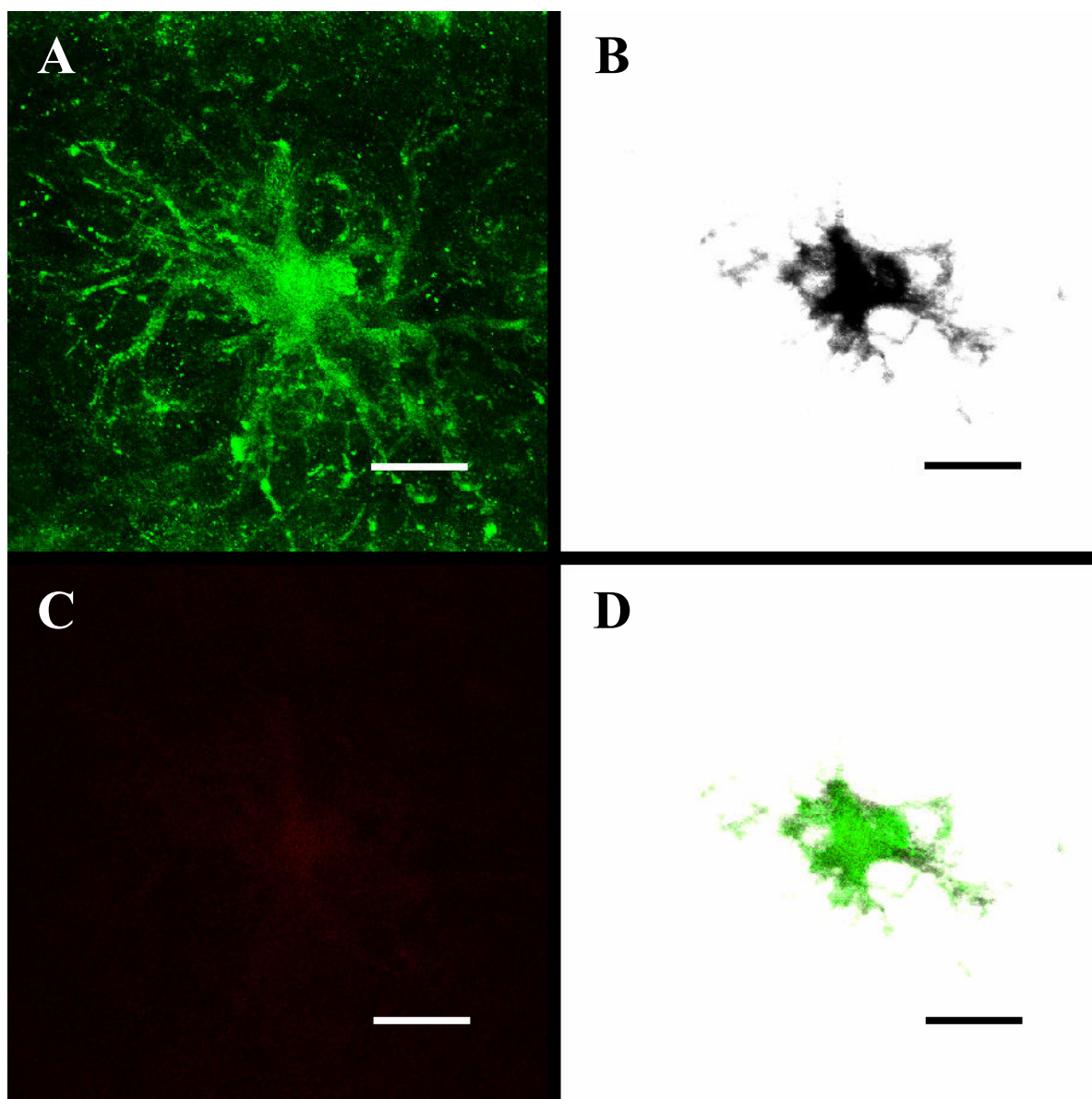


Figura 19. Micrografia de cromatossomos fixados no estado semi-disperso, mostrando a miosina II não-muscular aparentemente associada ao citoesqueleto. (A) Anticorpo policlonal anti-miosina II não muscular (Verde), (B) campo claro – cromatossomo semi-disperso, (C) autofluorescência dos pigmentos (Vermelho), (D) superimposição de A e B, com subtração do fundo. Sobreposição de cortes (série Z) adquirida em microscópio confocal TCS SP5. Escala= 17  $\mu$ M.

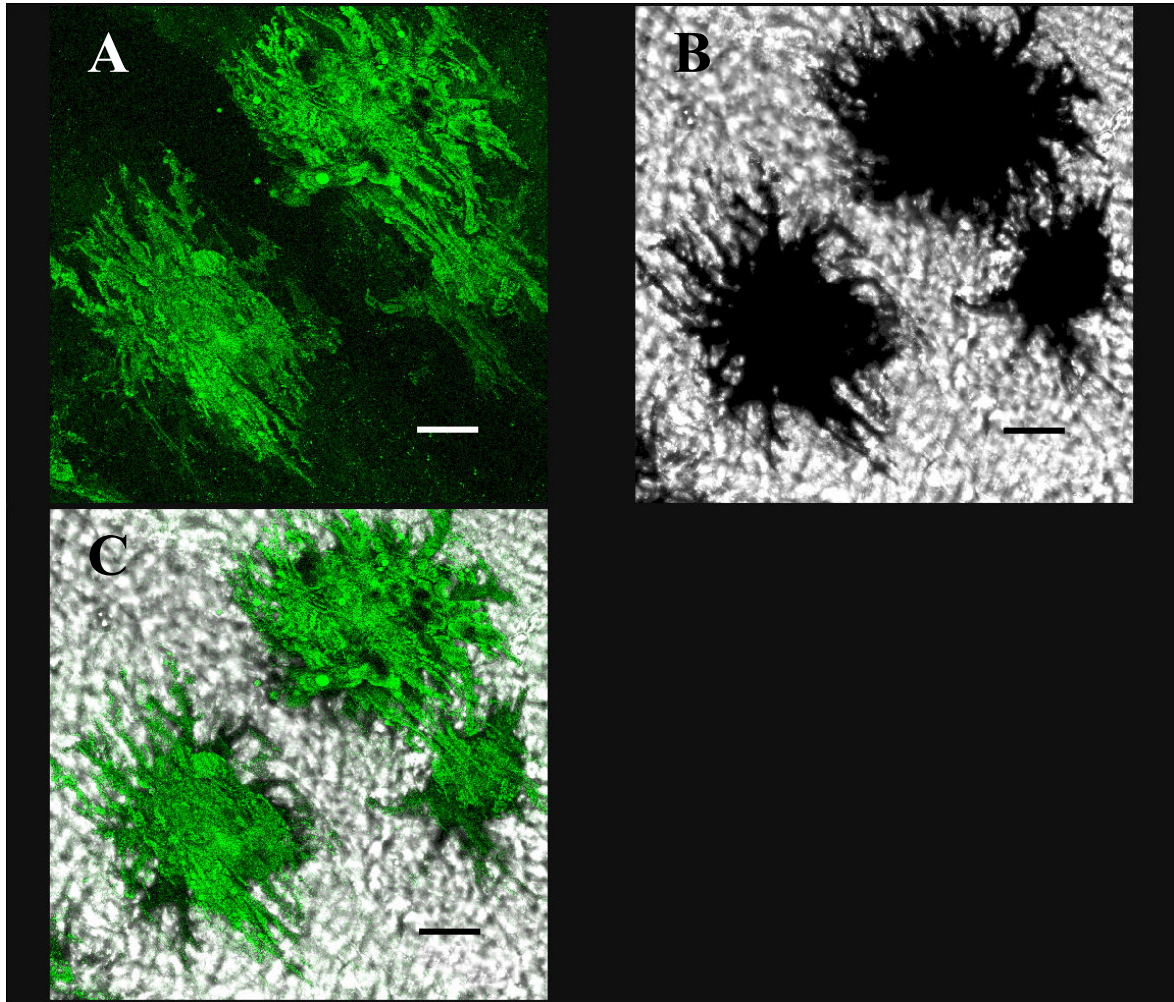


Figura 20. Micrografia de cromatossomos fixados no estado disperso, mostrando a miosina II não-muscular ocupando toda a área do citoesqueleto. (A) Anticorpo policlonal anti-miosina II não muscular (Verde), (B) campo claro – cromatossomo disperso, (C) superimposição de A e B, com subtração do fundo. Sobreposição de cortes (série Z) adquirida em microscópio confocal TCS SP5. Escala= 17  $\mu$ M. Escala= 40  $\mu$ M.

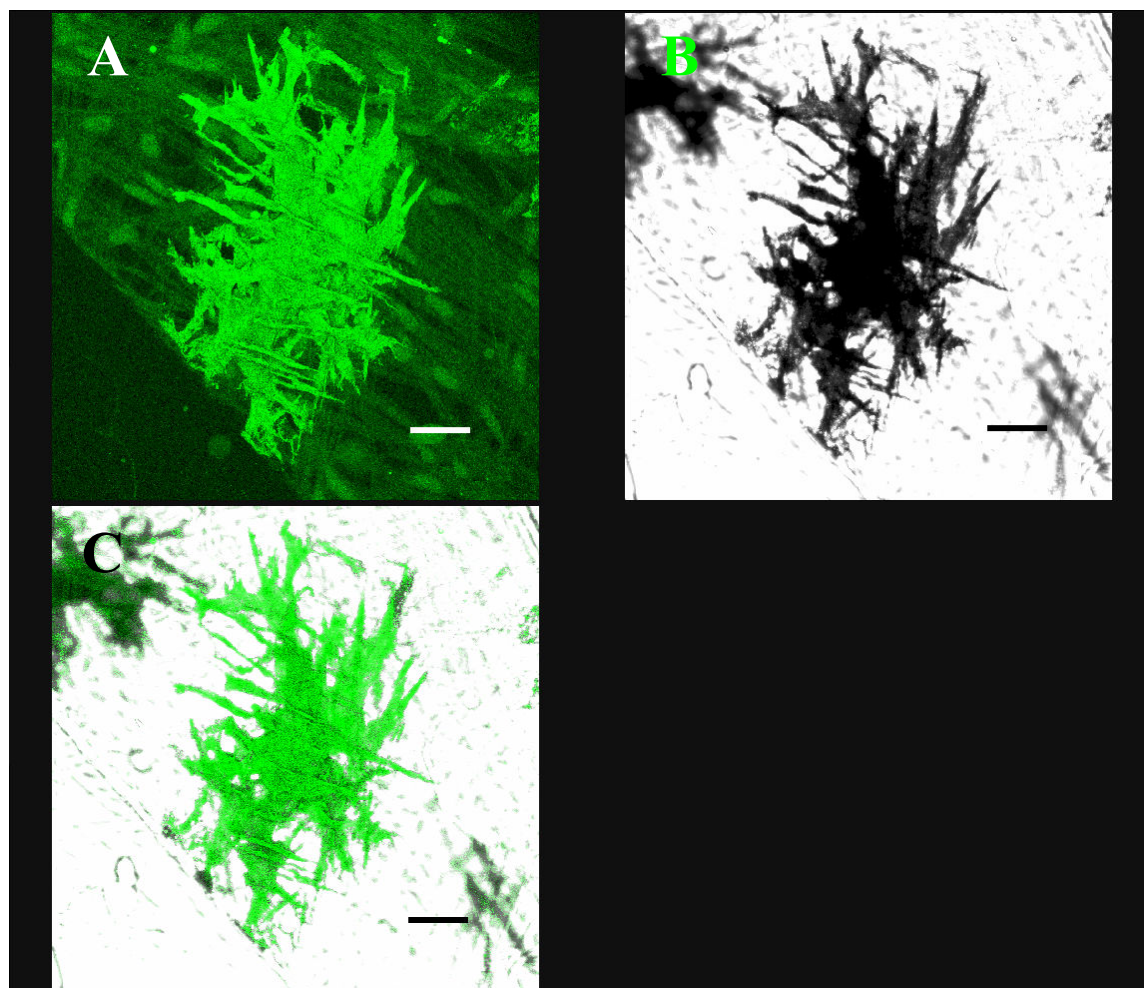


Figura 21. Micrografia de cromatossomos fixados no estado disperso, evidenciando a cinesina (A) Anticorpo monoclonal anti-cinesina (Verde), (B) campo claro – cromatossomo disperso, (C) superimposição de A e B, com subtração do fundo. Sobreposição de cortes (série Z) adquirida em microscópio confocal TCS SP2. Escala= 48  $\mu$ M.

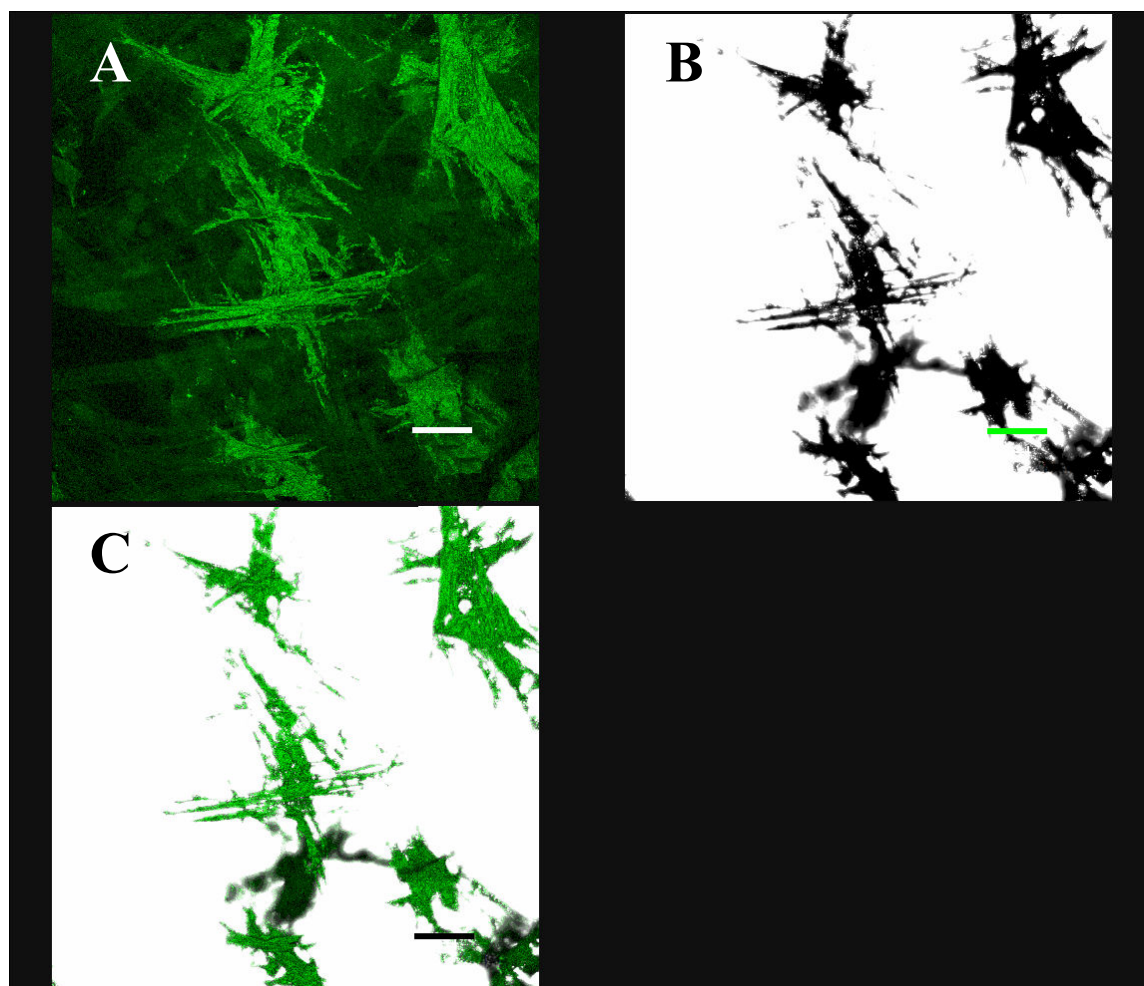


Figura 22. Micrografia de cromatossomos fixados no estado disperso, evidenciando a cinesina. (A) Anticorpo monoclonal anti-cinesina (Verde), (B) campo claro – cromatossomo disperso, (C) superimposição de A e B, com subtração do fundo. Sobreposição de cortes (série Z) adquirida em microscópio confocal TCS SP2. Escala= 55  $\mu$ M.

