

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Animal Comparada

Sinalização do óxido nítrico na dispersão pigmentar induzida pela radiação ultravioleta em melanóforos do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*

Tese defendida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE em Ciências Fisiológicas

Biol. Marcelo Alves Vargas

Orientador: Dr. Luiz Eduardo Maia Nery
Co-Orientadora: Dr. Ana Luiza Muccillo Baisch

Dezembro de 2005

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Animal Comparada pela oportunidade de desenvolver o projeto e também pelas grandes experiências profissionais oferecidas durante o curso.

Agradeço ao meu querido orientador, Luiz Eduardo Maia Nery (Carioca), por sua amizade e exemplo de profissionalismo oferecido durante o desenvolvimento desta dissertação, nunca medindo esforços para que os experimentos fossem realizados. Obrigado por você ser, não apenas um orientador, mas um amigo que podemos contar.

Agradeço a minha co-orientadora Ana Luiza Muccilo Baisch pelas orientações e sugestões.

Agradeço também a professora Dra. Maria Aparecida Visconti, por fazer parte desta banca e por suas sugestões que, com certeza, enriquecerão este trabalho.

Não posso deixar de agradecer também a professora Dra Gilma Trindade, não apenas por fazer parte desta banca, mas também por suas palavras de força e incentivo durante o curso.

Agradeço também a Dona Neuza Nery (mãe do Carioca) pela acolhida tão carinhosa em sua casa que jamais esquecerei.

Agradeço a professora Dra. Silvana Allodi pela oportunidade oferecida de desempenharmos um trabalho em seu departamento, e também pelas orientações que tanto enriqueceram este trabalho.

Não posso deixar de agradecer aos colegas de laboratório que tanto me ajudaram com sua amizade e incentivos. Com o risco de esquecer alguém,

porém desde já peço desculpas (Dazinha, Rosi, Juliana, Marlize, Camila, Thaís, Mariana, Odila, Luciane, Carine e Bianca). Pessoal, como foi bom conhecer vocês e ver que não éramos apenas colegas, mas amigos que podiam contar um com os outros para alcançar um ideal.

Agradeço também a uma turminha muito importante (Fábio, Bruno e Márcio). Guris valeram a pena nossas noites no laboratório, nossas risadas, nossas correrias, nossas coletas. Vocês foram muito importantes para a realização desta dissertação.

Agradeço também ao pessoal da minha igreja que sempre esteve ao meu lado incentivando e orando para que este trabalho fosse realizado.

Não esquecerei de agradecer a minha maravilhosa família, a minha galerinha. Galerinha (Tios e primalhada), como vocês são importantes para mim. Sei que o exemplo de vida e o amor encontrado quando precisei foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui.

Não posso deixar de agradecer também a minha sogra (Dona Sandra), sogro (Seu Abelardo) e cunhada (Carol) por toda força e carinho mandados mesmo de longe, sei que as suas palavras de apoio foram fundamentais para eu seguir a caminhada.

Agradeço a minha querida vizinha que sempre esteve ao meu lado me dando o carinho e amor necessário para alcançar a vitória.

Agradeço também a minha maninha querida (Vanessa) que sempre estava na volta me fazendo rir, mesmo que as coisas não parecessem engraçadas. Mana você é um presente de Deus pra mim, a minha florzinha linda, te amo!!!.

Agradeço aos meus queridos pais (Ironi e Carmen) por todo incentivo e amor que sempre me deram. Pai, como é bom chegar em casa e escutar as mesmas piadas de sempre. Teus exemplos de vida, de pai e de servo de Deus sempre foram fundamentais para que meus sonhos se tornassem realidade. Mãe, como é bom sentir o teu carinho sempre que chegava de um dia de trabalho cansativo. Obrigado por você ser este exemplo de mulher e serva de Deus. Tuas palavras de apoio foram fundamentais para que eu pudesse vencer mais essa batalha. Pai e Mãe amo vocês!!!

Agradeço a minha querida carioca, minha linda namorada. Amor, como foi bom te conhecer, tuas doces palavras foram determinantes para eu ir adiante. Teu olhar, teu sorriso me encantam. Sei que esta é apenas a primeira de muitas vitórias que iremos alcançar. Te amo !!!!!

Por fim gostaria de agradecer ao meu Deus. Sei Senhor que esta realização nunca teria acontecido se TU não estiveste comigo me dando a força e a alegria para eu caminhar mesmo em meio às dificuldades. TE AMO SENHOR!!!

SUMÁRIO

1. RESUMO GERAL	6
2. INTRODUÇÃO GERAL	8
3. OBJETIVOS	25
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVO ESPECÍFICO	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
5. ARTIGO A SER SUBMETIDO A REVISTA PIGMENT CELL RESEARCH	34
PARTICIPATION OF NITRIC OXIDE IN THE COLOR CHANGE INDUCED BY UV RADIATION IN THE CRAB CHASMAGNATHUS GRANULATUS	35
<i>SUMMARY</i>	36
<i>INTRODUCTION</i>	37
<i>RESULTS</i>	41
<i>DISCUSSION</i>	43
<i>MATERIAL AND METHODS</i>	48
<i>REFERENCES</i>	54
<i>LEGENDS</i>	60
7. APÊNDICE	70

RESUMO GERAL

Esta dissertação teve como objetivo investigar a participação do óxido nítrico (NO) na dispersão pigmentar induzida pela radiação ultravioleta (UV) nos melanóforos do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*. Para tanto foram verificados os efeitos de vários fármacos moduladores da produção de NO em ensaios *in vivo* e *in vitro*, bem como foi feita a análise histológica da presença da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na epiderme deste caranguejo.

Primeiramente, testamos se a produção de NO, por si só, induzia a dispersão pigmentar nos melanóforos de *Chasmagnathus granulatus*. Para isso, os meropoditos do terceiro par de maxilípedes foram expostos a diferentes concentrações de um potente doador de NO, o SIN-1. Estes melanóforos apresentaram dispersão pigmentar dose dependente à medida que se aumentava a concentração deste fármaco no meio.

Em um segundo passo, analisamos a ação sinalizadora do NO na mudança de cor induzida pela radiação UV em *Chasmagnathus granulatus*. Para tanto animais apedunculados foram expostos a diferentes doses de UVA (6,4; 1,5; 0,6; 0,2; 0,07 J/cm²) e UVB (8,1; 3,1; 1,2; 0,9; 0,6; 0,03 J/cm²). Estes animais recebiam a injeção (100 μ L) de L-NAME (500nmol/animal), PTIO (10 nmol/animal), BSO (14,5 nmol/animal) ou solução fisiológica (controles) 15 min antes da exposição.

Os animais expostos a radiação UVA e previamente injetados com L-NAME apresentaram uma inibição da resposta pigmentar quando comparados com os animais controles. O mesmo pode ser verificado na exposição a radiação UVB.

Já os animais que receberam PTIO apresentaram diferentes respostas quando expostos a radiação UVA ou UVB. O PTIO foi capaz de inibir a resposta pigmentar induzida pela radiação UVA, porém isto não foi percebido quando estes animais foram expostos a radiação UVB.

Em uma próxima etapa, investigamos se o aumento da concentração de espécies reativas induziria a formação não enzimática de NO. Para isso utilizamos o BSO, um inibidor da γ -glutamilcisteína, uma enzima chave para a formação de GSH. Os animais expostos a radiação UVA e previamente injetados com BSO não apresentaram diferença na resposta pigmentar quando comparados aos animais controles.

Em uma última etapa, investigamos a localização da NOS na epiderme do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*. Desta forma, foram feitos cortes histológicos submetidos a duas técnicas que determinam a presença da NOS, a NADPH-diaforase e a imunocitoquímica contra um anticorpo da nNOS. Os cortes histológicos foram positivos para ambas técnicas revelando que a NOS está presente no epitélio do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*.

Estes resultados sugerem que o NO é uma importante molécula para induzir dispersão pigmentar nos melanóforos do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* e, além disso, a NOS parece estar envolvida no processo de sinalização da resposta pigmentar induzida pela radiação UV.

INTRODUÇÃO GERAL

A coloração dos animais se deve a presença de pigmentos. Os principais pigmentos envolvidos com a coloração animal incluem as melaninas, omocromos, carotenóides, purinas e pteridinas. Estes pigmentos são sintetizados e/ou armazenados dentro de células denominadas células pigmentares ou cromatóforos. Estes cromatóforos estão localizados principalmente na epiderme do animal e dependendo da cor e do tipo de pigmento, recebem denominação própria: melanóforos (preto/marrom - omocromo ou melanina), leucóforos (branco - purinas), eritróforos (vermelho - carotenóides e pteridinas), xantóforos (amarelo - carotenóides e purinas) e iridóforos (branco ou prata - purinas) (Hadley, 1996).

Vários animais possuem a capacidade de alterar a sua coloração corpórea. Esta mudança de cor pode ocorrer através de dois processos: um lento, denominado de mudança de cor morfológica e um rápido, denominado mudança de cor fisiológica. O processo de mudança de cor morfológica envolve o aumento da quantidade de pigmento e/ou a proliferação de células pigmentares, sendo visível apenas após várias horas ou alguns dias depois do início do processo. Este tipo de mudança de cor é encontrado em todos os animais e é o único que ocorre em aves e mamíferos (Hadley, 1996). A mudança de cor rápida ou fisiológica envolve o deslocamento de pigmentos ao longo do citoesqueleto celular. Esse processo ocorre em invertebrados e em vertebrados de sangue frio como peixes, anfíbios e répteis.

Muitos estímulos ambientais são determinantes para que ocorra o processo de mudança de cor. Dentre eles, podemos citar a cor do substrato. A

mudança de cor em resposta a este estímulo é também chamada de camuflagem, servindo como estratégia para o escape da predação ou para a própria prática da predação. Alguns exemplos mais visíveis da adaptação da cor do substrato em crustáceos são observados em camarões. O camarão *Crangon sp.* pode se adaptar conforme as cores branco, preto, cinza, amarelo, vermelho e laranja do substrato (Koller, 1927) e o camarão *Palaemonetes sp.* pode se adaptar ao fundo de cor branco, preto, cinza, azul, verde, amarelo e vermelho (Brown, 1935; Robison e Charlton, 1973). Outro fator que influencia a mudança de cor é o fotoperíodo, é o que ocorre em hamsters (Hoffman, 1978). Este tipo de fator ambiental parece estar relacionado com o hormônio melatonina que indica a condição fotoperiódica a que o organismo está exposto. A temperatura é outro fator ambiental que influencia a mudança de cor nos animais, é o que se verifica no lagarto *Sceloporus jarrovi* (Sherbrooke *et al.*, 1994) e em várias espécies de caranguejos do gênero *Uca* (Thurman, 1990). Um fator ambiental também bem conhecido por determinar a mudança de cor nos animais é a radiação solar, incluindo a luz visível e a radiação ultravioleta (UV).

Existe hoje uma preocupação mundial sobre o aumento da incidência da radiação UV sobre a superfície terrestre. A radiação UV compreende uma faixa de comprimento de onda eletromagnética que varia entre 200 e 400 nm. Considerando sua capacidade de causar danos em diferentes alvos celulares, a radiação UV foi dividida, para fins biológicos, em três faixas de comprimento de onda: UVA, UVB e UVC. A faixa de UV que compreende o UVA e o UVB é também chamada de UV solar (Diffey, 2002). A camada de ozônio, que está situada na estratosfera entre 15 e 50 Km de altura, forma um escudo protetor

natural da Terra, contra as radiações UV provenientes do sol, barrando principalmente comprimentos de ondas menores de 320nm. A ação humana liberando compostos como CFCs e BrFCs, vem provocando progressivamente a diminuição da camada de ozônio e com isso aumentando a incidência de UVB na superfície terrestre.

Sabe-se hoje que a radiação UV estimula os processos de mudança de cor morfológica em vários vertebrados (Bagnara e Hadley, 1973; Gilcherest *et al.*, 1999; Allan *et al.*, 1995; Lesser, 2001). Nos mamíferos a primeira e principal estrutura alvo da radiação UV é a superfície corpórea. Em meio a esta estrutura, estão localizadas as células pigmentares responsáveis pela mudança de cor. Estas células em mamíferos são conhecidas como melanócitos. Os melanócitos epidérmicos realizam um papel central na determinação do bronzeamento. Os melanócitos representam de 8 a 10% de todas as células da epiderme.

Os pigmentos produzidos nos melanócitos ficam no interior de organelas denominadas melanosomos e são transferidos aos queratinócitos vizinhos dando a coloração da pele. O conjunto dessas células epidérmicas associadas a um melanócito constitui a unidade funcional da pigmentação nos mamíferos (Hadley, 1996). A melanina que é o pigmento produzido por estes melanócitos pode ser de dois tipos: eumelanina, de cor marrom a preta, ou feomelanina, de cor parda a avermelhada. A quantidade produzida de cada tipo de melanina define os diferentes padrões de coloração da pele ou da pelagem dos mamíferos.