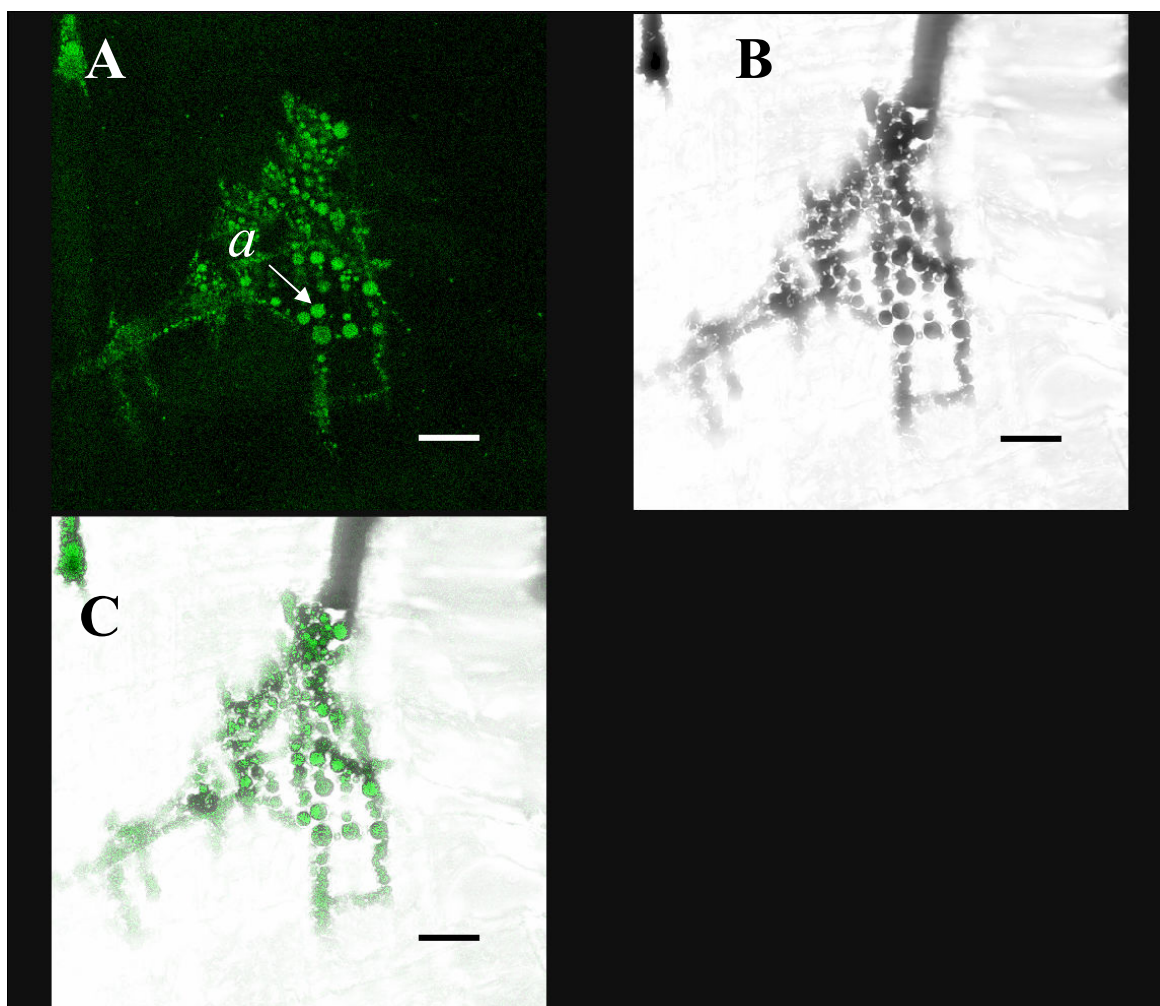


Figura 23. Micrografia de uma extensão pigmentar com grânulos pigmentares em colocação à cinesina. (A) Anticorpo monoclonal anti-cinesina (Verde), (B) campo claro – grânulos pigmentares, (C) superimposição de A e B, com subtração do fundo. Sobreposição de cortes (série Z) adquirida em microscópio confocal TCS SP2. Escala= 9,5  $\mu$ M.

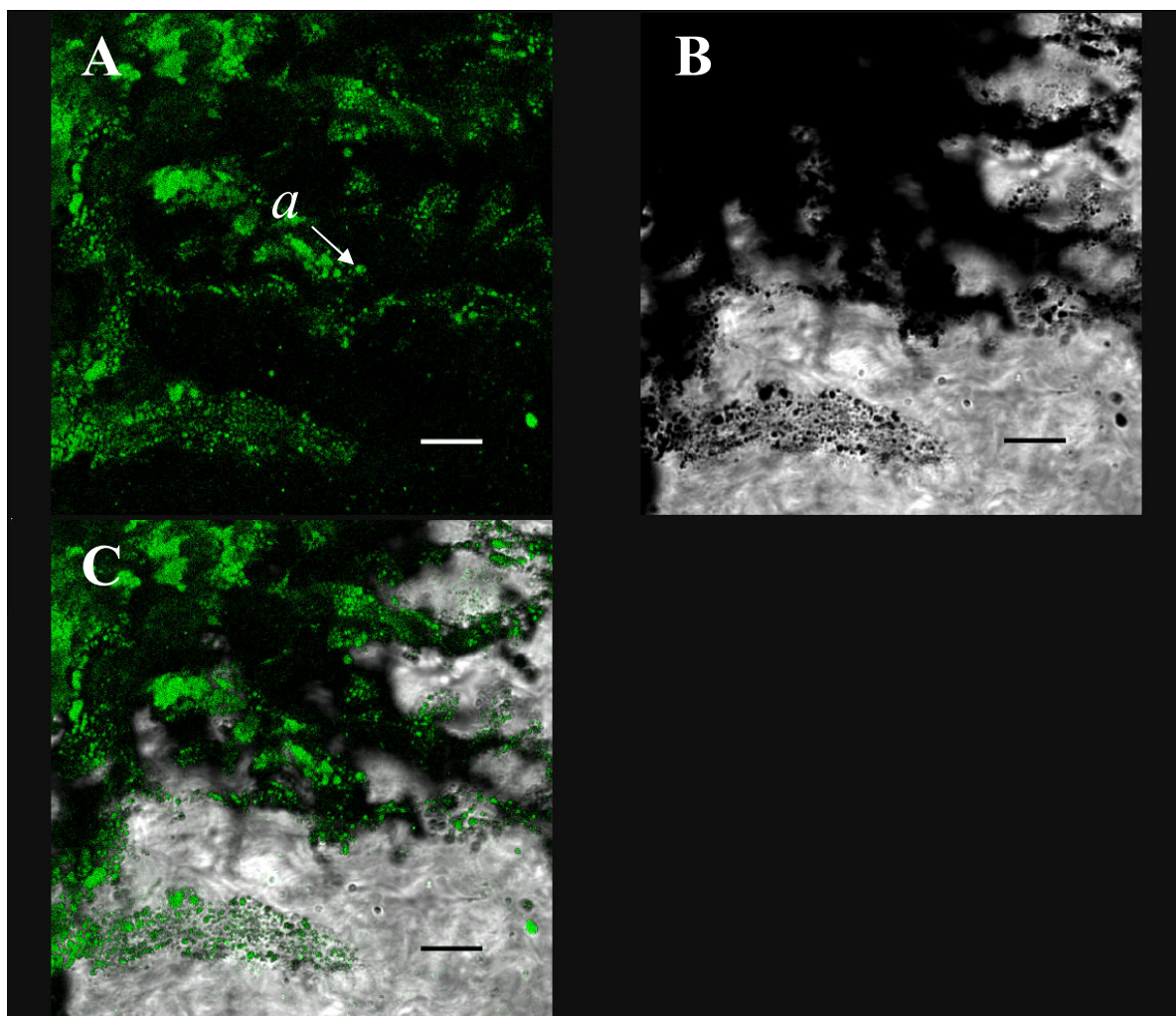


Figura 24. Micrografia de uma extensões celulares repletas de grânulos pimentares em colocalização à cinesina. (A) Anticorpo monoclonal anti-cinesina (Verde), (B) campo claro – extensões dos cromatossomos, (C) superimposição de A e B, com subtração do fundo. Sobreposição de cortes (série Z) adquirida em microscópio confocal TCS SP2. Escala=15  $\mu$ M.

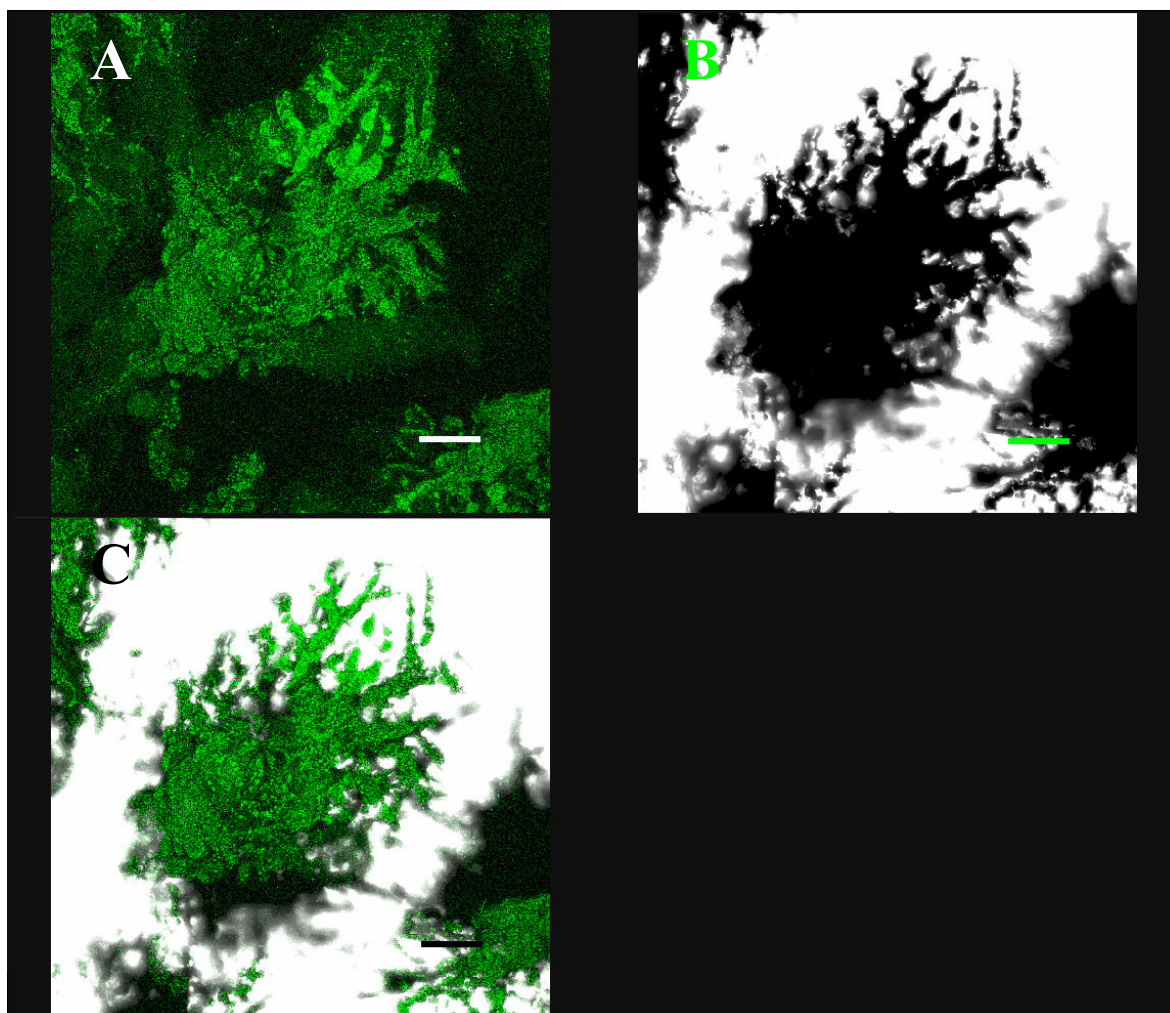
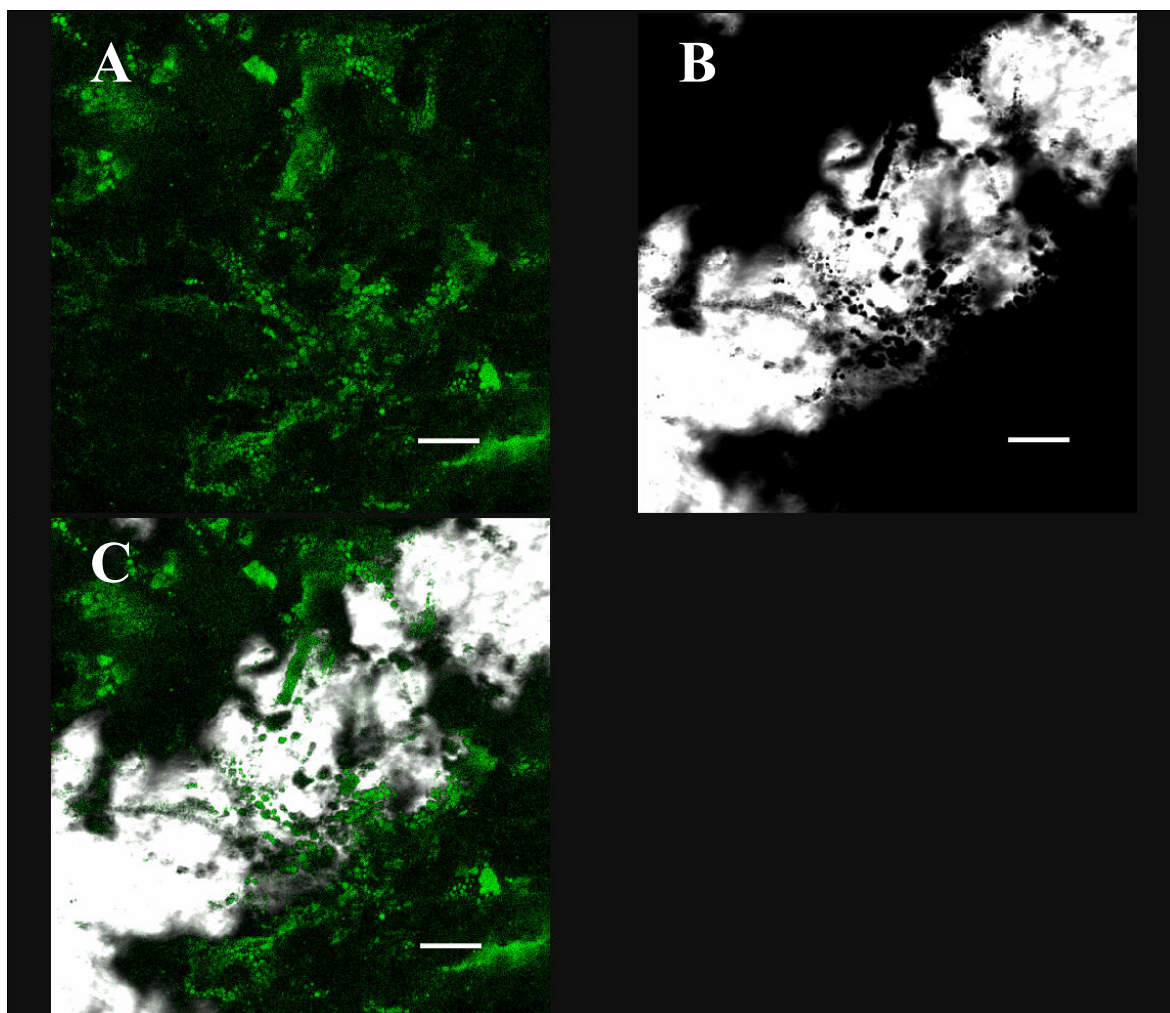


Figura 25. Micrografia de cromatossomos fixados no estado disperso, mostrando a dineína. (A) Anticorpo monoclonal anti-dineína (Verde), (B) campo claro – cromatossomo disperso, (C) superimposição de A e B, com subtração do fundo. Sobreposição de cortes (série Z) adquirida em microscópio confocal TCS SP2. Escala= 31 $\mu$ M.





**Figura 26.** Micrografia de extensões de cromatóforos com grânulos pigmentares colocados à dineína. (A) Anticorpo monoclonal anti-dineína (Verde), (B) campo claro – extensões dos cromatossomos, (C) superimposição de A e B, com subtração do fundo. Sobreposição de cortes (série Z) adquirida em microscópio confocal TCS SP2. Escala=11,6  $\mu$ M.

## 5. Discussão

Neste trabalho, evidenciamos empiricamente que o receptor do RPCH talvez seja do tipo associado à proteína G. Confirmamos que a NOS possui um papel importante na cascata de sinalização do GMPc, e que a PKG é ativada por esta cascata, constituindo um elemento fundamental na fosforilação da miosina. Investigamos parte dos mecanismos regulatórios da miosina durante a translocação pigmentar, demonstrando a participação da MLCP e da ROCK. Comprovamos a intrigante participação da miosina II não-muscular no transporte pigmentar, apesar desta miosina desprovida de sítios transportadores de carga não ser convencionalmente conhecida por esta função e aparecer em associação com o citoesqueleto. Mostramos pela primeira vez, por microscopia de fluorescência, a disposição dos microtúbulos nas extensões dos cromatóforos, e vestígios de microfilamentos de actina circundando o pigmento. Evidenciamos ainda que há cinesina, miosina e a controversa dineína em associação aos grânulos pigmentares.

### 5.1. O Receptor do RPCH

A inibição de 50% pelo AntPG da agregação pigmentar induzido por RPCH, e a subsequente dispersão espontânea sugere que o receptor do RPCH é do tipo sete passos transmembrânicos associado à proteína G.

O AntPG é um potente inibidor do receptor muscarínico ( $M_2$ ), ativado por acetilcolina, que promove hidrólise de GTP por meio de proteínas  $G_i$  e  $G_o$ . O AntPG compete com o receptor pela interação com as proteínas G por se ligar a pelo menos uma parte do domínio de ligação do receptor na proteína G, sem entretanto promover a hidrólise do GTP. O peptídeo parece interagir com proteínas  $G_i$ ,  $G_o$  e  $G_s$  com a mesma

potência, apontando que seu sítio de ligação pode incluir as subunidades  $\gamma\beta$ , comuns a todas as proteínas G (Mukai *et al.*, 1992).

Entretanto, o GDP- $\beta$ -S, um análogo não hidrolisável do GDP que competitivamente inibe a proteína G, não causou efeito significativo na agregação pigmentar induzida por RPCH.

De acordo com o modelo aceito de ativação da proteína G, esta é ativa quando seu sítio GTPásico é ocupado por GTP, e inativa quando o mesmo é ocupado por GDP. A fina regulação da quantidade de proteína G em cada fase do ciclo ativação-desativação determinaria o nível de ativação da mesma e a conseqüente intensidade do sinal transduzido ao interior celular (Gilman, 1987; Hamm, 1998). Porém, muitos experimentos na literatura mostram que proteínas  $G_s$  ou  $G_i$  podem ser ativadas mesmo na presença de GDP (Iyengar & Birnbaumer, 1979; Schneyer *et al.*, 1984; Harding & Harris, 1986; Quist *et al.*, 1992; Piacentini *et al.*, 1996; Seifert *et al.*, 1998, Hatley *et al.*, 2003; Lutz *et al.*, 2002), atentando para necessidade de revisão do paradigma de sua forma de ativação. Ugur e colaboradores (2005) revelam que o GTP e o GDP comportam-se quase identicamente em todos os aspectos, e que ao menos um deles é fundamental para a atividade do receptor.

Pode ser que, nos cromatóforos, a ligação do GDP funcione como ativador completo ou parcial da proteína G, e por isto o GDP- $\beta$ -S não exerceu efeito inibitório. Pode ser ainda, que a concentração utilizada tenha sido insuficiente para inibir a atividade da proteína G nessas células, ou que, por ser um composto altamente instável (dados técnicos da Sigma-Aldrich), as precauções tomadas durante sua preparação (ver seção 3.5.2) não tenham sido suficientes para preservar suas propriedades inibitórias. Essas são possíveis razões para explicar a observada discrepância entre os efeitos do AntPG e do GDP- $\beta$ -S.

Entretanto, a inibição por AntPG não aboliu a agregação pigmentar. A parcialidade do efeito poderia, novamente, ser atribuído da concentração utilizada, insuficiente para bloquear todos os sítios de ligação das proteínas G com receptores na membrana plasmática. Outra explicação possível seria o tempo necessário para a permeabilização e atividade do composto após o estímulo de ativação do receptor pelo RPCH. Alguns segundos requeridos para o início do efeito inibitório seria o suficiente para permitir parte do mecanismo rápido de agregação.

De acordo com Nery & Castrucci (1997), cromatóforos de teleósteos possivelmente possuem um dos tipos ou ambos os receptores  $\alpha$  e  $\beta$ - adrenérgico, já que catecolaminas desencadeiam a agregação pigmentar, exceto em iridóforos (Maeno & Iga, 1992).

A melanopsina, receptor fotossensível que medeia a migração de melanossomos em *Xenopus leavis* é do tipo acoplado a proteína G (Provencio *et al.*, 1998; Hermans, 2003), e pode acoplar-se a mais de uma classe de proteína G sob certas circunstâncias (Melyan *et al.*, 2005). Segundo Nery & Castrucci (1997) e Nilsson (2000), o substrato de fosforilação requerido para a dispersão pigmentar em melanóforos de anfíbios e répteis pode ser catalizado tanto pela PKA como pela PKC e propõe-se que a ativação do receptor acoplado à proteína  $G_i$ , que inibe a adenilato ciclase, leva à inativação da PKA.

Em *Macrobrachium olfersi*, acredita-se que a proteína G envolvida não seja do tipo estimulatória da adenilato ciclase ( $G_s$ ), já que o AMPc não é um importante nucleotídeo cíclico envolvido na agregação pigmentar como o GMPc e o  $Ca^{2+}$ . A toxina do cólera, ativadora da proteína  $G_s$ , inibe parcialmente a agregação pigmentar em *M. olfersi* (Bell, 2008). Segundo Ribeiro & McNamara (1997), o dbAMPc causa uma agregação lenta e parcial em cromatóforos com o pigmento disperso, sugerido como resultado de uma interação não-específica do AMPc como final da cascata do  $Ca^{2+}$ ; por exemplo, a PKA,

ativada pelo AMPc poderia fosforilar a mesma proteína substrato que a PKC ou a cinase  $Ca^{2+}$ /calmodulina. O AMPc não causa a dispersão pigmentar em cromatóforos com o pigmento agregado pelo RPCH (Ribeiro, 1998), o que sugere que a ativação de uma proteína G inibitória ( $G_i$ ) tampouco seja importante na ação do RPCH. Entretanto, o AMPc desencadeia a dispersão pigmentar em muitos crustáceos como *Palaemonetes* (Fingerman *et al.*, 1968; Fingerman, 1969), *Macrobrachium potiuna* (Nery *et al.*, 1997) e braquiúros (Lambert & Crowe, 1976; Quackenbush, 1981), deixando em aberto a possibilidade de que a proteína  $G_i$  seja o ligante do receptor do PCH em muitos crustáceos.

Em células *chromaffin*, a proteína  $G_0$  controla a secreção granular por modificação da rede de actina cortical por meio de uma seqüência de eventos que eventualmente envolve a proteína Rho (Gasman *et al.*, 1997). Esta proteína parece ser um componente integral da via de sinalização que leva à distribuição do citoesqueleto necessária à secreção (Gasman *et al.*, 1998). É possível que o receptor do RPCH seja acoplado à proteína  $G_0$  em cromatóforos de *M. olfersi*, embora muita investigação seja necessária para alguma conclusão.

A transdução de sinal induzida pelo hormônio AKH da família AKH/RPCH também procede da ativação de receptor acoplado à proteína G, dependente da presença de cátions divalentes como o  $Ca^{2+}$  no meio extracelular (Ziegler *et al.*, 1995). A sinalização desenrola-se de forma altamente relacionada, envolvendo AMPc,  $Ca^{2+}$ , inositol fosfatos (InsPn), com sinalização em *crossstalk*. A co-existência de diversos hormônios com elevada similaridade estrutural e funcional é intrigante. Tem-se sugerido que a multiplicidade de neuropeptídeos observados em invertebrados possibilita que sistemas nervosos simples realizem complexas sinalizações químicas e ampliem sua

capacidade de processar informações (Geraerts & Smit, 1991; Geraerts *et al.* 1992; Nässel, 1996; Van der Horst *et al.*, 1999).

È possível que outros tipos de receptor estejam envolvidos nos mecanismos de sinalização que controlam a translocação pigmentar em *M. olfersi*. A inibição de receptores de glutamato não-NMDA pelo CNQX afeta a agregação pigmentar em 25%, indicando que estes receptores poderiam participar da ação do mecanismo de agregação ou que haja um efeito inespecífico deste composto. A estimulação dos mesmos pelo AMPA induz significativa dispersão pigmentar e não afeta a agregação. Esse resultado inspira uma interpretação diferente, de que o receptor de glutamato não-NMDA estaria envolvido com o mecanismo de dispersão pigmentar. Assim, o envolvimento deste tipo de receptor permanece obscuro, e o estudo mais aprofundado do papel deste e de outros tipos de receptores na translocação pigmentar é necessário para a compreensão do mecanismo de transdução de sinal.

## **5.2. A cascata de sinalização do GMPc**

A inibição da óxido nítrico sintase pelo L-NAME reduz a agregação pigmentar induzida pelo RPCH em 40%, confirmando a participação desta enzima na cascata que leva à produção de GMPc. Este segundo mensageiro, fundamental para a agregação pigmentar em cromatóforos ovarianos *M. olfersi* é nessas células catalisado por um receptor guanilil-ciclase citosólico (GC-S) (Ribeiro & McNamara, 2009). Isso foi demonstrado a partir da estimulação com nitroprussiato de sódio (SNP) e 3-morfolinosidnonimina (SIN-1), que induzem por si 40% de agregação pigmentar com a cinética tipicamente induzida pelo RPCH (Ribeiro & McNamara, 2009). Também foi evidenciada pela inibição com zinco protoporfirina IX (ZnPPIX) e 6-anilino-5,8-quinolinediona (LY83583), que inibem a agregação induzida pelo RPCH em 30% e

afetam a velocidade na fase rápida de translocação (Ribeiro & McNamara, 2009). Não há produção de GMPc por receptor guanilil ciclase na membrana, como demonstrado pela estimulação sem efeito da guanilil ciclase de membrana com enterotoxina de *Escherichia coli* (Sta) (Ribeiro & McNamara, 2009).

A GC-S é ativada pelo NO, gerado pela NOS que pode ser tanto induzida ou constitutivamente regulada pela  $Ca^{2+}/CaM$  (Ignarro, 1990; Lowenstein and Snyder, 1992), um dos possíveis pontos de *cross talk* em que a informação flui entre as cascatas de  $Ca^{2+}$  e GMPc, regulando a atividade da GC-S (Ribeiro & McNamara, 2009).

O NO induz dispersão pigmentar em cromatóforos pretos do caranguejo *Chasmagnathus granulata*, assim como em resposta à radiação UV (Gouveia *et al.*, 2004). A dispersão pigmentar induzida por UVA em melanóforos de *C. granulata* é aparentemente dependente apenas da ativação da NOS. O L-NAME também reduz a dispersão induzida por UVB nesta espécie (Gouveia *et al.*, 2004). Seu efeito é similar em porco da Guiné, inibindo a melanogênese induzida por UVB (Horikoshi *et al.*, 2000), além de reduzir o conteúdo de melanina na pele, essencial para a hiperpigmentação. A NOS parece estar associada à indução da dispersão pigmentar por sinalização UV em alguns crustáceos (Vargas *et al.*, 2008), o que poderia ser uma resposta importante de proteção contra seus efeitos danosos (Gouveia *et al.*, 2004).

O NO induz agregação em melanóforos de anfíbios, o que parece envolver a PKC e a cinase regulada por sinal extracelular 1 (ERK1), entre outras (Nilsson *et al.*, 2000, 2001) e dispersão em melanóforos de peixes (Hayashi & Fujii, 2001). O L-NAME, assim como o ODQ, um inibidor da GC-S, reduz a agregação pigmentar em melanóforos de *Xenopus laevis* (Nilsson *et al.*, 2000). O NO também parece afetar diretamente diversas proteínas do citoesqueleto nesses anfíbios (Nilsson *et al.*, 2000; Clancy *et al.*, 1993, 1995; Forslund *et al.*, 2000).

Esses resultados sugerem que o NO seja um agonista cromatoforoatrópico em diversos animais (Vargas *et al.*, 2008) fortemente evidenciando que as mesmas vias de sinalização ativam motores moleculares em diferentes taxons, de vertebrados e invertebrados (Ribeiro & McNamara, 2009).

A inibição da PKG pelo rp-sGMPC-trietilamina impede que a agregação pigmentar induzida pelo RPCH se complete. Aparentemente, o início do movimento de agregação ocorre normalmente, já que a velocidade da fase rápida não é alterada; no entanto a agregação é bruscamente bloqueada a partir de 12 minutos. Isso leva a crer que a PKG pode estar envolvida na fosforilação de proteínas importantes que culminam na movimentação dos grânulos pigmentares pela miosina, e por isso sua inativação interrompe a translocação, e leva à dispersão espontânea na presença do hormônio. A observação clara de que a fase rápida ocorre normalmente e que a fase lenta é completamente bloqueada constitui em evidência adicional de que motores moleculares diferentes estejam envolvidos nas duas fases do mecanismo de agregação, como hipotetizado por Boyle & McNamara (2006).

Na literatura há poucos estudos sobre a participação da PKG em mecanismos de translocação pigmentar. Bell *et al.*, (2005), usando os inibidores inespecíficos H8 e H9, com maior afinidade pela PKA do que pela PKG, não obteve inibição significativa. Nilsson *et al.* (2000) propõe a participação da PKG durante a agregação pigmentar em *Xenopus laevis* pela desativação da PKC, que induz dispersão. Entretanto, a tentativa de inibição direta da PKG com KT5283 neste anfíbio não afetou a translocação.

O papel dos canais de K<sup>+</sup> na transdução de sinal do RPCH foi evidenciado por Milograna *et al.* (2010). Um dos papéis da PKG poderia ser a regulação desses canais, como ocorre em oócitos de *Xenopus* (Sakuta *et al.*, 1993; 1994), células pancreáticas  $\beta$



(Ropero *et al.*, 1999), músculo vascular liso (Kubo *et al.*, 2004) e miócitos cardíacos (Han *et al.* 2001; 2002; Chai & Lin, 2008).

### **5.3. A regulação da miosina durante a translocação pigmentar**

A manutenção da cadeia leve da miosina no seu estado fosforilado, pela inibição da MLCP com a cantaridina, parece alterar a atividade bioquímica da miosina. Mantida no estado fosforilado, a cadeia leve parece acelerar o deslizamento das cadeias pesadas da miosina pelos filamentos de actina, já que há um aumento significativo da velocidade de agregação. No entanto, a translocação induzida pelo RPCH não se completa, indicando alguma disfunção fisiológica gerada pela inibição de um elemento regulatório importante. É intrigante que as cadeias permanentemente fosforiladas causem tamanha aceleração do pico de agregação, já que tem sido sugerido que a miosina seja um importante motor molecular dos grânulos na fase lenta (McNamara & Ribeiro, 1999; Boyle & McNamara, 2006) e que a inibição da PKG, suposta reguladora direta da MLCP, só afeta a fase lenta.

O efeito gerado pela inibição da MLCK não está claro. Sua inativação pelo ML-7 não afetou a velocidade da translocação pigmentar, mas causou um ligeiro efeito de inibição da fase final do mecanismo. Aparentemente, esta cinase não tem uma função significativa neste sistema.

As concentrações de ML-7 utilizadas para inibir a MLCK em diferentes sistemas variam em torno de 10  $\mu\text{M}$  ou menos: 4,6  $\mu\text{M}$  para  $\text{IC}_{50}$  em células pulmonares de ratos (Wang *et al.*, 2007); 5  $\mu\text{M}$  em miócitos do íleo de roedores (Kim *et al.*, 2007); 100 nM em células endoteliais renais (Wu *et al.*, 2009); 8  $\mu\text{M}$  em epitélio intestinal de mamífero (Yang *et al.*, 2007). Esses dados sugerem que a concentração de 10  $\mu\text{M}$  utilizada seria suficiente para causar a inibição da MLCK em cromatóforos.