O aumento da pigmentação da pele de mamíferos em resposta a exposição ao UV se dá através de dois processos: O escurecimento imediato,

o qual ocorre dentro de minutos após a exposição, e um tardio que é o bronzeamento de fato, do qual ocorre na espécie humana após 2 ou 3 dias da exposição ao Sol. O escurecimento imediato é induzido primeiramente pelo UVA, que é uma fotoxidação da melanina preexistente. Esse efeito imediato envolve a reorganização de filamentos intermediários nos melanócitos e queratinócitos, bem como o aumento da formação de dendritos, para facilitar a transferência do conteúdo de melanina dos melanosomos, para os queratinócitos. O efeito tardio é induzido pelo UVA e UVB, e envolve o aumento do número de melanócitos funcionais, da melanogênese, e da síntese e transferência, bem como o empacotamento dos melanosomos (Kadokaro *et al.*, 2003).

O processo de sinalização da radiação UV na mudança de cor em mamíferos não é totalmente conhecido. Mas são sugeridas duas hipóteses como vias estimulatórias para o processo de mudança de cor. A radiação UV estimulando diretamente as células pigmentares ou estimulando indiretamente com o auxílio de fatores parácrinos sintetizados por outras células não pigmentares. Dentre os fatores parácrinos envolvidos na resposta a exposição a radiação UV podemos citar as endotelinas, eicosanóides como as prostaglandinas, hormônios originados da POMC, como o α -MSH e o ACTH e as histaminas. Além desses, uma atenção especial tem sido direcionada ao óxido nítrico (NO) como um dos fatores parácrinos que sinalizam a resposta a exposição a radiação UV.

O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. O NO é uma molécula gasosa simples formada por um átomo de nitrogênio (N) e um átomo de oxigênio (O), habitualmente encontrada no ar

atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxico devido à presença de um radical livre (elétron extra) que o torna um agente químico altamente reativo. O NO possui uma meia vida de menos de 10 segundos no plasma devido a sua rápida oxidação a nitrito e a nitrato. Ele possui afinidade ao ferro ligando-se facilmente a hemoglobina e outras proteínas que contenham o núcleo heme, levando ao término de sua atividade biológica (Snyder e Bredt, 1992). O substrato para a formação do NO no organismo é a L-arginina. Além de participar do ciclo da uréia, a L-arginina está envolvida na síntese de creatina e de poliaminas pelo fornecimento de ornitina (Konturek e Konturek, 1995).

As enzimas que convertem L-arginina em L-citrulina e NO são conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS) (Fig.1). Estas enzimas são hemoproteínas da família "citrocromo-like". As NOS são dependentes de O₂, NAPH, flavinas e biopterinas para exercerem a sua atividade. A síntese do NO envolve duas etapas. A primeira ocorre pela hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar N^G-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio (O₂) e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e citrulina. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH₄) são utilizados como co-fatores na reação (Marletta *et al.*, 1988; Marletta, 1994).

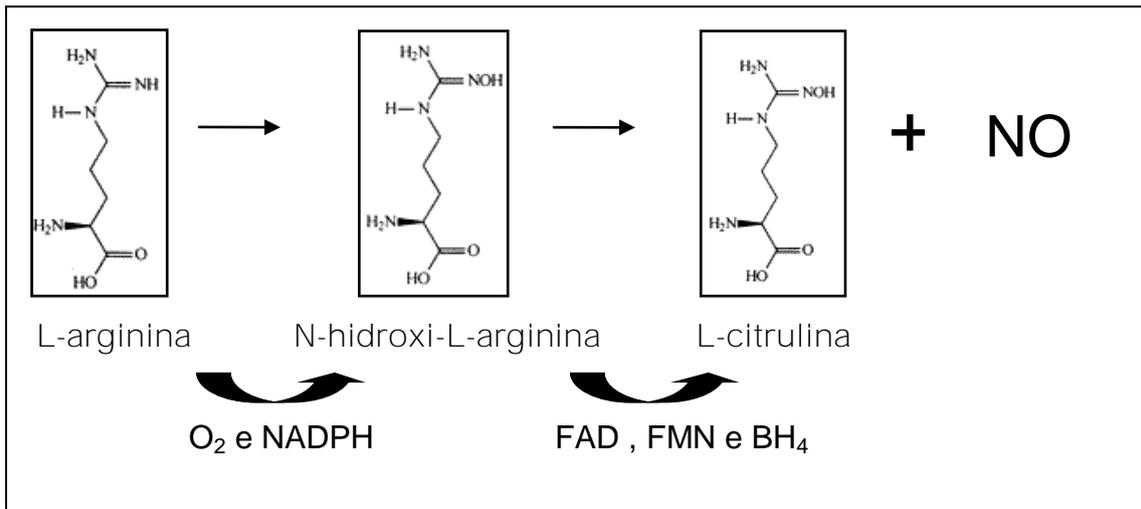


Fig. 1. Formação de NO

Até então foram isoladas e clonadas três isoformas da NOS (Nishida *et al.*, 1992; Lyons *et al.*, 1992; Bredt e Snyder, 1990) sendo duas constitutivas e uma induzível. As cNOS (óxido nítrico sintase constitutiva), que compreendem a eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e nNOS (óxido nítrico sintase neuronal), diferem da iNOS (óxido nítrico sintase induzível) quanto ao peso molecular, a forma de ativação e a capacidade de síntese de NO (Marlleta, 1994). Todas as três isoformas são semelhantes estruturalmente, porém reguladas de modo diverso e induzidas a partir de genes localizados nos cromossomos 7 (nNOS), cromossomo 12 (iNOS) e cromossomo 17 (eNOS) (Wang e Mardsen, 1995) (Fig.2).

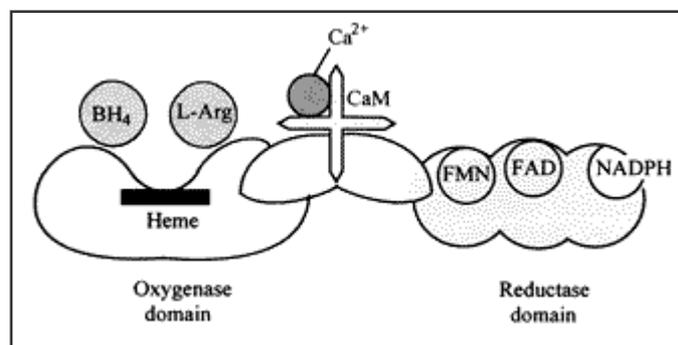


Fig. 2 Estrutura da NOS

A nNOS é uma enzima encontrada nas células cerebrais de vários animais, e está associada normalmente a formação do aprendizado e memória (Knowles *et al.*, 1989; Bredt e Snyder, 1989). O NO é um potente neurotransmissor atuando na fenda sináptica de forma característica. Neurotransmissores são lançados na fenda sináptica onde se ligam aos receptores de glutamato (NMDA) aumentando a incidência de Ca^{+2} no neurônio pós sináptico e, através da união de cálcio e calmodulina, ativam a nNOS a produzir mais NO, que irá atuar no neurônio pré-sináptico aumentando a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Esse processo é chamado de LTP do inglês “long term potentiation” do qual mantém por um tempo maior a célula despolarizada constituindo a memória de longa duração.

A iNOS (óxido nítrico sintase induzível) como o próprio nome já indica não é constitutível, ou seja, não está presente de forma habitual, necessitando portanto, de um estímulo para que seja sintetizada. Em mamíferos, ela é induzida em macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e plaquetas por substâncias envolvidas no processo imune como as citoquinas e lipopolissacarídeos (Stuehr *et al.*, 1991; Moncada *et al.*, 1991). Vários grupos já clonaram a iNOS também em músculos (Teng *et al.*, 1998), hepatócitos de camundongo (Stuehr *et al.*, 1991) e hepatócitos humanos (Geller *et al.*, 1993). Uma vez induzida a iNOS é capaz de produzir o NO por longo tempo e em grande quantidade, e isso vem a caracterizar seu envolvimento em vários processos patológicos. Assim, o alto nível de NO produzido por macrófagos ou neutrófilos ou outras células ativadas, que deveriam ser tóxicas para micróbios parasitas ou células tumorais, podem

também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios e autoimunes.

A eNOS é expressa constitutivamente nas células endoteliais ou nas plaquetas, podendo também ser chamadas de cNOS do inglês “endothelial constitutive NO synthase”.

De acordo com a característica de duração da atividade da NOS, elas podem ser caracterizadas como de alto e baixo débito. A nNOS e eNOS são consideradas de baixo débito estando envolvidos em processos homeostáticos como a neurotransmissão, peristaltismo, controle imediato da pressão arterial. A eNOS é considerada de menor débito que a nNOS. Já a iNOS quando estimulada permanece em alta atividade por horas.

Outra classificação é determinada pela dependência ou não de cálcio para a sua ativação. A cNOS ou NOS constitutivas (eNOS e nNOS) necessitam de uma concentração de Ca^{+2} intracelular para a atividade enzimática, ocorrendo inativação da cNOS quando a concentração de Ca^{+2} citoplasmático está abaixo do nível determinado. Para a iNOS o mecanismo de ação depende da concentração intracelular de Ca^{+2} somente para ativação, sendo que a queda de Ca^{+2} intracelular não inibe a atividade da iNOS. As eNOS e nNOS são consideradas como cálcio-dependentes e a iNOS é classificada como cálcio-independente.

Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos, como o N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA), N^G -nitro-L-arginina (L-NNA) e N^G -nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Vale salientar que a D-arginina não substituí a L-arginina nesta reação para formação do NO. Além destes inibidores, a aminoguanidina é também capaz de inibir a NOS e

apresenta uma relativa seletividade para a iNOS (Szabó, 1995). Vários destes inibidores têm sido utilizados em estudos da função do NO, tanto em células isoladas como em *vitro*.

Até meados da década de 80, o óxido nítrico era considerado apenas um membro de uma família de poluentes ambientais e carcinógenos potenciais. Durante todo este período, acreditou-se que óxidos de nitrogênio inorgânicos eram produzidos somente por bactérias, via reações de nitrificação e denitrificação, e que, em mamíferos, estes compostos derivavam da dieta (Szabó, 1995). Mas, a medida que os aspectos fisiológicos e tóxicos do NO começaram a ser estudados descobriu-se que esta molécula é de suma importância para que várias funções fisiológicas dos animais sejam desempenhadas. Um maior impacto ocorreu quando foi demonstrado que camundongos e seres humanos alimentados com uma dieta pobre em nitrato (NO_3^-) excretavam quantidades substanciais deste composto, comprovando, de modo inquestionável, a produção endógena de NO_3^- nos mamíferos (Green *et al.*, 1981b). Posteriormente foi demonstrada a produção de NO_3^- em camundongos isentos de germes, e um estudo do balanço metabólico comprovou a biossíntese de NO_3^- em homens saudáveis (Green *et al.*, 1981a).

A determinação laboratorial do NO em amostras biológicas representa um desafio, pois a sua concentração é ínfima e a meia vida extremamente curta com cerca de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos (Kiechle e Marlinski, 1993; Archers, 1993). Muitos métodos utilizando as mais avançadas tecnologias têm sido propostos para a determinação do NO, tanto direta como indiretamente. Diretamente o NO pode ser detectado utilizando metodologias como a ressonância eletrônica para-magnética (EPR) e a

quimioluminescência e por detecção eletroquímica, utilizando sensores intravasculares. Indiretamente o NO pode ser detectado por dosagem plasmática ou urinária de nitrito e nitrato, GMPc, L-Citrulina, da detecção de nitrosil hemoglobina nas hemácias circundantes, do uso de inibidores da NOS, da determinação da atividade da NOS e da quantificação histoquímica da NOS, como a técnica da NADPH-diaforese (Dusse *et al.*, 2003).

O NO também é um importante mensageiro intracelular. O mecanismo de sinalização intracelular é em geral realizado por receptores de membrana celular, chamados de receptores transmembranosos. Pela suas características químicas de alta difusibilidade, a sinalização do NO é exercida diretamente em nível intracelular, sem receptores transmembranosos. Devido à sua penetração intracelular sem intermediários membranosos, o organismo utiliza o NO em funções fisiológicas em que é necessária uma resposta rápida (Flora Filho e Zilberstein, 2000).

O NO foi pela primeira vez caracterizado como uma molécula efetora no endotélio vascular, mais precisamente no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. O interesse por esta questão teve origem nas conclusões de Furchgott e Zawadzki (1980) de que a ação de vasodilatadores como a acetilcolina, na presença do endotélio intacto, envolvia a liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular, o qual chamaram de EDRF (endothelium derivated relaxing factor). Rapoport e Murad (1983) informaram que o mecanismo pelo qual o EDRF causava o relaxamento vascular era mediado pela guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Após alguns anos, estudos (Ignarro, 1987; Moncada *et al.*, 1988; Sakurai *et al.*, 1995) demonstraram que este composto era idêntico ao NO. Posteriormente, esses

investigadores concluíram que o NO era a molécula efetora comum para todos os nitrovasodilatadores, que resultava na dilatação das artérias coronárias, melhorava o suprimento sanguíneo ao coração e conseqüentemente alivia os sintomas da angina.

O NO também possui um papel importante na homeostase das vias aéreas, mantendo também o calibre brônquico. No sistema renal o bloqueio do NO leva a diminuição da irrigação renal e queda da eliminação de sódio (Szabó, 1995). Existe uma correlação entre a liberação de renina e a presença de nNOS nos vasos aferentes pré-glomerulares. O NO é um poderoso vasodilatador cerebral mantendo o fluxo cerebral basal e levando a um aumento do fluxo sanguíneo sob atividade neuronal intensa (Iadecola, 1993).

O NO tem muitas vezes um papel dúbio nos processos orgânicos e foi o que levou uma gama de pesquisadores a analisarem a sua ação destruidora. Beckman e Koppenol (1996) informaram que muitas espécies reativas eram compostas de óxidos de nitrogênio. O NO resultante da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a eliminação de microorganismos, parasitas e células mutadas por algum processo. Em processos inflamatórios são liberados, juntos com o NO, intermediários reativos de oxigênio, provavelmente aumentando a ação citotóxica. Uma ação tóxica cooperativa de NO e ânion superóxido (O_2^-) resulta na formação de peroxidonítrico ($ONOO^-$), um poderoso oxidante de proteínas. O $ONOO^-$ pode protonar-se na presença de um íon hidrogênio (H^+), originando um radical altamente reativo e tóxico, a hidroxila ($\cdot OH$), aumentando efetivamente a ação tóxica do NO e do O_2^- (Beckman e Koppenol, 1996). A célula produtora e as células vizinhas não estão a salvo da ação tóxica destas moléculas, podendo ser lesadas ou

destruídas. Evidências estão se acumulando no sentido de admitir que o NO contribui para algumas condições patológicas como a asma (Hamid *et al.*, 1993), artrite reumática (Sakurai *et al.*, 1995), lesões artereoscleróticas (Buttery *et al.*, 1996), tuberculose (Nicholson *et al.*, 1996), esclerose múltipla (Bagasra *et al.*, 1995) e Alzheimer (Vodovotz *et al.*, 1996).

Também é importante considerar que molécula de O₂ é indispensável para muitos processos biológicos, porém, em contrapartida esta molécula é capaz de gerar radicais livres. Esses radicais são originados em processos metabólicos aeróbicos. Na redução do O₂ a H₂O são acrescentados elétrons e prótons gerando ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH⁻). Todos os componentes celulares são susceptíveis, principalmente ao radical hidroxila. Ataques em proteínas podem levar a modificação de aminoácidos, oxidação de grupos sulfridrilas levando a mudanças conformacionais, alteração da atividade enzimática, crosslinking, clivagem de cadeias de peptídeos tão bem quanto modificação em carboidratos e glicoproteínas, perda de metais em metaloproteínas e aumento da susceptibilidade proteolítica (Stadtman, 1992; Sies, 1993; Storey 1996). As espécies reativas de oxigênio (ROS) causam também danos de DNA (mutações) e lipoperoxidação modificando a fluidez da membrana plasmática (Sies, 1993).

Por causa dos efeitos das ROS, todas as células possuem um sistema de defesa característico. Três níveis de proteção são considerados: 1) Prevenir a formação de ROS, 2) Capturar as ROS utilizando radicais livres ou enzimas antioxidantes, 3) Reparo dos componentes celulares danificados.

As defesas não enzimáticas incluem glutathione (GSH), alfa-tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), beta caroteno e ácido úrico. As enzimas que participam da defesa antioxidante atuam com um sistema combinado e incluem a superóxido dismutase (SOD), a qual catalisa o radical superóxido, a catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) que atuam na degradação de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos, respectivamente. Numa segunda linha de defesa estão as enzimas relacionadas com o metabolismo da glutathione. A Glutathione S-transferase (GST) catalisa a conjugação da redução da GSH a xenobióticos nucleofílicos ou componentes celulares danificados pelas ROS levando a detoxificação. Para a renovação da glutathione torna-se necessário um processo de oxi-redução e desta forma a glutathione redutase (GR) reduz a glutathione oxidada tornando apta para a utilização da GPX, enquanto que a GST novamente oxida a glutathione (Storey, 1996).

Como já comentado, em mamíferos, o aumento da melanogênese induzida pela radiação UV é dependente de fatores parácrinos. Atualmente dentre estes fatores envolvidos no processo de mudança de cor, o NO tem recebido uma atenção especial. Estudos mostram que queratinócitos humanos expostos a UV geram NO provocando um aumento da expansão dos dendritos dos melanócitos e da melanogênese (Romero-Graillet *et al*, 1996; Romero-Graillet *et al.*, 1997). Além disso, substâncias doadoras de NO ativam a dispersão pigmentar nos melanóforos do teleósteo *Zacco temminckii* e *Kryptopterus bicirrhis* (Fujii e Hayashi, 1996). Mas contrário a estes, outro estudo demonstra que o NO é tóxico a melanócitos *in vitro* (Iuga et al, 2004), resultando desta forma, em uma desordem nas funções pigmentares destas

células. A presença da NOS já foi detectada em muitos invertebrados indicando que o NO possa estar relacionado com muitos processos de sinalização (Aonuma *et al.*, 2000; Aonuma e Newland, 2001, 2002; Erxleben e Hermann, 2001; Hermann e Erxleben, 2001; Johansson e Mellon, 1998; Mahadevan *et al.*, 2004). Apesar dos fortes indícios de que o NO esteja envolvido na sinalização da mudança de cor em vertebrados, nenhum estudo foi feito ainda na tentativa de caracterizar a participação do NO na sinalização da dispersão pigmentar em resposta a radiação UV nos crustáceos.

Em crustáceos a mudança de cor está principalmente vinculada ao Complexo Órgão X-Glândula do Seio. Nele são sintetizados hormônios que regulam o processo. Dentre eles podemos citar o RPCH (Hormônio concentrador de pigmentos vermelhos) e o PDH (Hormônio dispersador de pigmento). O RPCH (Glu-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-Trp-NH₂) foi isolado pela primeira vez no pedúnculo ocular de *Pandalus borealis* provocando uma atividade agregadora de pigmentos vermelhos (Ferland e Josefsson, 1972). O RPCH é um octapeptídeo, extremamente conservado em crustáceos, pertencente a uma família de hormônios de artrópodes junto com os hormônios adipocinéticos de insetos (Gäde, 1990). Além dos eritróforos, outros cromatóforos sofrem a ação do RPCH, como os leucóforos em *P. borealis* (Josefsson, 1975) e melanóforos e xantóforos em *Crangon sp* (Skorkowski e Biegniewska, 1981).

Recentemente, Yang *et al.* (1999) observaram que os diferentes tipos de cromatóforos do camarão *Penaeus japonicus* respondem diferentemente ao RPCH. Uma alta sensibilidade foi observada em eritróforos e xantóforos, enquanto que em leucóforos foi observada baixa sensibilidade. Já os

melanóforos, exibem um grau intermediário de sensibilidade. Entretanto, a agregação pigmentar do RPCH não é generalizada em todos os tipos de cromatóforos, especialmente os melanóforos. A falta de efeitos de RPCH em melanóforos foi verificada no isópodes *Ligia occidentalis* (Rao e Hackett, 1973) e *Ligia exótica* (Tuma *et al.*, 1993) e nos caranguejo *Uca pugilator* (Fingerman, 1973), *Uca rapax* (Tuma *et al.*, 1993) e *Chasmagnathus granulatus* (Granato *et al.*, 2004).

O PDH possui várias isoformas nas diferentes espécies de crustáceos. Todas as isoformas são octadecapeptídeos e exibem uma atividade de dispersão pigmentar em todos os cromatóforos estudados até então. A primeira isoforma a ser caracterizada, foi o -PDH (Asn-Ser-Gly-Met-Ile-Asn-Ser-Ile-Leu-Gly-Ile-Pro-Arg-Val-Met-Thr-Glu-Ala-NH₂) proveniente dos pedúnculos oculares do camarão *Pandalus borealis* (Ferland, 1976), após, o -PDH (Asn-Ser-Glu-leu-Ile-Asn-Ser-Ile-Leu-Gly-Leu-Pro-Lys-Val-Met-Asn-Asp-Ala-NH₂) foi caracterizado nos caranguejos *Uca pugilator* (Rao *et. al.*, 1985), *Cancer magister* (Kleinholz *et al.*, 1986) e *Carcinus maenas* (Löhr *et al.*, 1993). Posteriormente PDHs de outros crustáceos foram caracterizados e classificados como semelhantes ao -PDH ou ao -PDH.

Apesar da função do PDH e do RPCH na migração pigmentar tenha sido bem descrita, alguns estudos sugerem que outros agonistas possam também ter um papel nesta regulação em crustáceos. Uma forte evidência recai sobre o peptídeo cardioativo de crustáceo (CCAP). Esse hormônio é um nonapeptídeo cíclico (Pro-Phe-Cys-Asn-Ala-Phe-Thr-Gly-Cys-NH₂) originariamente identificado e isolado do órgão pericárdico do caranguejo *Carcinus maenas* (Stangier *et al.*, 1987) e descrito como um hormônio ino e cronotrópico positivo,

mas posteriormente identificado em outras regiões do sistema nervoso (Skiebe *et al.*, 1999). Gaus e Stive (1992) verificaram que o CCAP é um agonista dispersador dos pigmentos retinianos dos omatídeos do lagostim *Orconectes limosus*. Posteriormente Nery *et al.* (1999) e Granato *et al.* (2004) verificaram a capacidade do CCAP em induzir dispersão pigmentar nos eritróforos de camarões de água-doce *Macrobrachium potiuna* e nos melanóforos do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*, respectivamente.

Vários estudos mostram que ao se remover o Complexo Órgão X-Glândula do Seio, o animal perde a capacidade de realizar o ritmo circadiano de mudança de cor fisiológica. Estes estudos são confirmados em trabalhos com *Sphaeroma_serratum* (Pigeault, 1958; Daguerre de Hureax, 1967), *Palaemon serratus* (Pasteur, 1958; Humbert, 1965) e *Chasmagnathus granulatus* (Granato *et al.*, 2004). Mas algumas espécies apresentam mudança de cor independente do Complexo Órgão X-Glândula do Seio. É o que ocorre com *Uca pugilator* (Fingerman, 1966) e *Lysmata seticulata* (Chassard-Bouchaud e Couturier, 1969), pois mesmo quando estes animais haviam sido submetidos à ablação do pedúnculo ocular não perdiam o ritmo circadiano de mudança de cor.

O caranguejo *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Grapsidae, Sesarminae) é um animal semiterrestre característico do ambiente estuarino da Lagoa dos Patos, podendo ser encontrado ao longo da costa sul do Brasil, no Uruguai e Argentina. Este caranguejo apresenta um ritmo circadiano endógeno de mudança de cor fisiológica muito característico, apresentando os pigmentos dispersos durante o dia e agregados durante a noite, sendo este ritmo dependente do pedúnculo ocular (Granato *et al.*, 2004). *C. granulatus* também

apresenta mudança de cor fisiológica quando exposto à radiação UV (Gouveia *et al.*, 2004). Seus melanóforos apresentam uma rápida dispersão pigmentar, que desaparece rapidamente quando se retira o UV, retornando ao estado de agregação cerca de 45 min depois da exposição. A mudança de cor influenciada pela exposição ao UV se apresenta dose-dependente tanto para UVA como para UVB. Esta mudança de cor ocorre mesmo quando se realiza a ablação do pedúnculo ocular dos animais, sendo, portanto, independente do Complexo Órgão X-Glândula do Seio. Num estudo posterior foi verificado que a dispersão pigmentar diminuía os danos celulares provocados pela radiação UV (Gouveia *et al.*, 2005). Este fato foi demonstrado considerando regiões do corpo do animal, após a ablação do pedúnculo ocular, com diferenças no grau de agregação pigmentar (cefalotórax e apêndices) e sendo observado que na região onde os melanóforos estavam no estado agregado havia maior dano de DNA e maior atividade de enzimas antioxidantes.

Esta dissertação teve como objetivo investigar a participação do óxido nítrico (NO) na dispersão pigmentar induzida pela radiação ultravioleta (UV) nos melanóforos do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*. Para tanto foram verificados os efeitos de vários fármacos moduladores da produção de NO em ensaios *in vivo* e *in vitro*, bem como foi feita a análise histológica da presença da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na epiderme deste caranguejo.

Objetivo Geral

O objetivo geral desta tese é verificar o envolvimento do óxido nítrico no processo de migração pigmentar induzida pela radiação ultravioleta (UVA e UVB) em melanóforos do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*.