A MLCK não está envolvida na modulação da atividade da miosina em todos os tipos celulares. Por exemplo, não tem papel na mobilidade de vesículas sinápticas no Sistema Nervoso Central (Tukuoka & Goda, 2006). A cinase Rho, um importante efetor tardio da ativação da RhoA em músculo liso, é um dos reguladores críticos da MLCP, que influencia diretamente no estado de fosforilação da MLC (Uehata *et al.*, 1997; Wettschureck & Offermanns, 2002).

A inibição da ROCK pelo Y-27632 e, principalmente, mais especificamente pelo H-1152, impede a agregação pigmentar completa, embora sem afetar a velocidade de agregação da fase rápida como na inibição da MLCP, hipotético regulador oposto do mesmo sítio na miosina. Esses inibidores também parecem acelerar a dispersão pigmentar. Esses resultados apóiam a idéia de que a fosforilação da MLC pela ROCK impulsiona a agregação pigmentar e corroboram que a miosina seja o motor molecular principalmente em sua fase lenta (McNamara & Ribeiro, 1999; Boyle & McNamara, 2006).

Embora o Y-27632 tenha sido comumente utilizado em estudos das funções de ROCK, tem sido mostrado que ele também inibe outras proteínas cinases (Shao *et al.*, 2008), incluindo a proteína cinase relacionada à proteína cinase C (PRK-2), na mesma concentração (Davies *et al.*, 2000). O efeito reduzido em relação ao efeito do H-1152 pode ser devido à sua menor especificidade.

O envolvimento das proteínas cinases e fosfatases da MLC na translocação pigmentar não foram até hoje muito investigados. Foi demonstrado por Barsoum & King-Smith (2007) que a inibição da ROCK por H-1152 inibe parcialmente a agregação de melanossomos mediada por AMPc em epitélio pigmentar retinular (RPE) de peixe.

#### **5.4. Os motores moleculares e a translocação dos grânulos de pigmento pelo citoesqueleto**

##### **5.4.1. A miosina**

A participação da miosina de forma geral na fase lenta da agregação em *M. olfersi* já havia sido demonstrada pela inibição da miosina ATPase com butanedione monoxime (McNamara & Ribeiro, 1999). A inibição da miosina II não-muscular com blebistatina aqui afetou fortemente o mecanismo de agregação pigmentar, evidenciando que esta classe específica de miosina está presente e funcionalmente envolvida na translocação pigmentar. Seu bloqueio funcional reduziu de forma geral a velocidade de agregação, embora o pico da fase rápida não seja diferente do RPCH-controle, e impediu aproximadamente 50% da agregação. A possibilidade da presença da miosina II nos cromatóforos já havia sido sugerida Boyle & McNamara (2006) que evidenciaram por *Western Blot* uma banda de peso molecular próximo aos pesos da miosina II ou XII nos cromatóforos ovarianos de *M. olfersi*. Porém, em ensaios *in vitro*, anticorpos anti-miosina II não-muscular não afetam a agregação induzida por RPCH nestas células, embora anticorpos anti-miosina esquelética e muscular afetem (Boyle, 2005).

A concomitância de efeitos na agregação pigmentar das inibições da miosina II não-muscular e da PKG sugere que esta proteína cinase tenha função de ativar a miosina. Esses resultados também mostram que esta miosina não é o único motor molecular envolvido a agregação, já que a inibição foi de 50%. Outros motores moleculares podem estar envolvidos na fase rápida do movimento, já que o período final da agregação é o mais afetado; ou mesmo associados a um tipo de grânulo pigmentar diferente.

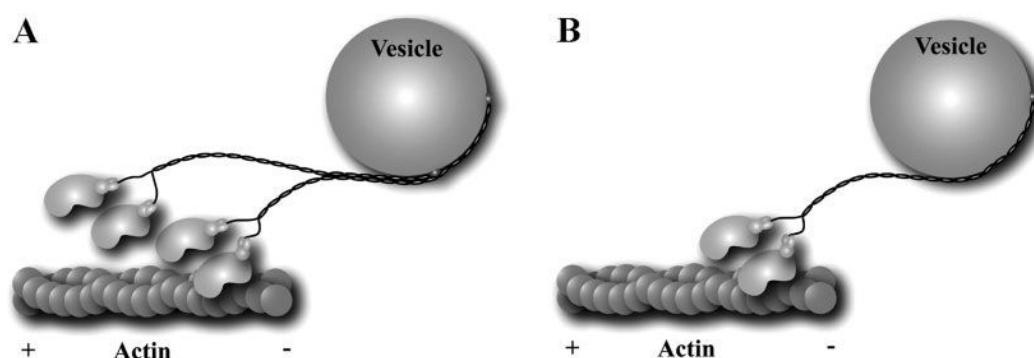
A inibição da miosina II não-muscular por blebistatina também leva à inibição parcial da agregação de melanosomas em epitélio pigmentar retinular (RPE) de peixes (Barsoum & King-Smith, 2007).

A miosina II não-muscular também foi claramente evidenciada aqui por microscopia de fluorescência, aparentemente em associação com o citoesqueleto, localizada em áreas que vão além das preenchidas por pigmentos nas marcações. Boyle (2005), não obteve sucesso na marcação desta classe de miosina com o mesmo anticorpo primário, embora com o uso de FITC em vez de Alexa-488 e alguns detalhes de preparação diferentes, o que pode ser a causa da discrepância entre os resultados.

A miosina II não-muscular foi considerada por muito tempo como não processual, ou seja, incapaz de ligar-se a cargos, por não possuir sítios tradicionais de ligação de cargos na cauda (Rosenfeld *et al.*, 2003). Em cromatóforos epidérmicos e do cordão nervoso dos camarões de poças-de-maré *Palaemon affinis* e *P. northropi*, e em cromatóforos ovarianos vermelhos de *M. olfersi*, os grânulos de pigmentos são ligados a uma rede extensa de REL em cisternas que impedem seu transporte independente (McNamara, 1980; McNamara & Sesso, 1982), assim como ocorre em peixes (Taylor, 1992). Formam uma estrutura única que exhibe propriedades elásticas, a massa pigmentar (McNamara & Ribeiro, 1999). Boyle & McNamara (2008) propuseram que a massa pigmentar comporta-se como uma mola intracelular, movimentada alternadamente por miosina e a cinesina, que armazena uma força passiva liberada durante a fase rápida da translocação pigmentar. Considerando-se essas características, é possível sugerir que movimento pigmentar ocorra por contratilidade. A miosina II não-muscular é bem conhecida por contrair a actina em diversas células (Maupin *et al.*, 1994; Sandquist *et al.*, 2006; Licht *et al.*, 2010).

Entretanto, o papel da miosina II não-muscular como transportadora de vesículas foi descrito recentemente, embora seu mecanismo de transporte ainda não tenha sido plenamente elucidado. Alguns tipos possuem um incomum domínio na cauda que expande seu arsenal de atividades, primeiramente demonstrado no transporte de oócitos de molusco (De Pina *et al.*, 2007). As miosinas II não-musculares são encontradas em associação a membranas em outros estudos (Costa *et al.*, 1999; Miller & Sheetz, 2000; De Giorgis *et al.*, 2002; Fath, 2005; Li *et al.*, 1994; De pina *et al.*, 2007), e de forma estável a vesículas isoladas de cérebro de galinha (Miller & Sheetz, 2000). No entanto, é curioso que a miosina II não-muscular aqui marcada aparentemente esteja associada ao citoesqueleto e não aos grânulos.

Um modelo foi sugerido no qual a miosina II não-muscular possui na cauda uma porção homóloga a receptores nos cargos, que se tornam sítios de ligação com os mesmos (De Pina *et al.*, 2007). Sugerem que (a) a miosina II forme dímeros, cuja cauda interage diretamente com a superfície das membranas e as cabeças acopladas aos filamentos produzam múltiplos passos seqüenciais, em que o segundo motor/domínio cabeça acopla-se antes que o primeiro motor seja liberado (Fig. 27A); ou que (b) uma



**Figura 27.** Dois modelos que ilustram a interação do domínio cauda da miosina II não-muscular com a superfície de vesículas, e o domínio motor que se liga ao filamento de actina. (A) A miosina forma dímeros. (B) Cada molécula de miosina liga-se independentemente (De Pina *et al.*, 2007).

única molécula de miosina II realize múltiplos passos antes de ser liberada do filamento (Fig. 27B) (De Pina *et al.*, 2007).

A miosina inespecificamente marcada com anticorpo anti-miosina muscular e esquelética foi evidenciada nas áreas coincidentes com as ocupadas por grânulos de pigmento. Esse achado corrobora o de Boyle & McNamara (2009), que demonstraram associação estável da miosina marcada pelo mesmo anticorpo a grânulos de pigmento vermelho de cromatóforos de *M. olfersi*. Como já dito, a localização difere da marcação específica para miosina II não-muscular, sugerindo o envolvimento de mais de uma classe de miosina na agregação pigmentar.

#### **5.4.2. Os microfilamentos de actina**

A presença de microfilamentos de actina dentro de cromatóforos foi demonstrada por Ribeiro & McNamara (2001) por microscopia eletrônica. A visualização por microscopia de fluorescência, útil para maior compreensão de sua disposição e localização em relação aos grânulos pigmentares, foi ensaiada em estudos anteriores nesta linha de pesquisa (Boyle, 2005; Bell, 2008). A identificação da actina dentro dos cromatóforos tem sido difícil já que o tecido da cápsula fibrosa do ovário possui este componente do citoesqueleto em abundância, sobrepondo-se às marcações no interior celular. Aqui, é possível visualizar em alguns trechos de nossas marcações que microfilamentos de actina acompanham feixes de pigmento, evidenciando-se como trilhos de transporte dos mesmos.

A participação do sistema miosina-actina na translocação pigmentar já é bem estabelecida. Além da participação da miosina anteriormente descrita, a citocalasina B, que impede a polimerização da actina, inibe a agregação pigmentar induzida por RPCH em camarões carídeos (Robison & Charlton, 1973; Fingerman *et al.*, 1975; Lambert &

Fingerman, 1978; Tuma *et al.*, 1995; McNamara & Ribeiro, 1999) e a agregação espontânea em caranguejos braquiúros (Lambert & Crowe, 1973; 1976). Porém, a estabilização dos filamentos de actina pela Faloidina não interfere na agregação pigmentar induzida por RPCH (Bell, 2008).

### 5.4.3. Os microtúbulos

A presença de microtúbulos nos cromatóforos de crustáceos já foi demonstrada antes. McNamara (1980) mostrou por microscopia eletrônica a presença de microtúbulos em cromatossomos de *Palaemon affinis* dispersos, em orientação paralela ao longo do eixo longitudinal. Boyle (2005) realizou marcação de cromatossomos agregados com o mesmo anticorpo anti- $\beta$ -tubulina usado neste trabalho, mas associado a FITC, e sugeriu ter evidenciado tubulina despolimerizada em cromatossomos com o pigmento agregado. Aqui, pela primeira vez, demonstra-se claramente por microscopia de fluorescência a disposição dos microtúbulos em feixes que vão do centro à periferia do cromatossomo, inclusive com o pigmento agregado, e portanto que este componente constitui o citoesqueleto celular independentemente da posição do pigmento.

Entretanto, o papel funcional dos microtúbulos na translocação pigmentar é bastante controverso. A colchicina, que despolimeriza os microtúbulos, não inibe a agregação induzida por RPCH ou pelo A23187 em *M. olfersi*, mas causa uma agregação parcial dos cromatossomos no estado disperso (McNamara & Ribeiro, 1999). Este composto inibe a agregação pigmentar em cromatóforos de *Palaemonetes vulgaris* apenas em elevadas concentrações (25 mM) (Robinson & Charlton, 1973; McNamara, 1980). Este efeito, entretanto, é atribuído a interações inespecíficas, já que, na mesma concentração, a lumicolchicina, um derivado da colchicina que não interage com microtúbulos, também inibe a agregação espontânea em cromatóforos vermelhos de *Uca*

*pugillator* (Fingerman *et al.*, 1975; Lambert & Fingerman, 1976) e afeta a agregação induzida por RPCH em *M. potiuna* (Tuma *et al.*, 1995). A estabilização dos microtúbulos por Taxol induz por si agregação pigmentar parcial, e diminui a velocidade da agregação induzida por RPCH em *M. olfersi* (Bell, 2008).

#### 5.4.4. A cinesina e a dineína

O papel dos motores moleculares associados a microtúbulos também não foi de todo esclarecido. A cinesina e a dineína foram aqui evidenciadas por microscopia de fluorescência em associação com os grânulos de pigmento.

A cinesina em associação estável aos grânulos de pigmento, obtida por homogeneizado de cromatossomos ovarianos de *M. olfersi*, foi mostrada por Boyle & McNamara (2006) e sugerida como motor molecular da dispersão. A dineína, entretanto, só aparece em associação aos grânulos 6-7 dias após a preparação e armazenamento a 4°C, o que é explicado por Boyle (2005) como decorrente de uma separação de pigmentos, similar ao que ocorre em cromatografia, após o que o sinal fluorescente da dineína seria detectado em colocalização com o componente amarelo do pigmento.

A análise por *Western Blot* realizada por Ribeiro & McNamara (2000) gerou resultados não conclusivos sobre a presença da dineína em cromatossomos de *M. olfersi*: a partir da utilização de um anticorpo específico monoclonal anti-cadeia intermediária da dineína, foi revelada uma banda única e bem definida, com peso molecular de 150 kDa, maior que o peso descrito de 74 kDa para esta cadeia (Hirokawa, 1998, Rogers *et al.*, 1999). A autora sugere que a banda encontrada em elevada definição, mas com maior peso molecular, possa indicar a presença de uma aloforma da dineína. Os dados fisiológicos também são obscuros, já que o EHNA, inibidor específico da dineína ATPase induz agregação pigmentar de 30% por si, e também inibe em cerca de 20% a



agregação pigmentar induzida por RPCH em *M. olfersi*, afetando significativamente sua fase rápida (Ribeiro, 2002); mas o metavanadato de sódio, um inibidor inespecífico da dineína ATPase, não afeta a agregação induzida por RPCH (McNamara & Ribeiro, 1999), como ocorre em peixes (Beckerle & Porter, 1982; Oshima *et al.*, 1990; Rodionov & Borisy, 1997).

#### **5.4.5. Interações complexas entre motores moleculares e o citoesqueleto**

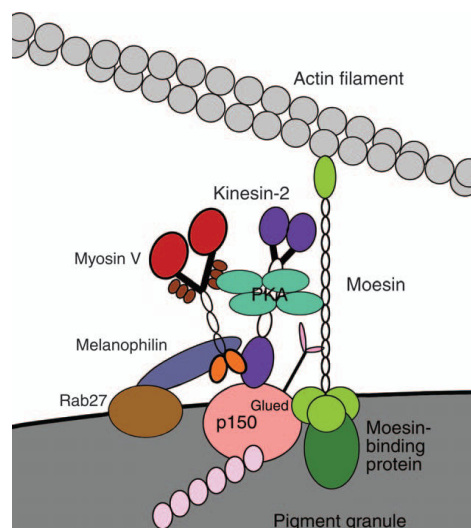
A idéia da participação de diversos motores moleculares na translocação pigmentar é antiga e sustentada por muitas evidências: (i) em crustáceos, pigmentos em cromatóforos monocromáticos que constituem cromatossomos policromáticos migram simultaneamente em direções opostas (McNamara, 1981); (ii) em cromatossomos ovarianos de *M. olfersi*, a presença de dois tipos de grânulos pigmentares diferentes, nitidamente separados quando no estado agregado, porém sem barreira física (Ribeiro, 1998) e (iii) a velocidade bifásica de transporte, exibindo componentes rápidos e lentos (McNamara & Ribeiro, 1999).

Associações funcionais entre proteínas motoras baseadas em microtúbulos e actina e grânulos pigmentares têm sido descritas em cromatóforos de uma grande variedade de espécies animais, incluindo peixes e anfíbios (Gross *et al.*, 2002; Rodionov *et al.*, 1998). Segundo Tuma & Gelfand (1998), está claro agora que os microtúbulos cooperam com os filamentos de actina no transporte de melanossomos, pelo menos em muitos tipos celulares.

A descoberta de interações complexas entre diferentes motores moleculares, e de relações não convencionais destes com o citoesqueleto, tem sido cada vez mais comum. A miosina IIA tem papel de acoplar os sistemas de actina e de microtúbulos do citoesqueleto e promove a dinâmima de microtúbulos (Even-Ram *et al.*, 2007). A cauda

da miosina V tem um sítio de interação com a cadeia pesada da cinesina, bastante conservado, presente em *Drosophila* e mamíferos (Huang *et al.*, 1999). Diferentes subunidades dos motores moleculares podem acoplar-se a diferentes receptores em cargos ou a proteínas acessórias (Karcher *et al.*, 2002).