Objetivos específicos:

- 1- Verificar se a aplicação de um bloqueador da óxido nítrico sintase (NOS) influencia a dispersão pigmentar induzida pela radiação ultravioleta.
- 2- Verificar se a injeção de um seqüestrador de óxido nítrico (NO) afeta a dispersão pigmentar induzida pela radiação ultravioleta.
- 3- Verificar se a aplicação de um doador de NO estimula a dispersão pigmentar.
- 4- Verificar se a indução do estresse oxidativo afeta a dispersão pigmentar induzida pela radiação ultravioleta ou por um doador de NO.
- 5- Verificar a existência da óxido nítrico sintase (NOS) nas células epidérmicas de *Chasmagnathus granulatus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aonuma, H., Nagayama, T. e Takahata, M. (2000). Modulatory effects of nitric oxide on synaptic depression in the crayfish neuromuscular system. *J. Exp. Biol.* *203*, 3595-3602.
- Aonuma, H., e Newland, P. L. (2001). Opposing actions of nitric oxide on synaptic inputs of identified interneurons in the central nervous system of the crayfish. *J. Exp. Biol.* *204*, 1319-1332.
- Aonuma, H., e Newland, P. L. (2002). Synaptic inputs onto spiking local interneurons in crayfish are depressed by nitric oxide. *J. Neurobiol.* *52*, 144-155.
- Allan, A. E., Archambaut, M., Messana, E., e Gilchrest, B. A. (1995). Topically applied diacylglycerols increase pigmentation in guinea pig skin. *J. Invest. Dermatol.* *105*, 687-692.
- Archers, S. (1993). Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.* *7*, 349-360.
- Bagasra, O., Michaels, F. H., Zheng, Y. M., Bobroski, L. E., Spitsin, S. V., Fu, Z. F., Tawadros, R., e Koprowski, H. (1995). Activation of inducible form of Inducible nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 12041-12045.
- Bagnara, J. T., e Hadley, M. E. (1973). *Chromatophores and color change: The comparative physiology of animal pigmentation* (New Jersey: Prentice Hall Inc.).
- Beckman, J.S., e Koppenol, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.* *271*, C1424-1437.
- Bredt, D.S., e Snyder, S.H. (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *86*, 9030-9033.
- Bredt, D.S., e Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 682-685.
- Brown, F. A. jr. (1935). Color change in *Palaemonetes*. *J. Morphol.* *57*, 337-333.
- Buttery, L.D., Springall, D. R., Chester, A. H., Evans, T. J., Standfield, E. N., Parums, D. V., Yacoub, M. H., e Polak, J. M. (1996). Inducible nitric oxide

- synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab. Invest.* *85*, 75-77.
- Chassard-Bouchaud, C., e Couturier, Y. (1969). Etude des phenomenes chromatiques de *Lysmata seticaudata* Risso (Crustace, Decapode). II. Effets de l'ablation des pedoncules ocularres sur le cycle nycthemeral. *Cam. Biol. Mar.* *10*, 173-180.
- Daguere de Hureaux, N. (1967). Etude experimentalr du role de l'organe de bellonci et du lobe optique sur lê comportement chromatique et la mue de *Sphaeroma serratum*. Incndence dès ablations sur son comportement sexuel. *Bull. Soc. Sci. Nat. Maroc.* *47*, 33-115.
- Diffey, B. L. (2002). What is the Light. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* *18*, 68-74.
- Dusse, L.M.S., Vieira, L. M., e Carvalho, M. (2003). Revisão sobre óxido nítrico. *J. Bra. de Patolog. e Med. Lab.* *39* (4), 343-350.
- Erxleben, C., e Hermann, A. (2001). Nitric oxide augments voltageactivated calcium currents of Crustacea (*Idotea baltica*) skeletal muscle. *Neurosci. Lett.* *300*, 133-136.
- Fernlund, P., e Josefsson, L. (1972). Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Science* *177*, 173-175.
- Fernlund, P. (1976). Structure of a light-adapting hormone from the shrimp *Pandalus borealis*. *Biochem. Biophys. Acta* *439*, 19-25.
- Fingerman, M. (1966). Neurosecretory control of pigmentary effectors in crustaceans. *Am. Zool.* *6*, 169-179.
- Fingerman, M. (1973). Behavior of chromatophores of the fiddler crab *Uca pugilator* and the dwarf crayfish *Cambarellus shufeldti* in response to synthetic Pandulus red pigment-concentrating hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* *20*, 589-592.
- Flora Filho, R., e Zilberstein, B. (2000). Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev. Ass. Med. Brasil.* *48* (3), 265-271.
- Fujii, R., e Hayashi, H. (1996). Role of nitric oxide (NO) in the control of melanophores in teleosts – Effects of NO donors and NO-synthase inhibitors. *Zool. Sci.* *13*, 116.

- Furchgott, R.T., e Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Gäde, G. (1990). The adipokinetic hormone/red pigment concentrating hormone peptide family: structure, interrelationship and functions. *J. Insect Physiol.* 36, 1-12.
- Gaus, G., e Stive, H. (1992). The effect of neuropeptides on the ERG of the crayfish *Orconectes limosus*. *Z. Naturforsch. (c)* 47, 300-303.
- Geller, D. A., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Nussler, A. K., Di, S. M., Wang, S. C., Nakayama, D. K., Simmons, R. L., Snyder, S. H., e Billiar, T. R. (1993). Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3491-3495.
- Gilcherest, B. A., Mark, S. E., Geller e Yaar, M. (1999). The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N. Engl. J. Med.* 29, 1341-1348.
- Gouveia, G. R., Lopes, T.M., Neves, C.A., Nery, L.E.M., e Trindade, G.S. (2004). Ultraviolet Radiation Induces Dose-Dependent Pigment Dispersion in Crustacean Chromatophores. *Pigment Cell Res.* 17, 545-548.
- Gouveia, G. R., Marques, D. S., Cruz B. P., Geracitano, L.A., Nery, L. E. M., e Trindade, G. S. (2005). Antioxidant Defenses and DNA Damage Induced by UV-A and UV-B Radiation in the Crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Photochem. Photobiol.* 81, 398-403.
- Granato, F. C., Tironi, T. S., Maciel, F. E., Rosa, C. E., Vargas, M. A., e Nery, L. E. M. (2004). Circadian rhythm of pigment migration induced chromatophorotropins in melanophores of the crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 138, 313-319.
- Green, L.C., Luzuriaga, K. R., Wagner, D. A., Rand, W., Istfan, N., Young, V. R., e Tannenbaum, S. R. (1981a). Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 7764-7768.
- Green, L.C., Tannenbaum, S. R., and Goldman, P. (1981b). Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 212, 56-58.

- Hadley, M. E. (1996). *Endocrinology*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 4th edition, 518 pp.
- Hamid, Q., Springall, D. R., Riveros-Moreno, V., Chanez, P., Howarth, P., Redington, A., Bousquet, J., Godard, P., Holgate, S., e Polak, J. M. (1993). Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* *342*, 1510-1513.
- Hermann, A., e Erxleben, C. (2001). Nitric oxide activates voltage dependent potassium currents of crustacean skeletal muscle. *Nitric Oxide* *5*, 361-369.
- Hoffman, K. (1978). Effects of short photoperiods on puberty, growth and moult in the Djungarian Hamster (*Phodopus sungurus*). *J. Reprod. Fert.* *54*, 29-35.
- Humbert, C. (1965). Etude experimentale du role de l'organe X (pars distalis) dans les changements de couleur et la mue de la crevette *Palaemon serratus*. *Trav. Inst. Sci. Chentien. Ser. Zool.* *32*,1-86.
- Iadecola, C. (1993). Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: Is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci.* *16*, 206-214.
- Ignarro, L. J. (1987). Endothelium derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.* *61*, 866-879.
- Iuga, A. O., Quereschi, A. A., e Lerner, E. A. (2004). Nitric oxide is toxic to melanocytes in vitro. *Pigment Cell Res.* *17*, 302-306.
- Josefsson, L. (1975). Structure and function of crustacean chromatophorotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* *25* (2), 199-202.
- Johansson, K. U. I., e Mellon, D. (1998). Nitric oxide as a putative messenger molecule in the crayfish olfactory midbrain. *Brain Res.* *807*, 237-242.
- Kadekaro, A.L., Kavanagh, R.J., Wakamatsu, K., Ito, S., Pipitone, M. A., e Abdel Z.A (2003). Cutaneous Photobiology. The melanocyte vs. the sun: Who will win the final round? *Pigment Cell Res.* *16*, 434-447.
- Kiechle, F.L., e Marlinski, T. (1993). Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. *Am. J. Clin. Pathol.* *100*, 567- 575.
- Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M. J., e Moncada, S. (1989). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *86*, 5159-5162.

- Kleinholz, L.H., Rao, K.R., Riehm, J.P., Tarr, G.E., Johnson, L., e Norton, S. (1986). Isolation and sequence analysis of a pigment dispersing hormone from the eyestalks of the crab *Cancer magister*. *Biol. Bull.* 170, 135-143.
- Köller, G. (1927). Über chromatophoren-system, farbensen und farbwechsel bei *Crangon vulgaris*. *Z. Vgl. Physiol.* 5,191-246.
- Konturek, S.K., e Konturek, P.C. (1995). Role of nitric oxid in the digestive system. *Digestion* 56, 1-13.
- Lesser, M. P. (2001). Exposure to ultraviolet radiation (290-400 nm) causes oxidative stress, DNA damage, and expression of p53/p73 in laboratory experiments on embryos of the spotted salamander, *Ambystoma maculatum*. *Physiol. Biochem. Zool.* 74, 733.
- Löhr, J., Klein J., Webster, S.G., e Dircksen H. (1993). Quantification, immunoaffinity purification and sequence analysis of a pigment dispersing hormone of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 104B (4), 699-706.
- Lyons, C.R., Orloff, G. J., e Cunningham, J. M. (1992). Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 267, 6370-6374.
- Mahadevan, A., Lappé, J., Rhyne, R. T., Cruz-Bermúdez, N. D., Marder, E., e Goy, M. F. (2004). Nitric oxide inhibits the rate and strength of cardiac contractions in the lobster *Homarus americanus* by acting on the cardiac ganglion. *J. Neurosci.* 24, 2813-2824.
- Marletta, M.A., Yoon, P.S., Iyengar, R., Leaf, C.D., e Wishnok, J.S. (1988). Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. *Biochem.* 27, 8706-8711.
- Marletta, M.A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78, 927-930.
- Moncada, S., Radomski, M. W., e Palmer, R. M. (1988). Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem. Pharmacol.* 37, 2495-2501.
- Moncada, S., Radomski, M. W., e Palmer., R. M. J. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Reviews.* 43(2), 109-142

- Nery, L.E.M., Silva, M.A., e Castrucci, A.M.L. (1999). Possible role of non-classical chromatophorotropins on the regulation of the crustacean erythrochrome. *J. Exp. Zool.* 284, 711-716.
- Nicholson, S. Bonecini-Almeida, G. M., Silva, J. R. L., Nathan, C., Xie, Q. W., Mumford, R., Weidner, J. R., Calaycay, J., Geng, J., e Boechat, N. (1996). Inducible nitric oxide synthase pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J. Exp. Med.* 183, 2293-22302.
- Nishida, K., Harrison, D. G., Navas, J. P., Fisher, A. A., Dockery, S. P., Uematsu, M., Nerem, R.M., Alexander, R. W., e Murphy, T. J. (1992). Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 90, 2092-2096.
- Pasteur, C. (1958). Influence de l'ablation de l'organe X sur le comportement chromatique de *Leander serratus* (Pennant). *C. R. Hedb. Seances Acad. Sci. Parts.* 246, 320-322.
- Pigeault, N. (1958). L'organe de bellonci et le comportement chromatique de *Sphaeroma serratum*. *C. R. Hedb. Seances Acad. Sci. Parts.* 246, 487-489.
- Rao, K.R., Riehm, J.P., Zahnow, C.A., Kleinholz, Z.H., Tarr, G.E., Johnson, L., Norton, S., Landau, M., Semmes, O.J., Sattelberg, R.M., Jorenby, W.H., e Hintz, M.F. (1985). Characterization of a pigment dispersing hormone in eyestalks of the fiddler crab *Uca pugilator*. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (16), 5319-5322.
- Rao, K.R., e Hackett, R.B. (1973). Studies on the physiological specificity of a synthetic crustacean chromatophorotropin. *Am. Zool.* 13, 1276.
- Rapoport, R.M., e Murad, F. (1983). Agonist induced endotheliumdependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ. Res.* 52, 352-357.
- Robison, W. G. Jr., e Charlton, J. S. (1973). Microtubules, microfilaments and pigment granulate movement in the chromatophores of *Palaeomonetes vulgaris* (crustacea). *J. Exp. Zool.* 186, 279-304.
- Romero-Graillet, C., Aberdam, E., Biagoli, N., Massabai, W., Ortonne, J.P., e Ballotti, R. (1996). Ultraviolet B radiation acts through nitric oxide and

- cGMP signal pathways to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem* 271, 28052–28056.
- Romero-Graillet, C., Aberdam, E., Clement, M., Ortonne, J.P., e Ballotti, R. (1997). Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J. Clin. Invest.* 99, 635–642.
- Sakurai, H., Hohsaka, H., Liu, M. F., Higashiyama, H., Hirata, Y., Kanno, K., Saito, I., e Miyasaka, N. (1995). Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthrides. *J. Clin. Invest.* 96, 2357-2363.
- Sherbrooke, W. C., Castrucci, A. M. L., e Hadley, M. E. (1994). Temperature effects on in vitro skin darkening in the mountain Spiny Lizard, *Sceloporus jarrovi*: A thermoregulatory adaptation? *Physiol. Zool.* 67 (3), 659-672.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Europ. J. Biochem.* 215, 213-219.
- Skiebe, P., Dietel, C., e Schmidt, M. (1999). Immunocytochemical localization of FLRFamide-, Proctolin-, and CCAP-like peptides in the stomatogastric nervous system and neurohemal structures of the crayfish *Cherax destructor*. *J. Comp. Neurol.* 414 (4), 511-532.
- Skorkowski, E.F., e Biegniewska, A. (1981). Neurohormones and control of physiological processes in Crustacea. *Adv. Physiol. Sci.* 23, 419-432.
- Snyder, S. H., e Bredt, D. S. (1992). Biological role of nitric oxide. *Science Am.* 266, 68-77.
- Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-1224.
- Stangier, J., Hilbich, C., Beyreuther, K., e Keller, R. (1987). Unusual cardioactive peptide (CCAP) from pericardial organs of the shore crab *Carcinus_maenas*. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (2), 573-579.
- Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animals adaptation in nature. *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715-1733.
- Stuehr, D. J., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. F., e Nathan, C. F. (1991). Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7773-7777.