A moesina e outras proteínas são conhecidas por ligar a membrana plasmática ao citoesqueleto de actina no citoesqueleto cortical (Stevens *et al.*, 2006). As proteínas ancoradores de cinase A (AKAPs) associam enzimas como a PKA aos grânulos de pigmento, criando pontos focais que direcionam e amplificam a transdução de sinal do AMPc (Wong & Scott, 2004; McConachie *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006). Semenova e colaboradores (2009) sugerem que, na dispersão pigmentar em *Xenopus laevis*, a moesina ancora a PKA na superfície dos grânulos pigmentares, direcionando sua ligação à cinesina II e à miosina V e também liga os grânulos pigmentares aos microfilamentos de actina (Fig 28).



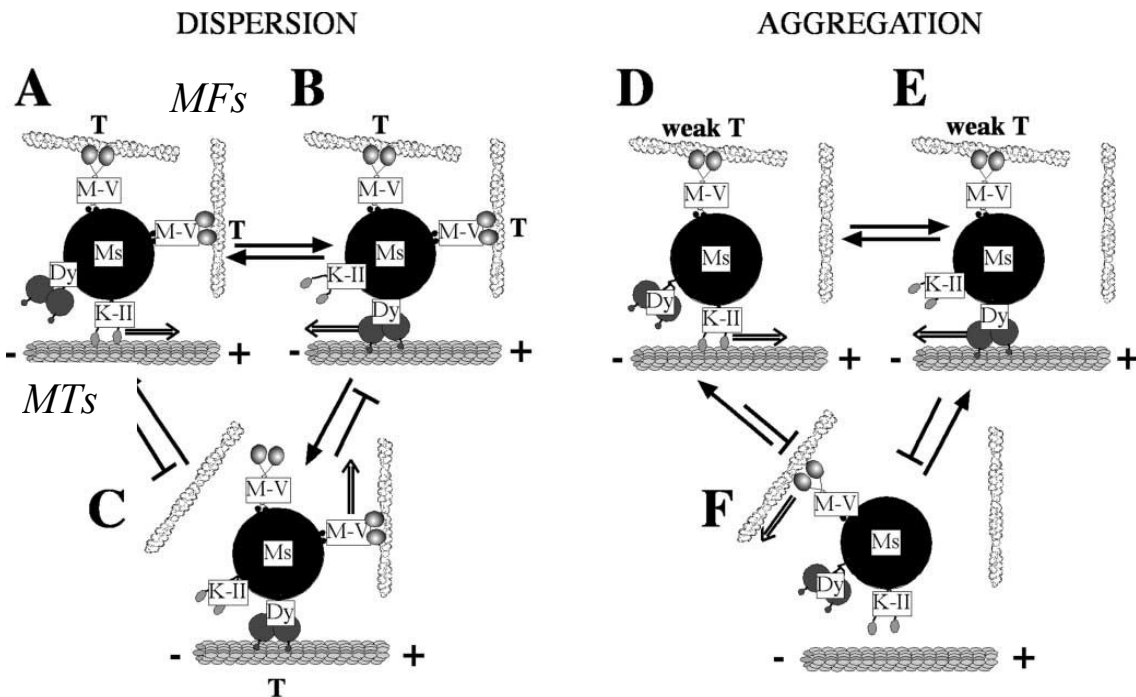
**Figura 28: Hipótese sobre a complexa interação entre cinesina II, miosina V e actina com os grânulos de pigmento durante a dispersão pigmentar em *Xenopus* por meio de proteínas acessórias. A moesina tem um papel duplo de ancorar a PKA à unidade motora (cinesina II + miosina V) e de ligar os grânulos de pigmento à actina, facilitando seu transporte (Semenova *et al.*, 2009)**

Neste anfíbio, a agregação pigmentar ocorre ao longo de microtúbulos. A cinética no transporte pigmentar é finamente regulada por mudanças na concentração intracelular de cAMP (King & Schroer, 2000; Kincaid & King, 2006). Durante a agregação

pigmentar, a queda nos níveis de AMPc ativa a dineína (Ali *et al.*, 2008). Durante a dispersão, o rápido aumento de AMPc resulta na ativação da cinesina II e da miosina V e na desativação da dineína, e depois decresce gradualmente levando à redução da atividade da cinesina II sem afetar a atividade da miosina V, resultando no predomínio do movimento baseado em actina no final da dispersão (Kincaid & King, 2006). Este processo requer a mudança entre trilhos de citoesqueleto. A miosina V navega em intersecções de actina e difunde-se em busca de microtúbulos, através de uma interação eletrostática entre a cabeça de miosina V e a tubulina E-hook negativamente carregada. Na actina, a cinesina também aumenta o alcance da miosina V (Ali *et al.*, 2008). Ali e colaboradores (2008) propuseram que ambos os motores agem reciprocamente como correntes para o outro quando ligados ao mesmo cargo, impedindo sua dissociação do citoesqueleto quando uma trilha de microtúbulos ou microfilamentos termina e aumentando a processividade do transporte. Devido à superfície menor em densidade de cargas da actina, cujo diâmetro é de 7 nm, enquanto que os microtúbulos têm 25 nm, uma única cinesina não é capaz de se difundir pelos microfilamentos. Múltiplas cinesinas podem capturar eficazmente um filamento de actina a partir de uma interação dependente da força iônica. É razoável que ambos a miosina V e a cinesina se acoplem ao mesmo cargo *in vivo* (Ali *et al.*, 2008).

A razão pela qual um único cargo requeira dois tipos de transporte não está clara. Uma hipótese atrativa é a de que microtúbulos são usados para transporte de longa distância, enquanto que os trilhos de actina são mais importantes à distribuição local, em locais não acessíveis aos microtúbulos (Langford, 1995). Outros estudos sugerem que ambos os sistemas trabalham simultaneamente, engajados como em um “cabo-de-guerra” onde cada classe de motor tenta mover ao longo de seu respectivo polímero. O

resultado desta competição é a modulação recíproca entre as duas vias de transporte (Fig. 29; Gross *et al.*, 2008).



**Figura 29.** Modelo de transporte de melanossomos por motores moleculares de microfilamentos de actina (MFs) e microtúbulos (MTs) em *Xenopus*. Uma organela pode ser movida ao longo de microtúbulos pela cinesina II (A e D) ou dineína (B e E), ou ao longo de filamentos de actina pela miosina V (C e F). Os motores de microtúbulos sempre vencem no “cabo-de-guerra” com a miosina V. Gross *et al.*, 2008.

A partir destes recentes estudos (Evem-Ram *et al.*, 2007; Ali *et al.*, 2008; Gross *et al.*, 2008; Semenova *et al.*, 2009) sabe-se que interações extremamente complexas ocorrem na translocação pigmentar em sistemas de vertebrados, envolvendo diversas proteínas acessórias, modulações recíprocas entre motores moleculares, e a participação de motores tradicionalmente associados aos microtúbulos, como a cinesina, em transporte ao longo dos microfilamentos de actina.

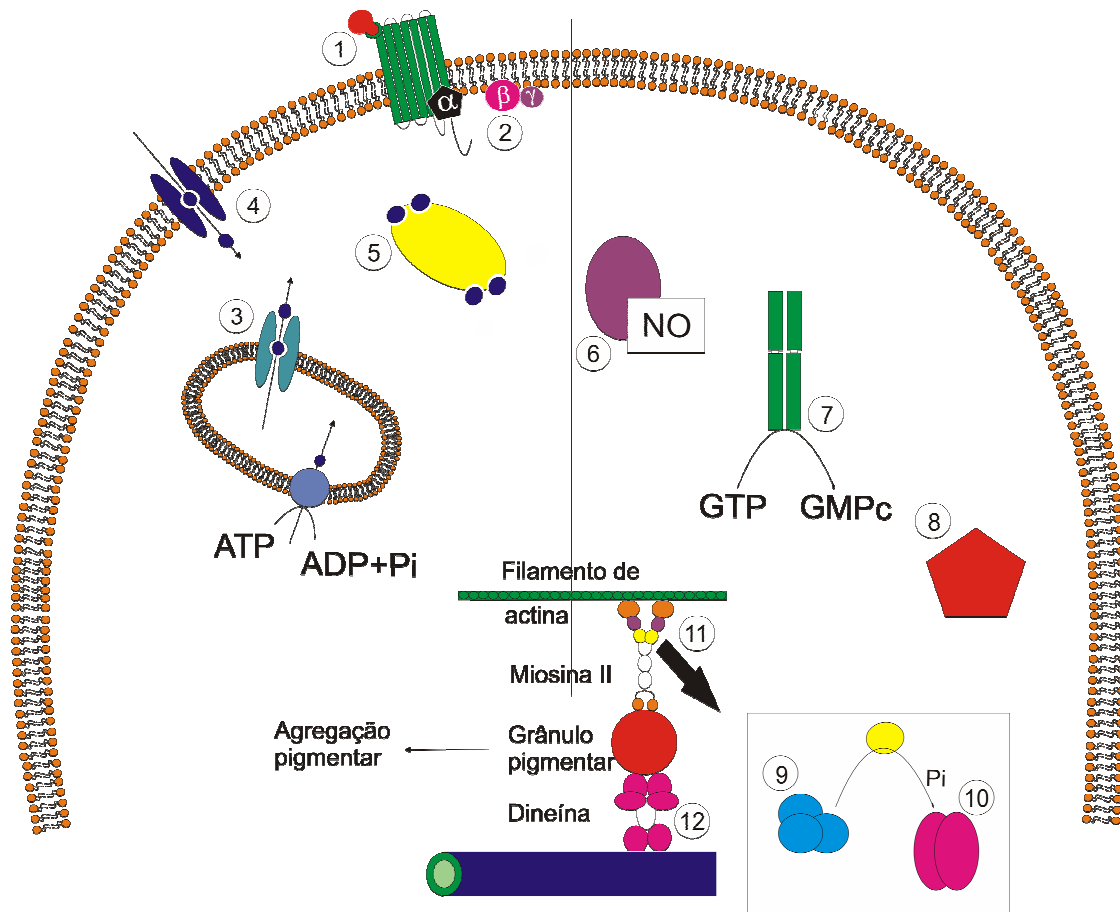
Em posse dessa noção, sabe-se que muita investigação será necessária para que entendamos o mecanismo de translocação pigmentar em crustáceos. O presente trabalho

identifica a miosina II não-muscular como um dos motores da agregação pigmentar em cromatóforos de *M.olfersi*, que poderia ocorrer por contratilidade da actina e movimentação da massa pigmentar como um todo, ou transporte por acoplamento direto aos grânulos pigmentares. Evidencia que outra classe de miosina pode estar envolvida na translocação, já a miosina II não-muscular parece estar associada ao citoesqueleto, mas a marcação inespecífica de miosinas evidencia uma associação aos grânulos. E mostra a presença de dineína, até então não claramente evidenciada, também em associação aos grânulos, assim como a cinesina.

A partir desses achados, sugere-se que na agregação pigmentar: (i) a dineína, atuaria principalmente na fase rápida de agregação ao longo dos microtúbulos, e após o primeiro momento a miosina II não-muscular buscaria e se associaria aos grânulos, tracionando-os ao longo dos microfilamentos de actina; ou (ii) a miosina II não-muscular realizaria a contração repentina da actina imediatamente após o acoplamento do RPCH na membrana, produzindo o efeito mola, e a fase lenta da agregação continuaria, por associação entre a dineína e outra classe de miosina. A hipótese (i) é suportada pelo fato de que a translocação rápida está frequentemente relacionada com o deslizamento sobre microtúbulos em diversos grupos, e a quantidade de actina intracelular é inversamente proporcional à velocidade do movimento (Aspengren, 2009). A cinesina aparentemente é o motor molecular da dispersão pigmentar.

## 6. Conclusão

Quando o camarão *M. olfersi* encontra-se em ambiente iluminado, com substrato claro, o RPCH é liberado em sua hemolinfa e se acopla a um receptor do tipo sete passos na membrana plasmática, que ativa uma proteína G heterotrimérica possivelmente do tipo  $G_0$ . Sua atividade transduz um sinal que inclui a ativação da NOS, produtora de NO, ativador da GC-S, catalizando a síntese de GMPc. O aumento da concentração intracelular de GMPc ocorre concomitantemente ao aumento da de  $Ca^{2+}$ , e as cascatas de ambos, culminam na ativação de proteína(s) cinase(s), entre as quais a PKG tem um papel muito importante. A PKG ativa um ou mais tipos de miosina, inclusive a miosina II não-muscular. O movimento da miosina parece ser regulado pela proteína ROCK, que fosforila as suas cadeias leves, impulsionando a agregação, e pela MLCP, que desfosforila as mesmas cadeias. A atividade da(s) miosina(s), possivelmente em associação à da dineína, causa a agregação pigmentar completa (Fig. 30). O mecanismo de dispersão pigmentar é mais obscuro, mas possivelmente envolve a redução da atividade da PKG, efetuando a desativação da miosina/dineína e a ativação da cinesina.



**Fig 30. Modelo esquemático proposto para a indução da agregação em cromatóforos ovarianos de *M. ofersi*.** (1) O acoplamento do RPCH a um receptor do tipo sete passos transmembrânico associado à proteína G causa a (2) ativação de uma proteína G, levando à (3) liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do REL e (4) ao influxo pelos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática. (5) A ativação da  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina leva à (6) atividade da óxido nítrico sintase, que libera NO. O NO induz a (7) ativação da guanilato ciclase citosólica, que produz e libera GMPC. O GMPC ativa a (8) proteína cinase G, a qual desencadeia o movimento da miosina, possivelmente pela (9) regulação da fosfatase da cadeia leve da miosina. A MLCP defosforila esta cadeia, que é (10) fosforilada pela cinase da proteína Rho. O ciclo de fosforilação/defosforilação (11) impulsiona a miosina. (12) A dineína também é possivelmente (12) ativada em consequência desta cascata de sinalização, contribuindo para a translocação centrípeta dos grânulos pigmentares.

## 7. Perspectivas futuras

A linha de pesquisa que estuda os mecanismos de translocação pigmentar nos camarões de água doce tem ampliado cada vez mais suas possibilidades. Muita investigação em cada etapa do mecanismo, do receptor aos motores moleculares, pode ser feita para esclarecer nossa compreensão acerca do próprio e também, em uma perspectiva mais ampla, a respeito da evolução da capacidade de adaptação cromática.

Nos estudos dos receptores, agora iniciado devido ao avanço da farmacologia na produção de drogas mais específicas, ainda há muito a ser feito, e a biologia molecular é uma ferramenta promissora a este propósito. A técnica do “Whole-cell Patch Clamp” pode ser muito útil para desvendar detalhadamente a participação de canais iônicos na transdução de sinal estimulada pelo RPCH.

Há muito para pesquisar sobre os pontos de *crosstalk* entre as cascatas de sinalização do  $Ca^{2+}$  e do GMPc, e sobre as cinases por elas ativadas.

Com o desenvolvimento da técnica de imunocitoquímica nesse modelo, muito motores moleculares específicos podem ser melhor investigados, como por exemplo a miosina V, envolvida na movimentação pigmentar em tantos grupos de animais. As proteínas acessórias de motores e citoesqueleto como as AKAPs e moesina representam um campo completamente inexplorado e fundamental para o detalhamento funcional desses motores.