- Szabó, C. (1995). Alterations in nitric oxide in various forms of circulatory shock. *New Horizons* 3(1), 2-32.
- Teng, B., Murthy, K.S., Kuemmerle, J.F., Grider, J.R., Sase. K., Michel, T., e Makhlof, G. M. (1998). Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 275, 342-351.
- Thurman, C. L. (1990). Adaptative coloration in Texas fiddler crabs (*Uca*). In: Wicksten M. (ed.). *Adaptative Coloration in invertebrates: Anim. Behavior.* Texas A&M University Press, 109-125.
- Tuma, M.C.B., Castrucci, A.M.L., e Josefsson, L., (1993). Comparative activities of the chromatophorotropins RPCH, -PDH, and -PDH on three crustacean species. *Physiol. Zool.* 66 (2), 181-192.
- Vodovotz, Y., Lucia, M. S., Flanders, K. C., Chesler, L., Xie, Q. W., Smith, T. W., Weidner, J., Munford, R., Webber, R., Nathan, C., Roberts, A. B., Lippa, C. F., e Sporn M. B. (1996). Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 33, 1425-1433.
- Wang, Y., e Mardsen, P. A. (1995). Nitric oxide synthases: Biochemical and molecular regulation. *Curr Opin Nephrol Hypert.* 4, 12-22.
- Yang, W.J., Aida, K., e Nagasawa, H. (1999). Characterization of chromatophorotropic neuropeptides from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 114, 415-424.

Artigo a ser submetido a publicação

Pigment Cell Research

PARTICIPATION OF NITRIC OXIDE IN THE COLOR CHANGE INDUCED BY
UV RADIATION IN THE CRAB CHASMAGNATHUS GRANULATUS.

Marcelo Alves Vargas¹, Bruno Pinto Cruz¹, Fábio Everton Maciel¹, Marcio Alberto Geihs¹, João Carlos Brahn Cousin², Gilma Santos Trindade¹, Silvana Allodi³, Ana Luiza Muccillo Baisch¹ and Luiz Eduardo Maia Nery¹.

¹ Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Departamento de Ciências Fisiológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

² Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Departamento de Ciências Morfobiológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.

³ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências da Biomédicas, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Keywords: Nitric Oxide; UV radiation; melanophores; pigment dispersion;

Chasmagnathus granulatus.

Corresponding author: Luiz Eduardo Maia Nery
Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Departamento de Ciências Fisiológicas,
Av. Itália Km 8; Cx. Postal, 474
96.201-900, Rio Grande, RS. Brazil
Phone: + 55 53 2336850
Fax: + 55 53 2336850
E-mail: nery@octopus.furg.br

Running Header: NO signaling and UV induces pigment dispersion in crab.

SUMMARY

The participation of nitric oxide (NO) signaling in the pigment migration induced by UV radiation in melanophores of the crab *Chasmagnathus granulatus* was investigated. The NO donor, SIN-1, was capable to induce a dose dependent pigment dispersion *in vitro* assays. When male adults were exposed to different doses of UVA and UVB, L-NAME, nitric oxide synthases (NOS) blocker, decreased the pigment dispersion induced by UV radiation. However, the PTIO, NO scavenger, decreased only the pigment dispersion induced by UVA. The BSO did not produce any change in pigment dispersion induced by UVA and SIN-1. The NADPH-diaphorase and immunocytochemistry against nNOS were positive. In conclusion, we suggest that the NO is a very important molecule to induce pigment dispersion in the melanophores of *Chasmagnathus granulatus* and the NOS activation is a fundamental step to induce this process.

INTRODUCTION

Many environmental factors are determinant to induce color change, such as background color, photoperiod and temperature. Other important factor that induces color change is solar radiation, including visible and ultraviolet radiation (UV) (Oshima, 2001). The UV radiation comprises an electromagnetic wavelength between 200 and 400 nm. In order to analyze the capacity of causing damage in cellular targets, UV was divided in UVA (320-400nm), UVB (290-320 nm) and UVC (200-290). The wavelength of UV that includes the UVA and UVB is also called Solar UV (Diffey, 2002). The capacity of UV radiation to stimulate color change in vertebrates is well known (Allan *et al.*, 1995; Bagnara and Hadley, 1973; Gilchrest *et al.*, 1999; Lesser, 2001), however, the signaling pathway of UV radiation remains to be totally disclosed. Two stimulatory ways are suggested for this process. The direct action of the UV on the pigment cells or the indirect action with production of some paracrine agonists for other no pigment cells. Among the paracrine factors involved in the exposure of UV are the endotelins, eicosanoids, POMC hormones, as α -MSH and the ACTH, and the histamines. Furthermore, nitric oxide (NO) has received special attention as a paracrine factor associated to response induced by UV radiation (Romero-Graillet *et al.*, 1996).

NO constitutes one of the smallest and most simple molecules biosynthesized. It is a gaseous molecule, formed by one atom of nitrogen (N) and one atom of oxygen (O), naturally found in the atmospheric air in small quantities and is very toxic due to the presence of free radicals. NO possesses a half-life shorter than 10 seconds in the plasma due to the rapid oxidation to

nitrite and nitrate. This molecule presents an affinity to iron in order to become attached to hemoglobin and other molecules that possess the heme nucleon, ending the biological activity (Snyder and Brecht, 1992). The substrate for formation of NO in the organism is the L-arginine. Besides the participation in the urea cyclic, the L-arginine is involved in the synthesis of creatine and poliamides (Konturek and Konturek, 1995).

The enzymes that convert the L-arginine in L-citruline and NO are called nitric oxide synthases (NOS). These enzymes are heme proteins of the "citrocromo-like family". The NOS are dependent on O₂, NADPH, flavines and biopterines. The synthesis of NO involves two stages. In the first, there is hidroxilation of nitrogen guanidines of the L-arginine forming N^G-hidroxi-L-arginine (NHA). This reaction uses NADPH and O₂ and is connected with the heme complex of the NOS. In the second stage, the conversion of NHA in NO and L-citruline occurs. Flavine adenine dinucleotide (FAD), flavine mononucleotide (FMN) and tetraidrobiopterine (BH₄) are utilized as co-factors in the reaction (Marletta *et al.*, 1988; Marletta, 1994).

To the present, three isoforms of the NOS were isolated and cloned (Brecht and Snyder, 1990; Lyons *et al.*, 1992; Nishida *et al.*, 1992): two constitutive and one inducible. The cNOS (nitric oxide constitutive), which include the eNOS (endothelial nitric oxide) and the nNOS (neuronal nitric oxide), differ from the iNOS (nitric oxide inducible) in the molecular weight, the form of activation and the capacity of NO synthesis (Marlleta, 1994).

NO is highly diffusible and reactive. Instead of activating downstream pathways by traditional receptor-mediated events, it induces its biological effect by directly activating many intercellular molecules. Wink and Mitchell (1998)

classified these NO reactions as being either direct (on the biological mediator) or indirect (involving reactive nitrogen and oxygen species). The direct downstream pathways consist mainly of interactions between NO and heme-containing proteins, the most important being guanylate cyclase (McDonald and Murad, 1996 and Murad, 1994). Activation of this enzyme, by NO, induces the production of guanosine cyclic 3–5-monophosphate (cGMP) which in turn activates protein kinase G (PKG). This downstream pathway is particularly important in mediating the effects of the low levels of NO production, which seems to occur with cNOS activation. The indirect downstream pathways, which become more important under high local concentrations of NO, involve the formation of nitrogen oxide species such as N_2O_3 , HNO (nitroxyl), and $ONOO^-$ (peroxynitrite) (Feelish *et al.*, 2002). These molecules, in turn, modify thiol-containing proteins, either by nitrosation (N_2O_3) or oxidation (HNO and $ONOO^-$). The selection of which indirect downstream pathway is chosen seems to depend, to some extent, on the redox potential of the cell (Lipton *et al.*, 1993; Marshall *et al.*, 1993; Miranda *et al.*, 2003). UV irradiation also directly activates certain transmembrane receptors, such as the epidermal growth factor (EGF) receptor (Miller *et al.*, 1994) and the keratinocyte growth factor (KGF) receptor (Marchese *et al.*, 2003) which go on to activate downstream pathways and initiate the production of peroxide and reactive oxygen species (ROS).

Until the 1980's, the NO was considered only a member of the unwanted environmental pollutants and potentially carcinogenic. The evidence of a central role for NO in the induction of melanogenesis has been apparent since the mid-1990's when Romero-Graillet *et al.* (1996, 1997) found that UV irradiated cultures of human melanocytes produced NO and that the presence of NO was

sufficient to induce melanogenesis. Hayashi and Fujii (2001) reported that NO donors also induce the pigment dispersion in melanophores of teleosts. In crustaceans, the expression of NOS has been established in nerve gland, Y-organ, gill and gonad (Kim *et al.*, 2004). Furthermore, recent studies have shown that the NO pathway is involved in neuronal development and neuron, skeletal muscle and cardiac muscle regulation in crustaceans (Aonuma *et al.*, 2000; Aonuma and Newland, 2001, 2002; Erxleben and Hermann, 2001; Hermann and Erxleben, 2001; Johansson and Mellon, 1998; Mahadevan *et al.*, 2004) and regulation of molting (Lachaise *et al.*, 1993; Skinner, 1985), but its participation in the color change regulation is unknown.

In crustaceans the color change is principally associated to the X-organ/sinus gland neuroendocrine complex. Up to date, only two hormones affecting the color change, released mainly from the X-organ/sinus gland neuroendocrine complex, are well known, the pigment dispersing hormone (PDH) and the red pigment concentrating hormone (RPCH).

The crab *Chasmagnathus granulatus* is a semi terrestrial animal characteristic of southern coast of Brazil, Uruguay and Argentina. This crab presents pigment dispersion in its melanophores during UV exposure (Gouveia, *et al.*, 2004). This dispersion disappears fast when the stimuli cease returning to the aggregated stage 45 min after the exposure. Interestingly, this color change occurs also in eyestalkless crabs, therefore, it is independent from the X-organ/sinus gland complex and its neurohormones. Thus, this work has the aim to verify the participation of nitric oxide in the signaling of color change induced by UV, UVA and UVB in melanophores of crab *Chasmagnathus granulatus*.

RESULTS

The melanophores of *Chasmagnathus granulatus* presented significant ($p < 0.05$) dose dependent pigment dispersion when incubated with a potent NO donor, SIN-1 (Fig. 1). The minimal effective dose of SIN-1 that induce pigment dispersion was 10^{-8} M, and the maximum pigment dispersion was obtained with 10^{-5} M. The EC_{50} (with 95 % confidence interval) was $1.2 (0.3 - 4.2) \times 10^{-6}$ M.

In *in vivo* assays, the UVA exposure induced significant dose dependent pigment dispersion in the *C. granulatus* melanophores (Fig. 2). However, when the crabs were treated with L-NAME, they showed an inhibition of pigment dispersion when compared with the control group ($p < 0.05$). The UVB exposure also induced significant dose dependent pigment dispersion. In the same way, the crabs treated with the blocker L-NAME also showed less pigment dispersion when compared with the control group ($p < 0.01$) (Fig. 3). It is important to notice that the UVA radiation was more effective than UVB radiation in inducing pigment dispersion. (Fig. 2 and Fig. 3). Other point to be noticed is that the L-NAME does not induce any pigment dispersion in non-irradiated crabs.

The PTIO produced different effects to animals exposed to UVA and UVB. When exposed to UVA the animals treated with PTIO responded with inhibition of pigment dispersion, different from those that received physiological saline ($p < 0,05$) (Fig. 4). On the contrary, in the animals exposed to UVB there was no difference in the pigment dispersion response between PTIO and control groups ($p > 0,05$) (Fig. 5). Also, it is important notice that the PTIO does not induce pigment dispersion in non-irradiated crabs. In addition, the BSO did not result in significant ($p > 0.05$) change in UVA- or SIN-1-induced pigment

dispersion. (Fig. 6 and Fig. 7, respectively). The BSO also does not induce pigment dispersion in non-irradiated crabs.

A layer of basically two cell types constitutes the epithelium of the crab *Chasmagnathus granulatus*, below the carapace: the coating and the pigment cells. The epidermis of the pereopods of *Chasmagnathus granulatus* presented a positive reaction for both techniques employed. The NADPH-diaphorase cytochemical analysis showed a positive reaction along all the epidermis of the crab, revealing the production of NO in most cells of this tissue (Fig 8). Confirming these results and adding new data, the immunocytochemical reaction against nNOS labeled the epidermis and the surrounding muscle indicating that NO can be produced in other tissues of the crab *Chasmagnathus granulatus* besides the epidermis (Fig 8).

DISCUSSION

Several studies have demonstrated a relationship between increased pigmentation in mammals and UV radiation (Gilchrest *et al.*, 1999; Hill and Hill, 2000; Murphy *et al.*, 2001). In addition, some studies have also verified that the tanning effect induced by UV radiation occurs in other vertebrate groups. Juvenile hammersharks showed an increase in the skin melanin content in direct response to UV (Lowe and Goodman, 1996), and spotted salamander embryos also increased melanin production in response to UV radiation (Lesser, 2001). This effect also has been verified in pigment dispersion. In crustaceans, melanophores of the fiddler crab *Uca pugilator* (Cohill *et al.*, 1970) and *Chasmagnathus granulatus* (Gouveia *et al.*, 2004), showed immediate pigment dispersion in response to UV radiation. Besides causing an increase in melanin and pigment dispersion, most of the signaling mechanisms triggered by UV radiation are still unknown.

Some studies have demonstrated that the NO is associated with color change in vertebrates. Thus, it was investigated the NO participation in the pigment dispersion of melanophores of *Chasmagnathus granulatus*. The present study shows that the production of NO is capable to induce pigment dispersion in melanophores of *Chasmagnathus granulatus*. These melanophores present a dose-dependent pigment dispersion after treatment with SIN-1, a potent NO donor. Hayashi and Fujii (2001) also verified that the increase of NO production induces pigment migration in melanophores of two teleost species, *Zacco temmincki* and *Kryptopterus bicirrhis*, treated with various NO donors. In contrast, Oberg *et al.* (1999) verified that NO production

in melanophores of an amphibian species, *Xenopus laevis*, is required for aggregation of melanosomes. Furthermore, the effect of NO in this response is not mediated through the increase of intracellular concentration of cGMP, a classic intracellular signaling pathway to NO.

Regarding melanogenesis, the effects of NO are similar to the effects of NO in pigment dispersion. In a first study, human melanocytes markedly enhanced tyrosinase activity and melanin neosynthesis in a dose-dependent manner when treated with NO donors (Romero-Graillet *et al.*, 1996). Furthermore, the NO donors also enhanced the melanocytes dendricyte, indicating the increase of the melanocyte activity. The NO-induced melanogenesis has been accompanied by an up-regulation of tyrosinase gene expression (Sasaki *et al.*, 2000). The NO also may be involved with the production and increased eumelanin/feomelanin ratio (Lassalle *et al.*, 2003). These results suggest that NO is capable to induce color change in animal groups, being a chromatophoric agonist to various animals.

The next step was to investigate whether NO is involved with the pigment dispersion induced by UV in *Chasmagnathus granulatus*. Romero-Graillet *et al.* (1996) reported that human keratinocytes exposed to UVA and UVB presented an increased NOS activity. Furthermore, when irradiated-keratinocytes were co-cultured with non-irradiated melanocytes, they induced the increase of tyrosinase activity, indicating that the amount of NO released to keratinocytes was sufficient to induce melanogenesis. In addition, when the same experiment was performed in the presence of two NO scavengers (hemoglobin and carboxy-PTIO), the increase of tyrosinase activity induced by keratinocytes was completely blocked. However, Romero-Graillet *et al.* (1997)

also reported that melanogenesis increasing in human melanocytes directly irradiated with UVB is dependent on NO production. This molecule can also act as an autocrine factor or as intracellular messenger to induce melanogenesis. In our study, UVA induced dose-dependent pigment dispersion in melanophores of *Chasmagnathus granulatus*, and when a treatment with L-NAME (NOS blocker) or PTIO (NO scavenger) was performed, a lower pigment dispersion was observed. The results indicate that NOS activation and NO production are important steps in the UVA-induced pigment dispersion.

NO production may also occur through other pathways besides NOS activation. Human skin UVA irradiation leads to NO production due to photo-decomposition of nitroreactive species (RSNO) and nitrite representing the primary basis for NO formation during UVA exposure (Paunel *et al.*, 2005). Thus, another point to verify was whether there is NO production by RSNO photo-decomposition. For this, it was used an inhibitor of GSH production (BSO) that leads to an increase of RSNO and consequently an increase of NO formation by photo-decomposition. Ours results show that BSO does not alter UVA and SIN-1-induced pigment dispersion in melanophores of *Chasmagnathus granulatus*. Therefore, the UVA-induced pigment dispersion is apparently dependent only on NOS activation. However, we can not discard the possibility that the concentration of BSO used did not produce an effective increase of RSNO, because the same concentration was able to increase RNSO in rat hepatocytes (Yoshida *et al.*, 2005).

L-NAME was also able to reduce the UVB-induced pigment dispersion in melanophores of *Chasmagnathus granulatus*. The L-NAME effect is similar to experiments with guinea pigs, in which the topical application of L-NAME

inhibited UVB-induced melanogenesis (Horikoshi *et al.*, 2000). Furthermore, the increase in the number of DOPA-positive melanocytes and melanin content in the skin, essential for hyperpigmentation, was also reduced. However, PTIO did not alter the UVB-induced pigment dispersion in melanophores of *Chasmagnathus granulatus*. It is possible that the PTIO dose used was not sufficient to change significantly the UVB-induced NO production. It is also possible that the action mechanisms of the two types of UV radiation, UVA and UVB, are different. It is interesting to observe that there is a difference between the capacity of UVA and UVB to induce color change in mammals and crustaceans. The response induced by UVA is two to three orders of magnitude less efficient than UVB in mammals (Eller and Gilchrist 2000). To *Chasmagnathus granulatus*, UVB radiation is less effective than UVA radiation in inducing pigment dispersion (Gouveia *et al.*, 2004, and present results).

The last step was to verify the presence of NOS and its localization in the epidermis of the crab *Chasmagnathus granulatus*. In mammals, all skin cell types express NOS and seem capable of releasing NO. Although a few early reports suggested that human keratinocytes expressed eNOS (Sakai *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 1997), further experimentation suggested that perhaps a post-translational product of the NOS protein cross-reacted with certain anti-eNOS antibodies (Jackson *et al.*, 1998). Most of the evidence now indicates that keratinocytes constitutively express nNOS (Sirsjo *et al.*, 1996; Romero-Graillet *et al.*, 1997). Furthermore, Jackson *et al.* (1998) found no induction of eNOS mRNA following the exposure of keratinocytes to UVB irradiation or IFN- γ . Keratinocytes are also known to express iNOS and protein following the exposure to inflammatory cytokines (Sirsjo *et al.*, 1996; Frank *et al.*, 1998).

Normal human melanocytes also have been shown to express eNOS mRNA (Jackson *et al.*, 1998), although the immunoreactive-iNOS was reported in one study (Ivanova *et al.*, 1997). iNOS also seems to be expressed by some malignant melanomas (Ahmed and Van Den Oord, 1999). Normal human melanocytes express iNOS following incubation with LPS, TNF α , INF- γ (Fecker *et al.*, 2002, Rocha and Guillo, 2001). In our study, the epidermis of *Chasmagnathus granulatus* was NADPH-diaphorase and immunocytochemistry positive. The NADPH-diaphorase revealed the presence of NOS in the majority of epidermal cells. In addition, the immunocytochemical reaction against nNOS also indicated the presence of NOS in most cells of the epidermis, however we cannot distinguish the type of constitutive NOS (nNOS or eNOS) because the antibody against nNOS used in our study was not specific for crustaceans. These results demonstrated for the first time the expression of NOS in the epidermis of crustaceans.

In conclusion, our results showed that NO is an important molecule to induce pigment dispersion in melanophores of *Chasmagnathus granulatus*. In addition, NOS seems to be associated with UV radiation signaling to induce color change.

MATERIALS AND METHODS

Animals' capture and Acclimation

Adult male crabs *C. granulatus*, weighing 7.0 ± 0.5 g, were collected in salt marshes near the city of Rio Grande (southern Brazil). The crabs were kept in tanks with salt water at 20‰ salinity, 20° C and photoperiod 12:12 L:D, for at least 7 days before the assays. During this period, the crabs were regularly fed with ground beef.

Reagents and solutions

The modulators of the NO used in this experiment were purchased from Sigma (USA) (L-NAME, PTIO and BSO) and from Cayman (USA) (SIN-1). The stock solutions were made in water (L-NAME), ethanol (PTIO) or DMSO (SIN-1). For each solution, the final dilution was made in physiological saline, and the final concentration of the solvents never exceeded 1%. The solution of BSO was made directly in physiological saline without stock. The physiological saline composition was, in mmol l⁻¹: MgCl₂, 0.01; NaCl, 0.355; CaCl₂, 0.016; H₃BO₃, 0.005; KHCO₃, 0.010; Na₃C₆H₅O₇, 0.008; pH 7.6.

In vivo assays

In the *in vivo* assays, only eyestalkless crabs were used. The ablation was made 24 h before the beginning of the experiment. The crabs received the injection (100 μ l) of L-NAME (N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester, an analogous and competitor of L-arginine) (500 nmol/crab), PTIO (2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, a NO scavenger) (10 nmol/crab) or BSO (buthionine sulfoximine, an inhibitor of γ -glutamylcysteine) (14,5 nmol/crab) 15 minutes before the exposure. The control group received only physiological

saline injection (100 μ L). For BSO experiments, the control group received physiological saline with 1% of DMSO and for PTIO experiments, the control group received physiological saline with 1% of ethanol.

The animals were irradiated during 30 minutes with different doses of UVA (6.4; 1.5; 0.6; 0.2; 0.07 J/cm²) and UVB (8.1; 3.1; 1.2; 0.9; 0.6; 0.03 J/cm²). The UVA (VL: 115 L, 30 W) or UVB (VL: 115 C, 30 W; Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France) lamps were monitored using a radiometer/photometer (model IL 1400A, International Light, Newburyport, MA, USA). The UVA lamp irradiation was 1.39 mW/cm² UVA, with contamination of 0.006 mW/cm² UVB and 928.0 nW/cm² visible light. The UVB lamp irradiation was 1.195 mW/cm² produced with contamination of 493 μ W/cm² of UVA and 0.113 μ W/cm² of visible light. Both lamps showed no contamination with UVC. During UV exposure, the crabs were maintained under the same temperature (20° C).

An extra control group was created with crabs that were not irradiated with UV, but maintained under fluorescent lamps (Philips TLT 40 W/75, São Paulo, Brazil) irradiating 96.0 mW/cm² visible light. These crabs also received injection (100 μ L) of reagents (L-NAME, PTIO, or BSO) or physiological saline.

Observation

Pigment dispersion was assessed using the Hogben and Slome (1931) index, which defines stage 1 as that with full pigment aggregation, stage 5 as that with full dispersion, being stages 2, 3, and 4 in intermediate conditions. The region chosen for observation was the meropodite of the third pair of maxillipedes, due to the fact that this region has a thin and light colored exoskeleton, thus facilitating observation.

The degree of pigment dispersion was evaluated before injection, 15 min after injection and 0,15, 30, 60, 90, 120, 150 min after UV exposure. From these results, the standard integrated response (SIR), as described by Fingerman and Yamamoto (1967), was calculated in order to determine dose-response curves (DRCs).

In vitro assays

In the *in vitro* assays, the meropodite of the third pair of maxillipedes was incubated in physiological saline for 30 min before the experiments. The pieces were then taped to a glass cover slip, which was turned upside down and mounted in a perfusion chamber, as described by Britto et al. (1990). This preparation received increasing concentrations of SIN-1 (0.01 M; 0.1 M; 1 M and 10 M). To test the effect of BSO, the pieces were previously incubated in BSO (300 M) during 30 min before the experiments. Increasing concentrations of SIN-1 (0.01 M; 0.1 M; 1 M and 10 M) with BSO (300 M) were put in the perfusion chamber. For both tests each concentration stayed 20 min in the chamber. The cumulative DRCs to SIN-1 were determined as follows: the physiological saline was replaced with NO donor concentration, and the dispersion response was evaluated under the light with the aid of an ocular micrometer. After the maximal response to a concentration was determined, the response was calculated as the percentage change in the apparent length of a previously chosen melanophore process.