## 8. Referências bibliográficas:

- Ali M, Lu H, Bookwalter CS, Warshaw DM, Trybus KM**, 2008. Myosin V and Kinesin act as tethers to enhance each others' processivity. PNAS 105 (12): 4691–4696.
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K**, 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). J Biol Chem 271: 20246-20249.
- Andersson M**, 1994. Sexual selection. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Aonuma H, Nagayama T, Takahata M**, 2000. Modulatory effects of nitric oxide on synaptic depression in the crayfish neuromuscular system. J Exp Bio 203: 3595–3602.
- Aspengren S, Sköld HN, Wallinb M**, 2009. Different strategies for color change. Cell Mol Life Sci 66(2): 187-91.
- Auerswald L, Freier U, Lopata A, Meyer B**, 2008. Physiological and morphological colour change in Antarctic krill, *Euphausia superba*: a field study in the Lazarev Sea. J Exp Biol 211: 3850-3858.
- Barral DC, Seabra MC**, 2004. The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. Pig Cem Res 17: 111–118.
- Barsoum IB, King-Smith C**, 2007. Myosin II and Rho kinase activity are required for melanosome aggregation in fish retinal pigment epithelial cells. Cell Motil Cytoskel 64 (11): 868–879.
- Beckerle, MC, KR Porter**, 1982. Inhibitors of dynein activity block intracellular transport in erythrocytes. Nature 295:701-703.
- Bell FT**, 2004. O papel de nucleotídeos cíclicos e proteínas quinases na translocação pigmentar em cromatossomos ovarianos do camarão *Macrobrachium olfersi* (Crustacea, Decapoda). Monografia. Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 36 pp.
- Bell FT**, 2008. Citoesqueleto, motores moleculares e translocação pigmentar em cromatossomos ovarianos do camarão *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). Dissertação. Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 58 pp.
- Bell FT, Ribeiro MR, McNamara JC**, 2005. As proteínas quinases A, G e C na translocação de grânulos de pigmento em cromatossomos ovarianos do camarão de água doce *Macrobrachium olfersii*

- (Crustacea, Decapoda). In: II Encontro de Biologia Comparada, FFCLRP, USP, 2005, Ribeirão Preto. II Encontro de Biologia Comparada.
- Bonnevier J, Arner A**, 2004. Actions downstream of cyclic GMP/protein kinase G can reverse protein kinase C-mediated phosphorylation of CPI-17 and Ca(2+) sensitization in smooth muscle. *J Biol Chem* 279: 28998–29003.
- Boyle RT**, 2005. Identificação e caracterização de proteínas motoras e components do citoesqueleto envolvidos na translocação pigmentar em cromatóforos do camarão de água doce *Macrobrachium olfersii*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, SP Brazil, PP. 105.
- Boyle RT, McNamara JC**, 2006. Association of kinesin and myosin with pigment granules in crustacean chromatophores. *Pig Cell Res* 19: 68–75.
- Boyle RT, McNamara JC**, 2008. A spring-matrix model for pigment translocation in the red ovarian chromatophores of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersi* (Crustacea, Decapoda). *Biol Bul* 214: 111–121.
- Boyle RT, McNamara JC**, 2009. Association of a myosin motor with membrane-bounded pigment granules in freshwater shrimp chromatophores: evidence from the Nitella actin-cable assay. *J Crust Biol* 29(3): 387-392.
- Bredt DS, Snyder SH**, 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 682-685.
- Britto AL, Castrucci AM, Visconti MA, Josefsson L**, 1990. Quantitative in vitro assay for crustaceans chromatophorotropins and other pigment cell agonists. *Pigm Cell Res* 3: 28-32.
- Byers HR, Yaar M, Eller MS, Jalbert NL, Gilchrist BA**, 2000. Role of cytoplasmic dynein in melanosome transport in human melanocytes. *J Invest Dermatol* 114 :990–997.
- Casares FM, Mantione KJ, Oh K, Lee R, Stefano GB**, 2006. Nitric oxide's pulsatile release in lobster heart and its regulation by opiate signaling: Pesticide interference. *Med Sci Monit* 12(12): 373-378.
- Castrucci A M D, Sherbrooke WC, Zucker N**, 1997. Regulation of physiological color change in dorsal skin of male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *Herpetol* 53, 405–410.
- Cattaert D, Ray DL**, 1998. Direct glutamate-mediated presynaptic inhibition of sensory afferents by the postsynaptic motor neurons. *European Journal of Neuroscience* 10: 3737–3746.

- Chai Y, Lin Y-F**, 2008. Dual regulation of the ATP-sensitive potassium channel by activation of cGMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 456(5): 897-915.
- Chilcoat CD, Sharief Y, Jones SL**, 2008. Tonic protein kinase A activity maintains inactive  $\alpha_2$  integrins in unstimulated neutrophils by reducing myosin light-chain phosphorylation: role of myosin light-chain kinase and Rho kinase. *J Leukoc Biol* 83: 964-971.
- Christie AE, Cashman CR, Brennan HR, Mae M, Sousa GL, Li L, Stemmler EA, Dickinson PS**, 2008. Identification of putative crustacean neuropeptides using in silico analyses of publicly accessible expressed sequence tags. *Gen Comp Endocrinol* 156, 246–264.
- Clancy R, Leszczynska J, Amin A, Levarovsky D, Abramson S**, 1995. Nitric oxide stimulates ADP ribosylation of actin in association with the inhibition of actin polymerization in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 58:196–202.
- Clancy RM, Leszczynska-Piziak J, Abramson SB**, 1993. Nitric oxide stimulates the ADP-ribosylation of actin in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 191:847– 852.
- Conti MA, Adelstein RS**, 2008. Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci* 121: 404.
- Cooper WE, Greenberg N**, 1992. Reptilian coloration and behavior. In *Biology of the Reptilia*, vol 18, eds Gans C & Crews D, pp. 298–422. Chicago, IL: Chicago University Press.
- Costa MC, Mani F, Santoro W Jr, Espreafico EM, Larson RE**, 1999. Brain myosin-V, a calmodulin-carrying myosin, binds to calmodulin-dependent protein kinase II and activates its kinase activity. *J Biol Chem* 274:15811–15819.
- Cott HB**, 1940. Adaptive coloration in animals. Methuen and Co., London.
- Cushing, PE**. 1997 Myrmecomorphy and myrmecophily in spiders: a review. *Fla Entomol* 80: 165–193.
- Darwin C**, 1859. On the origin of species by means of natural selection. Murray, London, UK.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P**, 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351:95–105.
- DeGiorgis JA, Reese TS, Bearer EL**, 2002. Association of non-muscle myosin II with axoplasmic organelles. *Mol Biol Cell* 13:1046– 1057.
- DePina AS, Wöllert T, Langford GM**, 2007. Membrane associated nonmuscle myosin II functions as a motor for actin-based vesicle transport in clam oocyte extracts. *Cell Mot Cytoskel* 64: 739–755.
- Detto T, Backwell PRY, Hemmi JM, Zeil J**, 2006. Visually mediated species and neighbour recognition in the fiddler crabs *Uca myobergi* and *Uca capricornis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 273, 1661-1666.

- Dou Y, Arlock P, Arner A**, 2007. Blebbistatin specifically inhibits actin-myosin interaction in mouse cardiac muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: 1148–1153.
- Even-Ram S, Doyle AD, Conti MA, Matsumoto K, Adelstein R, Yamada KM**, 2007. Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin– microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol* 9(3): 299-309.
- Fajmut A, Brumen M**, 2008. MLC-kinase/phosphatase control of Ca<sup>2+</sup> signal transduction in airway smooth muscles. *Journal of Theoretical Biology Journal of Theoretical Biology* 252 (3): 474-481.
- Farman GP, Tachampa K, Mateja R, Cazorla O, Lacampagne A, Tombe PP**, 2008. Blebbistatin: use as inhibitor of muscle contraction. *Pflugers Arch – Europ J Physiol* 455: 995–1005.
- Fath KR**, 2005. Characterization of myosin II binding to Golgi stacks in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton* 60:222–235.
- Feinstein N, Parnas D, Parnas H, Dudel J, Parnas I**, 1998. Functional and immunocytochemical identification of glutamate autoreceptors of an NMDA type in crayfish neuromuscular junction. *J Neurophysiol* 80:2893-2899.
- Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ, Nakano T**, 1999. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* 274, 37385–37390.
- Fernandez PJ, Bagnara JT**, 1991. Effect of background color and low-temperature on skin color and circulating alpha-MSH in two species of leopard frog. *Gen Comp Endocrinol* 83: 132–141.
- Fernlund P, Josefsson L**, 1968. Chromactivating hormones of *Pandalus Borealis*: isolation and purification of the ‘red-pigment-concentrating hormone’. *Biochem Bioph Acta* 158: 262-273.
- Fernlund P, Josefsson L**, 1972. Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Sci* 177: 173–175.
- Filshie BK, Day MF, Mercer EH**, 1975. Color and color change in the grasshopper, *Kosciuscola tristis*. *J Insect Physiol* 21: 1763–1770.
- Fingerman M**, 1969. Cellular aspects of the control of physiological color changes in crustaceans. *Am Zool* 9(2): 443-52.
- Fingerman M, Connel PM**, 1968. The role of cations in the actions of the hormones controlling the red chromatophores of the prawn, *Palaemonetes vulgaris*. *Gen Comp Endocrinol* 1(3): 392-8.

- Fingerman M, Fingerman SW, Lambert DT**, 1975. Colchicine, cytochalasin B, and pigment movements in ovarian and integumentary erythrophores of the prawn, *Palaemonetes vulgaris*. Biol Bull, Mar Biol Lab, Woods Hole.
- Fingerman M, Rosenberg M**, 1988. Control of the melanophores of the crab, *Pachygrapsus marmoratus*: release of pigment dispersing and pigment concentrating neurohormones by amines. Comp Biochem Physiol C 91 (1): 85-89.
- Ford EB**, 1945. Polymorphism. Biological Review 20:73–88.
- Forslund T, Nilsson H, Sundqvist T**, 2000. Nitric oxide regulates the aggregation of stimulated human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun 247:482–487.
- Forsman A, Ahnesjö J, Caesar S, Karlsson M**, 2008. A model of ecological and evolutionary consequences of color polymorphism. Ecol 89(1): 34–40.
- Freeman AR, Connel PM, Fingerman M**, 1968. An electrophysiological study of the red chromatophore of the prawn, *Palaemonetes*: Observations on the action of red pigment-concentrating hormone. Comp Biochem Physiol 26: 1015-1029.
- Gäde G, Hoffmann KH, Spring JH**, 1997. Hormonal regulation in insects: facts, gaps and future directions. Physiol Rev 77: 963–1032.
- Gäde G, Marco HG**, 2009. Peptides of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family with special emphasis on Caelifera: Primary sequences and functional considerations contrasting grasshoppers and locusts. Gen Comp Endocrinol 162: 59–68.
- Garcia TS, Sih A**, 2003. Color change and colordependent behavior in response to predation risk in the salamander sister species *Ambystoma barbouri* and *Ambystoma texanum*. Oecologia 137, 131–139.
- Gasman S, Chasserot-Golaz S, Hubert P, Aunis D, Bader MF**, 1998. Identification of a potential effector pathway for the trimeric Go protein associated with secretory granules. Go stimulates a granule-bound phosphatidylinositol 4-kinase by activating RhoA in chromaffin cells. J Biol Chem 273, 16913-16920.
- Gasman S, Chasserot-Golaz S, Popoff MR, Aunis D, Bader MF**, 1997. Trimeric G proteins control exocytosis in chromaffin cells. G<sub>o</sub> regulates the peripheral actin network and catecholamine secretion by a mechanism involving the small GTP-binding protein Rho. J Biol Chem: 272, 20564–20571.

- Gaus G, Kleinholz LH, Kegel G, Keller R**, 1990. Isolation and characterization of red pigment concentrating hormone from six crustacean species. *J Comp Physiol* 190B: 373–379.
- Gerarts WPM, Smit AB**, 1991. The role of peptide diversity in the molluscan CNS, In Kits KS, Boer HH, Joosse J (Eds): *Molluscan Neurobiology*, North Holland, Amsterdam, pp. 300-308.
- Gerarts WPM, Smit AB, Li KW, Hordijk PL**, 1992. The light green cells of *Lymnaea*: a neuroendocrine model system for stimulus-induced expression of multiple peptide genes in a single cell type. *Experientia* 48: 464-473.
- Gibson A, Lilley E**, 1997. Release of the antioxidants ascorbate and urate from a nitrergically-innervated smooth muscle. *Brit J Pharmacol* 122 (8): 1746-1752.
- Gilman AG**, 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann Rev Biochem* 56: 615–649.
- Golombek DA, Agostino PV, Plano SA, Ferreyra GA**, 2004. Signaling in the mammalian circadian clock: the NO/cGMP pathway. *Neurochem Internat* 45: 929–936.
- Gouveia Gr, Lopes TM, Neves CA, Nery LEM, Trindade GS**, 2004. Ultraviolet radiation induces dose-dependent pigment dispersion in crustacean chromatophores. *Pig Cell Res* 17: 545–548.
- Granato FC, Tironi TS, Maciel FE, Rosa CE, Vargas MA, Nery LEM**, 2004. Circadian rhythm of pigment migration induced by chromatophorotropins in melanophores of the crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp Biochem Physiol A* 138: 313–319.
- Gross SP, Tuma MC, Deacon SW, Serpinskaya AS, Reilein AR, Gelfand VI**, 2002. Interactions and regulation of molecular motors in *Xenopus* melanophores. *J Cell Biol* 156 (5): 855–865.
- Gurevich VV, Gurevich EV**, 2007. GPCR monomers and oligomers: it takes all kinds. *TINS*-579; No of Pages 8.
- Hamm HE**, 1998. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273:669–672.
- Han J, Kim N, Joo H, Kim E, Earm YE**, 2002. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: 1545–1554
- Han J, Kim N, Kim E, Ho WK, Earm YE**, 2001. Modulation of ATP-sensitive potassium channels by cGMP-dependent protein kinase in rabbit ventricular myocytes. *J Biol Chem* 276:22140–22147.
- Hanlon RT**, 2007. Cephalopod dynamic camouflage. *Curr Biol* 17: 400–404.

- Hanlon RT, Messenger JB**, 1988. Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis*)—the morphology and development of body patterns and their relation to behavior. *Phil Trans R Soc B* 320: 437–487.
- Hara M, Yaar M, Byers HR, Goukassian D, Fine RE, Gonsalves J, Gilchrest BA**, 2000. Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *J Invest Dermatol* 114 :438–443.
- Harding SE, Harris P**, 1986. GDP activates rabbit heart adenylate cyclase but does not support stimulation by isoproterenol: a re-appraisal of the control mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 18: 793–806.
- Hatley ME, Lockless SW, Gibson SK, Gilman AG, and Ranganathan R**, 2003. Allosteric determinants in guanine nucleotide-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14445–14450.
- Hayashi H, Fujii R**, 2001. Possible Involvement of Nitric Oxide in Signaling Pigment Dispersion in Teleostean Melanophores *Zool Sci* 18: 1207–1215.
- Hemmil JM, Marshall J, Pix W, Vorobyev M, Zeil J**, 2006. The variable colours of the fiddler crab *Uca vomeris* and their relation to background and predation. *J Exp Biol* 209: 4140-4153.
- Hermans E**, 2003. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Therap* 99 (1): 22-44.
- Hinton HE, Jarman GM**, 1972. Physiological colour change in the Hercules beetle. *Nature* 238: 160–161.
- Hirokawa N**, 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Sci* 279:519–526.
- Hoglund E, Balm PHM, Winberg S**, 2002. Behavioural and neuroendocrine effects of environmental background colour and social interaction in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *J Exp Biol* 205: 2535–2543.
- Holt JP, Bottomly K, Mooseker MS**, 2007. Assessment of myosin II, Va, VI and VIIa loss of function on endocytosis and endocytic vesicle motility in bone marrow-derived dendritic. *Cells Cell Mot Cytoskel* 64:756–766.
- Horikoshi T, Nakahara M, Kaminaga H, Sasaki M, Uchiwa H, Myiachi Y**, 2000. Involvement of nitric oxide in UVB-induced pigmentation in guinea pig skin. *Pigment Cell Res* 13: 358–363.
- Huang JD, Brady ST, Richards BW, Stenolen D, Resau JH, Copeland NG, Jenkins NA**, 1999. Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature* 397, 267–270.

- Huey RB, Kingsolver JG**, 1989. Evolution of Thermal Sensitivity of Ectotherm Performance TREE 4 (5): 131-135.
- Ignarro LJ**, 1990. Nitric oxide: a novel signal transduction mechanism for transcellular communication. Hypertension 16: 477-483.
- Inoue S, Salmon ED**, 1995. Force generation by microtubule assembly disassembly in mitosis and related movements. Mol Biol Cell 6:1619-1640.
- Iwasaki T & Wang Y**, 2008. Cytoplasmic force gradient in migrating adhesive cells. Biophys J 94(5): 35-37.
- Iyengar R, Birnbaumer L**, 1979. Coupling of the glucagon receptor to adenylyl cyclase by GDP: evidence for two levels of regulation of adenylyl cyclase. Proc Natl Acad Sci USA 76: 3189-3193.
- Johansson KU, Mellon D**, 1998. Nitric oxide as a putative messenger molecule in the crayfish olfactory midbrain. Brain Res 807: 237-242.
- Johansson KU, Wallen R, Hallberg E**, 1996. Electron microscopic localization and experimental modification of NADPH-diaphorase activity in crustacean sensory axons. Invert Neuro 2: 167-173.
- Josefsson L**, 1983. Chemical properties and physiological actions of crustacean chromatophorotropins. Am Zool 23: 507-515.
- Kamm KE, Stull JT**, 1985. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. Ann Rev of Pharmacol Toxicol 25: 593-620.
- Karcher RL, Deacon SW, Gelfand VI**, 2002. Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. Trends in Cell Biol 12(1): 21-27.
- Karki S, Holzbaur EL**, 1995. Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex. J Biol Chem 270: 28806-28811.
- Kawamoto S, Hattori S, Oiji I, Hamajima K, Mishina M, Okuda K**, 1994. Ligand-binding properties and N-glycosylation of  $\alpha 1$  subunit of the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA)-selective glutamate receptor channel expressed in a baculovirus system. Eur J Biochem 223: 665-673.
- Khattab MM, Al-Rawi MB, Aleisa AM**, 2007. Postjunctional synergism of norepinephrine with ATP and diadenosine tetraphosphate in Guinea pig vas deferens. Role of protein kinase C and myosin light chain phosphatase. Pharmacology 80(1): 27-32.



- Kheifets V, Mochly-Rosen D**, 2007. Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function. *Pharmacol Res* 55: 467–476.
- Kim BJ, Jeon J, Kim SJ, So I**, 2007. Role of calmodulin and myosin lightchain kinase in the activation of carbachol-activated cationic current in murine ileal myocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 85: 1254-1262.
- Kincaid MM, KingSJ**, 2006. Motor sand their tethers: the role of secondary binding sites in processive motility. *Cell Cycle* 5: 2733–2737.
- King RB, Hauff S, Phillips JB**, 1994. Physiological color change in the green treefrog: responses to background brightness and temperature. *Copeia* 1994, 422–432.
- King SJ, SchroerTA**, 2000. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol* 2:20–24.
- Kinosita H**, 1953. Studies on the mechanism of pigment migration within fish melanophores with special reference to their electric potentials. *Amnotat Zool Japan* 26: 115-129.
- Klein JM, Mohrherr CJ, Sleutels F, Jaenecke N, Riehm JP, Rao KR**, 1995. A highly conserved red pigment concentrating hormone precursor in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 151–158.
- Kobilka BK**, 2007. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 1768: 794–807.
- Kodric-Brown A**, 1998. Sexual dichromatism and temporary color changes in the reproduction of fishes. *Am Zool* 38: 70–81.
- Kolega J**, 2006. The role of myosin II motor activity in distributing myosin asymmetrically and coupling protrusive activity to cell translocation. *Mol Biol Cell* 17: 4435–4445.
- Krendel M, Mooseker MS**, 1992. Myosins: tails (and heads) of functional fiversity. *Physiology* 20: 239-251.
- Kubo M, Nakaya Y, Matsuoka S, Saito K, Kuroda Y**, 1994. Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:471–476.
- Kulkarni GK, Fingerman M**, 1986. Chromatophoretropic activity of extracts of the brain and nerve chord of the leech, *Macrobdella decora*, in the fiddler crab, *Uca pugilator*: an *in vivo* and *in vitro* study. *Comp Biochem Physiol* 84C: 369–372.

- Lambert DT, Crowe H**, 1973. Colchicine and cytochalasin B: Effects on pigment granule translocation in melanophores of *Uca pugilator* (Crustacea: Decapoda). *Comp Biochem Physiol* 46A: 11-16.
- Lambert DT, Crowe JH**, 1976. Colchicine, Cytochalasin B, cyclic AMP and pigment granule translocation in melanophores of *Uca pugilator* and *Ileinigrapus oregonensis* (Decapoda : Crustacea). *Comp Biochem Physiol*, 54C : 115-122.
- Lambert DT, Fingerman M**, 1976. Evidence for a non-microtubular colchicine effect in pigment granule aggregation in melanophores of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp Biochem Physiol* 53C: 25–28.
- Lambert DT, Fingerman M**, 1978. Colchicine and cytochalasin B: a further characterization of their action on crustacean chromatophores using the ionophore A23187 and thiol reagents. *Biol Bull* 155:563–575.
- Lambert DT, Fingerman M**, 1979. Evidence implicating calcium as the second messenger for red pigment-concentrating hormone in the prawn *Palaemonetes pugio*. *Physiol Zool* 52, 497-508.
- Langford GM**, 1995. Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Cur Opin Cell Biol* 7 (1): 82-88.
- Langridge KV, Broom M, Osorio D**, 2007. Selective signalling by cuttlefish to predators. *Curr Biol* 17: 1044–1045.
- Lee CY, Zou HS, Yau SM, Ju YR, Liau CS**, 2000. Nitric oxide synthase activity and immunoreactivity in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Neuroreport* 11: 1273–1276.
- Leffler CW, Fedinec AL, Parfenova H, Jaggar JH**, 2005. Permissive contributions of NO and prostacyclin in CO-induced cerebrovascular dilation in piglets. *Am J Physiol. Heart and Circulatory Physiology* 289: 432–438.
- Lerner AB, Tahahashi Y**, 1956. Hormonal control of melanin pigmentation. *Hormonal Res* 12: 303-320.
- Li D, Miller M, Chantler PD**, 1994. Association of a cellular myosin II with anionic phospholipids and the neuronal plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci* 91:853–857.
- Licht AH, Nübel T, Feldner A, Jurisch-Yaksi N, Marcello M, Demicheva E, Hu J-H, Hartenstein B, Augustin HG, Hecker M, Angel P, Korff T, Schorpp-Kistner M**, 2010. Junb regulates arterial contraction capacity, cellular contractility, and motility via its target My19 in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 120 (7): 2307-2318.

- Lincoln TM, Cornwell TL**, 1993. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. FASEB: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 7 (2): 328-338.
- Linz-McGillem LA, Alliegro MC**, 2003. Myosin II in retinal pigmented epithelial cells: Evidence for an association with membranous vesicles. *Exp Eye Res* 76:543–552.
- Liu L, Schwartz BR, Lin N, Winn RK, Harlan JM**, 2002. Requirement for RhoA kinase activation in leukocyte de-adhesion. *J Immunol* 169, 2330–2336.
- Lo CM, Buxton DB, Chua GC, Dembo M, Adelstein RS, Wang YL**, 2004. Nonmuscle myosin IIb is involved in the guidance of fibroblast migration. *Mol Biol Cell* 15: 982–989.
- Lowenstein CJ, Snyder SH**, 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70: 705–707.
- Lutz S, Baltus D, Jakobs KH, and Niroomand F**, 2002. Spontaneous release of GDP from Gi proteins and inhibition of adenylyl cyclase in cardiac sarcolemmal membranes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365:50–55.
- Lyons SE, Bruck ME, Bowie EJ, Ginsburg D**, 1992. Impaired intracellular transport produced by a subset of type IIA von Willebrand disease mutations. *J Biol Chem* 267(7): 4424-4430.
- Maeno N, Iga T**, 1992. Adrenergic mechanisms associated with the movement of platelets in iridophores from the freshwater goby, *Odontobutis obscura*. *Comp Biochem Physiol* 102C(2): 233-237;1992.
- Majerus MEN**, 1998. Melanism: evolution in action. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Marco HG, Stoeva S, Voelter W, Gäde G**, 2002. Small peptides from the sinus glands of the South African spiny lobster, *Jasus lalandii*. In: Keller R, Dircksen H, Sedlmeier D, Vaudry H (Eds.), Proceedings of the 21st Conference of European Comparative Endocrinologists, Monduzzi Editore, Bologna, pp. 405– 408.
- Martinez EA, Murray M, Leung MK, Stefano GB**, 1988. Evidence for dopaminergic and opioid involvement in the regulation of locomotor activity in the land crab *Gecarcinus lateralis*. *Comp Biochem Physiol C* 90(1): 89-93.
- Matson S, Markoulaki S, Ducibella T**, 2006. Antagonists of myosin light chain kinase and of myosin II inhibit specific events of egg activation in fertilized mouse eggs. *Biol of Reproduc* 74: 169–176.
- Maupin P, Phillips CL, Adelstein RS, Pollard TD**, 1994. Differential localization of myosin-II isozymes in human cultured cells and blood cells. *J Cell Sci* 107: 3077–3090.
- Mbikou P, Fajmut A, Brumen M, Roux E**, 2006. Theoretical and experimental investigation of calcium-contraction coupling in airway smooth muscle. *Cell Biochem Biophys* 46: 233–251.

- McConnachie G, Langeberg LK, Scott JD**, 2006. AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol Med* 12: 317–323.
- McNamara JC**, 1980. Ultrastructure of the chromatophores of *Palaemon affinis* Heilprin (Crustacea, Decapoda). The structural basis of pigment migration. *J Exp Mar Biol Ecol* 46: 219-229.
- McNamara JC**, 1981. Morphological organization of crustacean pigmentary effectors. *Biol Bull* 161: 270-280.
- McNamara JC, Ribeiro MR**, 1999. Kinetic characterization of pigment migration and the role of the cytoskeleton in granule translocation in the red chromatophores of the shrimp *Macrobrachium olfersi* (Crustacea, Decapoda). *J Exp Zool* 283 (4): 19-30.
- McNamara JC, Ribeiro MR**, 1999. Kinetic characterization of pigment migration and the role of the cytoskeleton in granule translocation in the red chromatophores of the shrimp *Macrobrachium olfersi* (Crustacea, Decapoda). *J Exp Zool* 283, 19-30.
- McNamara JC, Ribeiro MR**, 2000. The calcium dependence of pigment translocation in fresh water shrimp ovarian red chromatophores. *Biol Bull* 198, 357-366.
- McNamara JC, Salomão LC, Ribeiro EA**, 1990. The effect of eyestalk ablation on hemolymph osmotic and ionic concentrations during acute salinity exposure in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersi* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). *Hydrobiologia* 199, 193-199.
- McNamara JC, Sesso A**, 1982. Pigment biogenesis in freshwater shrimp ventral nerve chord chromatophores. *Cell Tissue Res* 222: 167-175.
- McNamara JC, Taylor HH**, 1987. Ultrastructural modifications associated with pigment migration in palaemonid shrimp chromatophores (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 53: 113-133.
- McNamara JC, Taylor HH**, 1987. Ultrastructural modifications associated with pigment migration in palaemonid shrimp chromatophores (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 53(2): 113-133.
- Melyan Z, Tarttelin EE, Bellingham J, Lucas RJ, Hankins MW**, 2005. Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature* 433: 741-745.
- Merilaita S**, 1998 Crypsis through disruptive coloration in an isopod. *Proc R Soc B* 265: 1059–1064.
- Messenger JB**, 2001. Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biol Rev* 76: 473–528.

- Michel RN, Chin ER, Chakkalakal JV, Eibl JK, Jasmin BJ**, 2007.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-based signalling in the regulation of the muscle fibre phenotype and its therapeutic potential via modulation of utrophin A and myostatin expression. *App physiol nut metab* 32 (5): 921-929.
- Miller KE, Sheetz MP**, 2000. Characterization of myosin V binding to brain vesicles. *J Biol Chem* 275:2598–2606.
- Milograna SR, Bell FT, McNamara JC**, 2010. Signal transduction, plasma membrane calcium movements, and pigment translocation in freshwater shrimp chromatophores. *J Exp Zool A: Ecological Genetics and Physiology*. DOI: 10.1002/jez.633
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA**, 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43(2): 109-142.
- Mukai H, Munekataq E, Higashijima T**, 1992. G protein antagonists. A novel hydrophobic competes with receptor for G protein binding. *J Biologic Chem* 267(23),16237-16243.
- Murad F**, 1994. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol* 26, 19–33.
- Murphy NP, Austin CM**, 2005. Phylogenetic relationships of the globally distributed freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae): biogeography taxonomy and the convergent evolution of abbreviated larval development. *Zool Scr* 34 (2): 187–197.
- Nassel DR**, 1996. Peptidergic neurohormonal control systems in invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 6: 842-850.
- Natochin M, Gasimov KG, Artemyev NO**, 2001. Inhibition of GDP/GTP Exchange on GR Subunits by Proteins Containing G-Protein Regulatory Motifs. *Biochemistry* 40: 5322-5328.
- Natochin M, Moussaif M, Artemyev NO**, 2001. Probing the mechanism of rhodopsin-catalyzed transducin activation. *J Neurochem* 77 (1): 202–210
- Nelson XJ, Jackson RR**, 2007. Complex display behaviour during the intraspecific interactions of myrmecomorphic jumping spiders (Araneae, Salticidae). *J Nat Hist* 41: 1659–1678.
- Nery LE, Silva MA, Josefsson L, Castrucci AM**, 1997. Cellular signalling of PCH-induced pigment aggregation in the crustacean *Macrobrachium potiuna* erythrophores. *J Comp Physiol* 167B: 570–575.
- Nery LEM, Castrucci AML**, 1997. Pigment Cell Signalling for Physiological Color Change *Comp Biochem Physiol* 118A (4): 1135-1144.

- Nery LEM, Silva MA, Castrucci AML, 1998.** Role of cyclic nucleotides in pigment translocation within the freshwater shrimp, *Macrobrachium potiana*, erythrophores. *J Comp Physiol* 168B: 624–630.
- Nilsson HM, Karlsson AM, Loitto V, Svensson SPS, Sundqvist T, 2000.** Nitric Oxide Modulates Intracellular Translocation of Pigment Organelles in *Xenopus laevis* Melanophores. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 47: 209–218.
- Nilsson HM, Svensson SPS, Sundqvist T, 2001.** L-NAME-induced dispersion of melanosomes in melanophores activates PKC, MEK and ERK1. *Pig Cell Res* 14: 450–455.
- Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ, 1992.** Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 90(5): 2092-2096.
- Norman MD, 2000.** Cephalopods: a world guide. Hackenheim, Germany: Conch Books.
- Norman MD, Finn J, Tregenza T, 2001,** Dynamic mimicry in an Indo-Malayan octopus. *Proc R Soc B* 268: 1755–1758.
- Novales RR, Novales BJ, 1966.** Factors influencing the response of isolated dogfish skin melanophores to melanocyte-stimulating hormone. *Biol Bull* 131: 470-478.
- Novales RR, 1962.** The role of ionic factors in hormone action on the vertebrate melanophore. *Am Zoologist* 2 : 337-352.
- Novales RR, 1967.** Melanocyte-stimulating hormone and intermediate lobe of the pituitary: chemistry, effects, and mode of action, pp. 241-259. In: Martini L and Ganong WF, ed *Neuroendocrinology*, Vol II, Academic Press, New York.
- Oshima N Inagaki H, Manabe T, 1990.** Evidence for involvement of dynein-tubulin system in pigment aggregation within *Tilapia* melanophores. *Comp Biochem Physiol* 96A:517–523.
- Peebles JB, 1977.** A rapid technique for molt staging in live *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 12: 173-180.
- Pereira G, Stefano HD, Staton J, Farrell B, 2002.** Phylogenetic relationships on some species of the genus *Macrobrachium* based on nucleotide sequences of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I. *Modern approaches to the study of Crustacea* 319-322.
- Piacentini L, Mura R, Jakobs KH, and Niroomand F, 1996.** Stable GDP analog-induced inactivation of  $G_i$  proteins promotes cardiac adenylyl cyclase inhibition by guanosine 5'-(beta gamma-imino)triphosphate and muscarinic acetylcholine receptor. *Biochem Biophys Acta* 1282: 11–16.