Histological Analyses

NADPH-diaphorase

Periopods of adult crabs were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde for 4 h in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), washed in PBS (three times) and immersed in PBS and sucrose (30%) overnight. The next day the material was embedded in OCT (Miles Inc.) and 16 μ m sections were obtained using a cryostat. The histological sections were washed in PBS with Tween 20 (0.05%) during 5 min and incubated with a 100 μ L substrate solution containing 1mg/mL NADPH (Sigma) and 1mg/mL NBT (nitro blue tetrazolium, Sigma) for 2 h at 37°C in a humid chamber. The sections were then washed in 0.05 M Tris/HCl pH 7.6, dehydrated in alcohol and mounted in Entellan (Merck).

Immunocytochemistry

The periopods of adult crabs were fixed with Lillie solution for 30 days, embedded in paraffin and sectioned using a rotary microtome. Sections (10 μ m thick) mounted on gelatin-coated slides were deparaffinized and washed in 0.1M PBS for 5 min. The following procedure was performed using the ProTaq[®] Stain ABC-POD kit. To block the endogenous peroxidase, the sections were incubated with 3% H₂O₂ and washed in PBS. Blocking of unspecific binding was performed with the blocking reagent. Next, the slides were washed in PBS and incubated with the primary antibody (rabbit anti-nNOS; SIGMA) overnight at 4°C. The next day, the sections were washed in PBS, incubated with the secondary antibody and washed again in PBS. The sections were then covered with Streptavidin-Complex and incubated for 30 min. After washing them in PBS the sections were covered with fresh DAB-Chromogen solution and incubated until color intensity was satisfactory. The sections were then washed in distilled water, counterstained with heamatoxylin and the slides were mounted with Proataqs[®] (PARAmount).

Statistical analyses

The dose–response curve was obtained by using a non-linear regression model. To verify differences in pigment dispersion in function of UV radiation or NO exposure, data were subjected to two-way variance analyses. The significance level adopted was 95%.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPERGS. BPC is fellows of FAPERGS, MAG is fellows of CNPq, and FEM is fellows of CAPES.

REFERENCES

- Ahmed, B., and Van Den Oord, J. J. (1999). Expression of the neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) and its inhibitor, protein inhibitor of nNOS, in pigment cell lesions of the skin, *Br. J. Dermatol.* *141*, 12–19.
- Aonuma, H., Nagayama, T. and Takahata, M. (2000). Modulatory effects of nitric oxide on synaptic depression in the crayfish neuromuscular system. *J. Exp. Biol.* *203*, 3595-3602.
- Aonuma, H., and Newland, P. L. (2001). Opposing actions of nitric oxide on synaptic inputs of identified interneurons in the central nervous system of the crayfish. *J. Exp. Biol.* *204*, 1319-1332.
- Aonuma, H., and Newland, P. L. (2002). Synaptic inputs onto spiking local interneurons in crayfish are depressed by nitric oxide. *J. Neurobiol.* *52*, 144-155.
- Allan, A. E., Archambaut, M., Messana, E., and Gilchrest, B. A. (1995). Topically applied diacylglycerols increase pigmentation in guinea pig skin. *J. invest. Dermatol.* *105*, 687-692.
- Bagnara, J. T., and Hadley, M. E. (1973). *Chromatophores and color change: The comparative physiology of animal pigmentation*(New Jersey: Prentice Hall Inc.).
- Bredt, D.S., and Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 682-685.
- Britto, A. L. M., Castrucci, A. M. L., Visconti, M. A., and Josefsson, L. (1990). Quantitative *in vitro* assay for crustacean chromatophorotropins and other pigment cell agonist. *Pigment Cell Res.* *3*, 28-32.
- Coohill, T. P., Bartell, C. K., and Fingerman, M. (1970). Relative effectiveness of ultraviolet and visible light in eliciting pigment dispersion in melanophores of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Physiol. Zool.* *43*, 232-239.
- Diffey, B. L. (2002). What is the Light. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* *18*, 68-74.
- Erxleben, C., and Hermann, A. (2001). Nitric oxide augments voltageactivated calcium currents of Crustacea (*Idotea baltica*) skeletal muscle. *Neurosci. Lett.* *300*, 133-136.

- Eller, M. S., and Gilchrist, B. A. (2000). Tanning as part of the eukaryotic SOS response. *Pigment Cell Res.* *13*, (Suppl. 8) 94-97.
- Frank, S., Madlener, M., Pfeilschifter, J., and Werner, S. (1998). Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair, *J. Invest. Dermatol.* *111*, 1058–1064.
- Feelisch, M., Rassaf, T., Mnaimneh, S., Singh, Bryan, N.S., Jourd'Heuil, D., and Kelm, M. (2002). Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo, *FASEB J.* *16*, 1775–1785.
- Fecker, L. F., Eberle, J., Orfanos, C. E., and Geilen, C. C. (2002). Inducible nitric oxide synthase is expressed in normal human melanocytes but not in melanoma cells in response to tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and lipopolysaccharide, *J. Invest. Dermatol.* *118*, 1019–1025.
- Fingerman, M., and Yamamoto, Y. (1967). Daily rhythm of melanophore pigment migration in eyestalkless fiddler crab, *Uca pugilator*. *Crustaceana* *12*, 303-319.
- Gilchrist, B. A., Mark, S. E., Geller and Yaar, M. (1999). The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N. Engl. J. Med.* *29*, 1341-1348.
- Gouveia, G.R., Lopes, T.M., Neves, C.A., Nery, L.E.M., and Trindade, G.S. (2004). Ultraviolet Radiation Induces Dose-Dependent Pigment Dispersion in Crustacean Chromatophores. *Pigment Cell Res.* *17*, 545-548.
- Hayashi, H., and Fujii, R. (2001). Possible involvement of nitric oxide in signaling pigment dispersion in teleosts melanophores. *Zool. Sci.* *118*, 1207-1215.
- Hermann, A., and Erxleben, C. (2001). Nitric oxide activates voltage dependent potassium currents of crustacean skeletal muscle. *Nitric Oxide* *5*, 361-369.
- Hill, H. Z., and Hill, G. J. (2000). UVA, pheomelanin and the carcinogenesis of melanoma. *Pigment Cell Res.* *13* (8): 140-144.
- Hogben, L., and Slome, D. (1931). The pigmentary effector system. IV The dual character of endocrine co-ordination in amphibian color change. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* *108*, 10-53.

- Horikoshi, T., Nakahara, M., Kaminaga, H., Sasaki, M., Uchiwa, H., and Myiachi, Y. (2000). Involvement of nitric oxide in UVB-induced pigmentation in guinea pig skin. *Pigment Cell. Res.* *13*, 358-363.
- Ivanova, K., Le Poole, I. C., Gerzer, R., Westerhof, W., and Das, P. K. (1997). Effect of nitric oxide on the adhesion of human melanocytes to extracellular matrix components, *J. Pathol.* *183*, 469–476.
- Jackson, M., Frame, F., Weller, R., and McKenzie, R. C. (1998). Expression of nitric oxide synthase III (eNOS) mRNA by human skin cells: melanocytes but not keratinocytes express eNOS mRNA, *Arch. Dermatol. Res.* *290*, 350–352.
- Johansson, K. U. I., and Mellon, D. (1998). Nitric oxide as a putative messenger molecule in the crayfish olfactory midbrain. *Brain Res.* *807*, 237-242.
- Kim, H. W., Batista, L. A., Hoppes, J. L., Lee, K. J., and Mykles, D. L. (2004). A crustacean nitric oxide synthase expressed in nerve ganglia, Y-organ, gill and gonad of the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*. *Journ. Exp. Biol.* *207*, 2845-2857.
- Konturek, S.K., and Konturek, P.C. (1995). Role of nitric oxid in the digestive system. *Digestion.* *56*, 1-13.
- Lachaise, A., Le Roux, A., Hubert, M., and Lafont, R. (1993). The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review). *J. Crust. Biol.* *13*, 198-234.
- Lassalle, M. W., Igarashi, S., Sasaki, M., Wakamatsu, K., Ito, S., and Horikoshi, T. (2003). Effect of melanogenesis-inducing nitric oxide and histamine on the production of eumelanin and pheomelanin in cultured human melanocytes. *Pigment Cell Res.* *16*, 81-84.
- Lesser, M. P. (2001). Exposure to ultraviolet radiation (290-400 nm) causes oxidative stress, DNA damage, and expression of p53/p73 in laboratory experiments on embryos of the spotted salamander, *Ambystoma maculatum*. *Physiol. Biochem. Zool.* *74*, 733.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z. H., Lei, S. Z., Chen, H.S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., and Stamler, J.S. (1993). A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds, *Nature* *364*, 626–632.

- Lowe, C., and Goodman Lowe G. (1966). Suntanning in hammerhead sharks. *Nature*. *383*, 677.
- Lyons, C.R., Orloff, G. J., e Cunningham, J. M. (1992). Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* *267*, 6370-6374.
- Mahadevan, A., Lappé, J., Rhyne, R. T., Cruz-Bermúdez, N. D., Marder, E., and Goy, M. F. (2004). Nitric oxide inhibits the rate and strength of cardiac contractions in the lobster *Homarus americanus* by acting on the cardiac ganglion. *J. Neurosci.* *24*, 2813-2824.
- Marchese, C., Maresca, V., Cardinali, G., Belleudi, F., Ceccarelli, S., Bellocchi, M., Frati, L., Torrisi, M. R., Picardo, M. (2003). UVB-induced activation and internalization of keratinocyte growth factor receptor, *Oncogene* *22*, 2422–2431.
- Marletta, M.A., Yoon, P.S., Iyengar, R., Leaf, C.D., and Wishnok, J.S. (1988). Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. *Biochem.* *27*, 8706-8711.
- Marletta, M.A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell.* *78*, 927-930.
- Marshall, H. E., Merchant, K., and Stamler J. S. (2000). Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression, *FASEB J.* *14*, 1889–1900.
- McDonald, L. J., and Murad F. (1996). Nitric oxide and cyclic GMP signaling, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *211*, 1–6.
- Miranda, K.M., Nims, R. W., Thomas, D. D., Espey, M. G., Citrin, D., Bartberger, M. D., Paolocci, N., Fukuto, J. M., Feelisch, M., and Wink, D. A. (2003). Comparison of the reactivity of nitric oxide and nitroxyl with heme proteins. A chemical discussion of the differential biological effects of these redox related products of NOS, *J. Inorg. Biochem.* *93*, 52–60.
- Miller, C. C., Hale, P., and Pentland, A. P. (1994). Ultraviolet B injury increases prostaglandin synthesis through a tyrosine kinasedependent pathway. Evidence for UVB-induced epidermal growth factor receptor activation, *J. Biol. Chem.* *269*, 3529–3533.
- Murad F. (1994). Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system, *Adv. Pharmacol.* *26*, 19–33.

- Murphy, G., Young, A.R., Kulms, H. C., and Schwarz T. (2001). The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp Dermatol.* *10*, 155-160.
- Nishida, K., Harrison, D. G., Navas, J. P., Fisher, A. A., Dockery, S. P., Uematsu, M., Nerem, R.M., Alexander, R. W., e Murphy, T. J. (1992). Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* *90*, 2092-2096.
- Oberg, H., Karlsson, A., Sundqvist, T., and Svensson, S. (1999). Endogenous production of nitric oxide can alter the directed transport of pigment organelles in *Xenopus laevis* melanophores. *Pigment Cell Res Suppl* *7*, 68
- Oshima, N. (2001). Direct reception of light by chromatophores of lower vertebrates. *Pigment Cell Res.* *14*, 312-319.
- Paunel, A. N., Dejam, A., Thelen, S., Kirsch, M. Horstjann, M., Gharini, P., Mürtz, M., Kelm, M., Groot, H., Holb-Bachofen, V., and Suschek, C. V. (2005). Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: Characterization, molecular sources, and mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine.* *38*, 606-615.
- Rocha, I. M., and Guillo, L.A. (2001). Lipopolysaccharide and cytokines induce nitric oxide synthase and produce nitric oxide in cultured normal human melanocytes, *Arch. Dermatol. Res.* *293*, 245–248.
- Romero-Graillet, C., Aberdam, E., Biagoli, N., Massabai, W., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1996). Ultraviolet B radiation acts through nitric oxide and cGMP signal pathways to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem* *271*, 28052–28056.
- Romero-Graillet, C., Aberdam, E., Clement, M., Ortonne, J.P., and Ballotti, R. (1997). Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J. Clin. Invest.* *99*, 635–642.
- Sakai, M., Shimizu, Y., Nagatsu, I., and Ueda, H. (1996). Immunohistochemical localization of NO synthases in normal human skin and psoriatic skin, *Arch. Dermatol. Res.* *288*, 625–627.
- Sasaki, M., Horikoshi, T., Uchiwa, H., and Myiashi, Y. (2000). Up regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* *13*, 248-252.