- Poulton EB**, 1890. The colour of animals: their meaning and use. Kegan Paul, Trench, Trubner, London, UK.
- Prosser CL**, 1973. Capítulo 2, Inorganic ions, pp. 78-110. Em Comparative Animal Physiology. Ed., C. L. Prosser, W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Provencio I, Cooper HM, Foster RG**, 1998. Retinal projections in mice with inherited retinal degeneration: Implications for circadian photoentrainment. *J Comp Neurol* 395 (4): 417-439.
- Quackenbush LS**, 1981. Studies on the mechanism of action of a pigment dispersing chromatophorotropin in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp Biochem Physiol* 68A: 597-604.
- Quist E, Powell P, Vasan R**, 1992. Guanylnucleotide specificity for muscarinic receptor inhibitory coupling to cardiac adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* 41: 177-184.
- Rao HR, Riehm JP**, 1993. Pigment-dispersing hormones. *Ann NY Aca Sci Vol. 680 The melanotropic peptides*, pp. 78-88.
- Rao KR**, 1985. Pigmentary effectors. Em: *The biology of Crustacea*, vol. 9, Integument, pigments and hormonal processes. DE Bliss and LH Mantel, Eds. Academic Press, Inc., Nova York, NY, pp. 395-462.
- Rao KR**, 2001. Crustacean pigmentary-effector hormones: chemistry and functions of RPCH, PDH and related peptides. *Am Zool* (41) 364-379.
- Rao KR, Fingerman M**, 1983. Regulation of release and mode of action of crustacean chromatophorins. *Am Zool* 23:517-527, 1983.
- Rao KR, Riehm JP, Zahnow CA, Kleinholz ZH, Tarr GE, Johnson L, Norton S, Landau M, Semmes OJ, Sattelberg RM, Jorenby WH, Hintz MF**, 1985. Characterization of a pigment dispersing hormone in eyestalks of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5319- 5322.
- Rao KR, Riehm, JP**, 1988. Chemistry of crustacean chromatophorotropins. In: Bagnara JR (Ed.), *Advances in Pigment Cell Research*. Alan, R. Liss Inc., New York, pp. 407-422.
- Reilein AR, Serpinskaya AS, Karcher RL, Dujardin DL, Vallee RB, Gelfand VI**, 2003. Differential regulation of dynein-driven melanosome movement. *Biochem Biophys Res Commun* 309: 652-658.
- Rembold CM, Murphy RA**, 1990. Latch-bridge model in smoothmuscle- $[Ca^{2+}]_i$  can quantitatively predict stress. *Am J Physiol* 259: 251-257.

- Ribeiro MR**, 1998. Um estudo da cinética da translocação pigmentar nos cromatóforos vermelhos do ovário do camarão de água doce *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). Mestrado, Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 129 pp.
- Ribeiro MR**, 2002. A transdução de sinal e a ativação da translocação pigmentar nos cromatóforos ovarianos do camarão *Macrobrachium olfersi* (Crustacea, Decapoda). Doutorado, Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 167pp.
- Ribeiro MR, McNamara JC**, 1997. Possíveis mensageiros intracelulares do RPCH nos cromatóforos vermelhos do ovário do camarão de água doce *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). In: XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 1997, Caxambu. Resumos, 11.011, p. 106.
- Ribeiro MR, McNamara JC**, 2000. The role of cytoskeletal molecular motors in pigment aggregation in the red ovarian chromatophores of the freshwater shrimp, *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). In: I International Symposium on Myosin V and II IberoAmerican Forum on the Cytoskeleton, 2000, Paraty-Rio de Janeiro. Resumos, p. 84.
- Ribeiro MR, McNamara JC**, 2001. Identificação de actina nos cromatóforos ovarianos do camarão *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 2001, Caxambu. Resumos, 11.019, p. 98.
- Ribeiro MR, McNamara JC**, 2003. The role of cyclic guanylyl cyclase in pigment aggregation in freshwater shrimp ovarian chromatophores. In: I Encontro de Biologia Comparada, 2003, Ribeirão Preto. Resumos, 38, p. 23.
- Ribeiro MR, McNamara JC**, 2007. Calcium movements during aggregation in freshwater shrimp chromatophores. *Pigment Cell Res* 20: 70-77.
- Ribeiro MR, McNamara JC**, 2009. Cyclic Guanosine Monophosphate Signaling Cascade Mediates Pigment Aggregation in Freshwater Shrimp Chromatophores. *Biol Bull* 216: 138–148.
- Richards TA, Cavalier-Smith T**, 2005. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* 436, 1113-1118.
- Riento F, Ridley AJ**, 2003. ROCKS: Multifunctional kinases in cell behavior. *Nature Rev/Molecular Cell Biology*. 4: 446-456.



- Robison WG, Charlton JS**, 1973. Microtubules, microfilaments and pigment movimenting the cromatophores of *Palaemonetes vulgaris* (Crustacea). *J Exp Zool* 186: 279-304.
- Rodionov V, Yu J, Kashina A, Oladipo A, Gross SP**, 2003. Switching between microtubule- and actin-based transport systems in melanophores controlled by cAMP levels. *Curr Biol* 13: 1–20.
- Rodionov VI, Borisy GG**, 1997. Self-centering activity of cytoplasm. *Nature* 386:170–173.
- Rodionov VI, Hope AJ, Svitkina TM, Borisy GG**, 1998. Functional coordination of microtubule-based and actin-based motility in melanophores. *Curr Biol* 8: 165-168.
- Rodríguez-Sosa L, Calderón J, Becerra E, Aréchiga H**, 1994. Regional distribution and immunocytological localization of red pigment concentrating hormone in the crayfish. *Gen Comp Endocrinol* 95: 443–456.
- Rogers SL, Gelfand VI**, 1998. Myosin cooperates with microtubule motors during organelle transport in melanophores. *Curr Biol* 8:161–164.
- Rogers SL, Karcher RL, Roland JT, Minin AA, Steffen W, Gelfand VI**, 1999. Regulation of melanosome movement in the cell cycle by reversible association with myosin V. *J Cell Biol* 146 (6) 1265-1275.
- Rogers SL, Tint IS, Gelfand VI**, 1998. In vitro motility assay for melanophore pigment organelles. *Meth Enzymol* 298: 361-372.
- Ropero AB, Fuentes E, Rovira JM, Ripoll C, Soria B, Nadal A**, 1999. Non-genomic actions of 17 $\beta$ -oestradiol in mouse pancreatic  $\beta$ -cells are mediated by a cGMP-dependent protein kinase. *J Physiol* 521(2):397–407.
- Rosenfeld SS, Xing J, Chen LQ, Sweeney HL**, 2003. Myosin IIb is unconventionally conventional. *J Biol Chem* 278: 27449–27455.
- Ruxton GD, Sherratt TN, Speed M**, 2004. *Avoiding attack the evolutionary ecology of crypsis, warning signals and mimicry*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Saitoh M, Ishikawa T, Matsushima S, Naka M, Hidaka H**, 1987. Selective inhibition of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 262: 7796-7801.
- Saitoh M, Ishikawa T, Matsushima S, Naka M, Hidaka H**, 1987. Selective inhibition of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *Journal of Biology and Chemistry*. 262: 7796-7801.

- Sakuta H, Okamoto K, Tandai M**, 1994. Atrial natriuretic factor potentiates glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> currents via the activation of receptor guanylate cyclase in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 267:281–287.
- Sakuta H, Okamoto K, Watanabe Y**, 1993. Modification by cGMP of glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> currents in *Xenopus* oocytes. *Jpn J Pharmacol* 61:259–262.
- Sanches DB, Carnio EC, Branco LGS**, 2003. Central nNOS is involved in restraint stress-induced fever: evidence for a cGMP pathway. *Physiol Behav* 80: 139– 145.
- Sandquist JC, Swenson KI, Demali KA, Burrige K, Means AR**, 2006. Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A and B during cell rounding and migration. *J Biol Chem*. 281(47):35873–35883.
- Scharrer B, Scharrer E**, 1944. Comparison between the intercerebralis–cardiacum–allatum system of the insects and the hypothalamo-hypophyseal system of the vertebrates. *Biol Bull* 87: 242– 251.
- Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U**, 1993. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochem Biophys Acta* 1178: 153-175.
- Schneyer CR, Pineyro MA, Kirkland JL, and Gregerman RI**, 1984. Stimulation of human fat cell adenylate cyclase by GDP and guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate). *J Biol Chem* 259: 7038–7044.
- Scholz NL, Chang ES, Graubard K, Truman JW**, 1998. The NO/cGMP signaling pathway and the development of neural networks in postembryonic lobsters. *J Neurobiol* 34: 208–226.
- Seifert R, Wenzel-Seifert K, Lee TW, Gether U, Sarders-Bush E, and Kobilka BK**, 1998. Different effects of Gs splice variants on  $\beta$ 2-adrenoreceptor-mediated signaling. The  $\beta$ 2-adrenoreceptor coupled to the long splice variant of Gs has properties of a constitutively active receptor. *J Biol Chem* 273:5109–5116.
- Semenova I, Ikeda K, Ivanov P, Rodionov V**, 2009. The Protein Kinase A-Anchoring Protein Moesin is Bound to Pigment Granules in Melanophores. *Traffic* 10: 153–160.
- Shao J, Welch WJ, Diamond MI**, 2008. ROCK and PRK-2 mediate the inhibitory effect of Y-27632 on polyglutamine aggregation. *FEBS Lett* 582(12): 1637–1642.
- Smart R, Kiely A, Beale M, Vargas E, Carraher C, Kralicek AV, Christie DL, Chen C, Newcomb RD, Warr CG**, 2008. *Drosophila* odorant receptors are novel seven transmembrane domain proteins that can signal independently of heterotrimeric G proteins. *Ins Biochem Mol Bio* 38: 770– 780.

- Smith A, Bracke M, Leitinger B, Porter JC, Hogg N**, 2003. LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci* 116, 3123–3133.
- Smith FD, Langeberg LK, Scott JD**, 2006. The where's and when's of kinase anchoring. *Trends Biochem Sci* 31: 316–323.
- Socha R, Kodrík D, Šimek P, Patocková M**, 2004. The kind of AKH-mobilized energy substrates in insects can be predicted without a knowledge of the hormone structure. *Eur J Entomol* 104: 29–35.
- Stack C, Lucero AJ, Shuster CB**, 2006. Calcium-responsive contractility during fertilization in sea urchin eggs. *Develop Dynam* 235: 1042–1052.
- Stevens JM, Galyov EE, Stevens MP**, 2006. Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 4: 91–101.
- Stevens M, Merilaita S**, 2009a. Defining disruptive coloration and distinguishing its functions. *Phil Trans R Soc B* 364: 481-488.
- Stevens M, Merilaita S**, 2009b. Animal camouflage: current issues and new perspectives. *Phil Trans R Soc B* 364: 423-427.
- Stuart-Fox D, Moussalli A**, 2008. Selection for social signalling drives the evolution of chameleon colour change. *PLoS Biol* 6(1): e25. doi:10.1371/journal.pbio.0060025
- Stuart-Fox D, Moussalli A**, 2009. Camouflage, communication and thermoregulation: lessons from colour changing organisms. *Phil Trans R Soc B* 364: 463-470.
- Su WJ, Zhang Q, Moalem J, Tse J, Scholz PM, Harvey R**, 2005. Functional effects of C-type natriuretic peptide and nitric oxide are attenuated in hypertrophic myocytes from pressure-overloaded mouse hearts. *Am J Physiol, Heart and Circulatory Physiology* 288: 1367–1373.
- Sutherland RL, Mähgler LM, Hanlon RT, Urbas AM, Stone MO**, 2008. Cephalopod coloration model. I. Squid chromatophores and iridophores. *J. Opt. Soc. Am. A* 25(3): 588-599.
- Svitkina TM, Verkhovsky AB, McQuade KM, Borisy GG**, 1997. Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: Mechanism of cell body translocation. *J Cel Biol* 139: 397–415.
- TA Cleland, Selverston AI**, 1998. Inhibitory glutamate receptor channels in cultured lobster stomatogastric neurons. *J Neurophysiol* 79:3189-3196.

- Tamura M, Nakao H, Yoshizaki H, Shiratsuchi M, Shigyo H, Yamada H, Ozawa T, Totsuka J, Hidaka H**, 2005. Development of specific Rho-kinase inhibitors and their clinical application. *Biochim Biophys Acta* 1754: 245–252.
- Taylor JD**, 1992. Does the introduction of a new player, the endoplasmic reticulum, create more or less confusion in understanding the mechanism(s) of pigmentary organelle translocations. *Pigment Cell Res* 5: 49-57.
- Théry M, Casas J**, 2009. The multiple disguises of spiders: web colour and decorations, body colour and movement. *Phil Trans R Soc B* 364: 471-480.
- Thompson RF, Langford GM**, 2002. Myosin superfamily evolutionary history. *Anat Record* 268 (3): 276–289.
- Thurman CL**, 1988. Rhythmic physiological colour change in Crustacea—a review. *Comp Biochem Physiol C* 91: 171–185.
- Thurman CL**, 1990. Adaptative coloration in Texas fiddler crab (*Uca*). In: Wicksten, M. (Ed.), *Adaptative Coloration in Invertebrates: Animal Behavior*. Texas A and M Univ. Press, College Station, TX, pp. 109–125.
- Tokuoka H, Goda Y**, 2006. Myosin Light Chain Kinase Is Not a Regulator of Synaptic Vesicle Trafficking during Repetitive Exocytosis in Cultured Hippocampal Neurons. *J Neurosci* 26(45): 11606–11614.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R, Sibley D**, 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev.* 62(3): 405-96.
- Tuma MC, Gelfand VI**, 1999. Molecular Mechanisms of Pigment Transport in Melanophores. *Pig Cell Res* 12: 263-294.
- Tuma MCB, Castrucci, AMD, Josefsson L**, 1993. Comparative activities of the chromatophorotropins RPCH, alpha-PDH, and beta-PDH on 3 crustacean species. *Physiol Zool* 66: 181–192.
- Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S**, 1997. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389: 990–994.
- Ugür O, Oner SS, Molinari P, Ambrosio C, Sayar K, Onaran HO**, 2005. Guanine nucleotide exchange-independent activation of G<sub>s</sub> protein by  $\beta_2$ -Adrenoceptor. *Mol Pharmacol* 68: 720–728.

- Vale RD**, 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112: 467–480.
- Van de Verdonk FC**, 1962. Mechanism of hormone action in color change in amphibian. *Gen Comp Endocrinol* 2: 623-624.
- Van der Horst D, Van Marrewijk WJA, Vullings HGB, Diederens JHB**, 1999. Metabolic neurohormones: Release, signal transduction and physiological responses of adipokinetic hormones in insects. *Eur J Entomol* 96: 299-308.
- Vancoillie G, Lambert J, Mulder A, Koerten HK, Mommaas AM, Van Oostveldt P, Naeyaert JM**, 2000. Cytoplasmic dynein colocalizes with melanosomes in normal human melanocytes. *Br J Dermatol* 143: 298–306.
- Vargas MA, Cruz BP, Maciel FE, Geihs MA, Cousin JCB, Trindade GS, Baisch ALM, Allodi S, Nery LEM**, 2008. Participation of nitric oxide in the color change induced by UV radiation in the crab *Chasmagnathus granulatus*. *Pig Cell Mel Res* 21: 184–191.
- Visconti MA, Ramanzini GC, Camargo CR, Castrucci AML**, 1999. Elasmobranch color change: a short review and novel data on hormone regulation. *J Exp Zool* 284: 485–491.
- Wang J, Weigand L, Foxson J, Shimoda LA, Sylvester JT**, 2007.  $Ca^{2+}$  signaling in hypoxic pulmonary vasoconstriction: effects of myosin light chain and Rho kinase antagonists. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 293: 674-685.
- Wehland J, Osborn M, Weber K**, 1977. Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth. *Cell Bio* 74 (12): 5613-5617.
- Wettschureck N, Offermanns S**, 2002. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *Journal of Molecular Medicine* 80: 629–638.
- Wong SF-K, Garbers DL**, 1992. Receptor guanylyl cyclases. *J Clin Invest* 90: 299-305.
- Wong W, Scott JD**, 2004. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 959–970.
- Wu X, Bowers B, Rao K, Wei Q, Hammer JA**, 1998. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function in vivo. *J Cell Biol* 143(7):1899-1918.
- Wu X, Bowers B, Wei Q, Kocher B, Hammer JAI**, 1997. Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: evidence that myosin V is an organelle motor. *J Cell Sci* 110: 847-859.

- Wu X, Guo R, Chen P, Wang Q, Cunningham PN**, 2009. TNF induces caspase-dependent inflammation in renal endothelial cells through a Rho and myosin light chain kinase dependent mechanism. *Am J Physiol. Renal Physiology* 297:316-326.
- Yang P, He S, Zheng P**, 2007. Investigation into the signal transduction pathway via which heat stress impairs intestinal epithelial barrier function. *J Gastroenterol Hepatol* 22: 1823–1831.
- Yang WJ, Aida K, Nagasawa H**, 1999. Characterization of chromatophorotropic neuropeptides from the Kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Gen Comp Endocrinol* 114: 415–424.
- Ziegler R, Jasensky RD, Morimoto H**, 1995. Characterization of the adipokinetic hormone receptor from the fat body of *Manduca sexta*. *Regul Pept* 57:329-338.
- Zralá J, Kodrík D, Zahradnícková H, Zemek R, Socha R**, 2010. A novel function of red pigment-concentrating hormone in crustaceans: *Porcellio scaber* (Isopoda) as a model species. *Gen Comp Endocrinol* 166 (2): 330-336.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)