- Sirsjo, A., Karlsson, M., Gidlof, A., Rollman, O., and Torma, H. (1996). Increased expression of inducible nitric oxide synthase in psoriatic skin and cytokine-stimulated cultured keratinocytes, *Br. J. Dermatol.* *134*, 643–648.
- Shimizu, Y., Sakai, M., Umemura, Y., and Ueda, H. (1997). Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes, *J. Dermatol.* *24*, 80–87.
- Skinner, D. M. (1985). Molting and regeneration. In *The Biology of Crustacea* (ed. D. E. Bliss and L. H. Mantel), pp. 43-146. New York, NY: Academic Press.
- Snyder, S. H., and Bredt, D. S. (1992). Biological role of nitric oxide. *Science Am.* *266*, 68-77.
- Yoshida, M., Saegusa, Y., Fukuda, A., Akama, Y., and Owada, S. (2005). Measurement of radical-scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using in vivo electron spin resonance spectroscopy. *Toxicology.* *213*, 74-80
- Wink, D.A., and Mitchell, J. B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide, *Free Radic. Biol. Med.* *25*, 434–456.

LEGENDS

Figure 1- *In vitro* dose-response curve for SIN-1 of melanophores of crab *Chasmagnathus granulatus*. Each point represents the means (\pm S.E.M) dispersing response at the concentration noted (n=5).

Figure 2- *In vivo* dose-response curve for UVA-induced pigment dispersion in *Chasmagnathus granulatus* previously injected with L-NAME and Physiological saline. Each point represents the means (\pm S.E.M) of dispersing response, measured as standard integrated response (SIR) at the UVA dose noted (n=5).

Figure 3- *In vivo* dose-response curve for UVB-induced pigment dispersion in *Chasmagnathus granulatus* previously injected with L-NAME and Physiological saline. Each point represents the means (\pm S.E.M) of dispersing response, measured as standard integrated response (SIR) at the UVB dose noted (n=8).

Figure 4- *In vivo* dose-response curve for UVA-induced pigment dispersion in *Chasmagnathus granulatus* previously injected with PTIO and Physiological saline. Each point represents the means (\pm S.E.M) of dispersing response, measured as standard integrated response (SIR) at the UVA dose noted (n=4).

Figure 5- *In vivo* dose-response curve for UVB-induced pigment dispersion in *Chasmagnathus granulatus* previously injected with PTIO and Physiological saline. Each point represents the means (\pm S.E.M) of dispersing response, measured as standard integrated response (SIR) at the UVB dose noted (n=5).

Figure 6- *In vivo* dose-response curve for UVA-induced pigment dispersion in *Chasmagnathus granulatus* previously injected with BSO and Physiological saline. Each point represents the means (\pm S.E.M) of dispersing response, measured as standard integrated response (SIR) at the UVA dose noted (n=4).

Figure 7- *In vitro* dose-response curve for SIN-1 with BSO of melanophores of crab *Chasmagnathus granulatus*. Each point represents the means (\pm S.E.M) dispersing response at the concentration noted (n=5).

Figure 8- NOS localization in the epidermis of crab *Chasmagnathus granulatus*. (A) Epidermis of *Chasmagnathus granulatus* showing the characteristic cells, (RE) coating cells, (ME) melanophore. Hematoxylin/Eosin stained, 1000X. (B) NADPH-diaphorase control in epidermis of *Chasmagnathus granulatus*. (MU) muscle, (EP) epidermis. Hematoxylin stained, 1000X. (C) NADPH-diaphorase positive in epidermis of *Chasmagnathus granulatus* (arrow); (MU) muscle, (EP) epidermis, 1000X. (D) Immunocytochemistry against nNOS in the majority cells of the epidermis (MU) muscle, (EP) epidermis, 1000X. Bar 20 μ m.

Figure 1

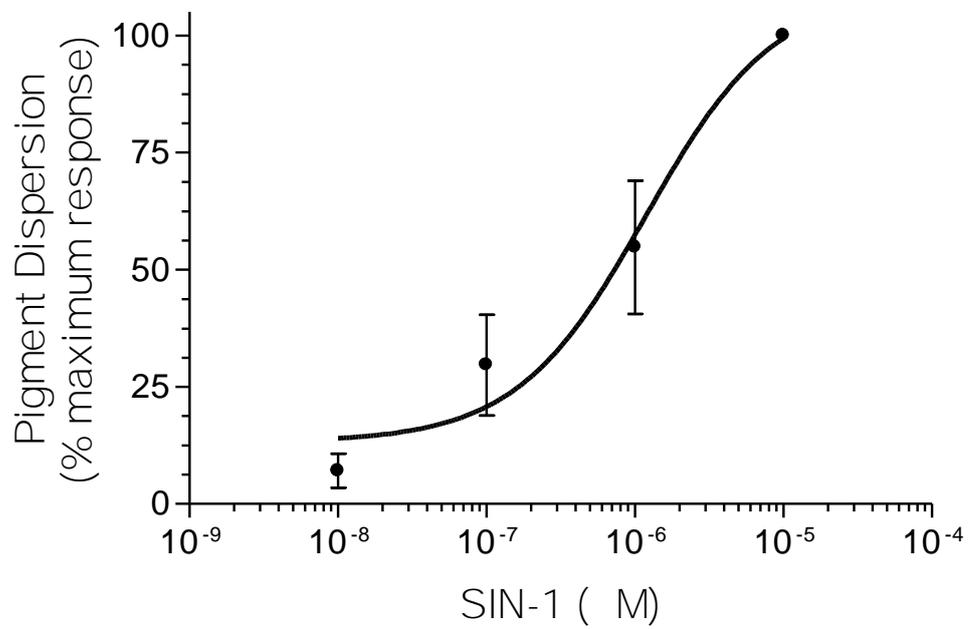


Figure 2

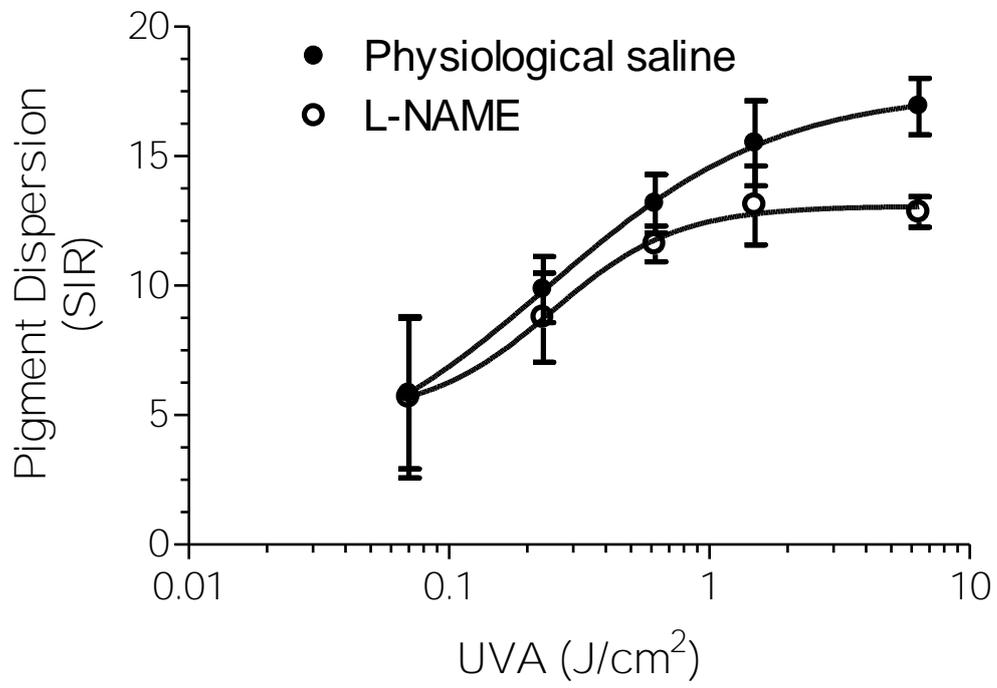


Figure 3

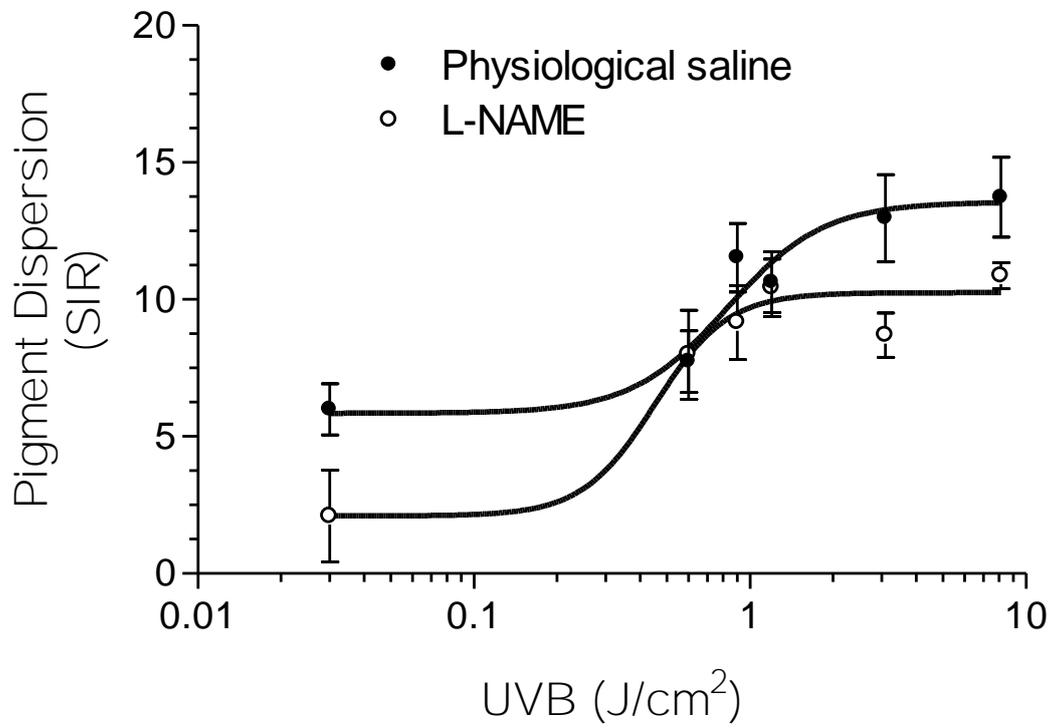


Figure 4

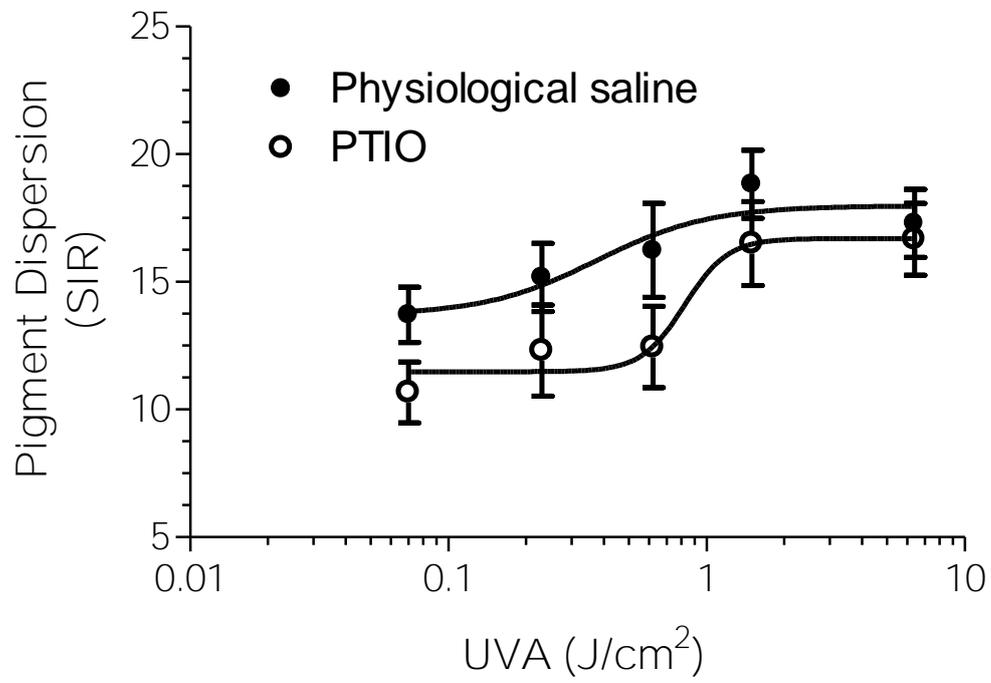


Figure 5

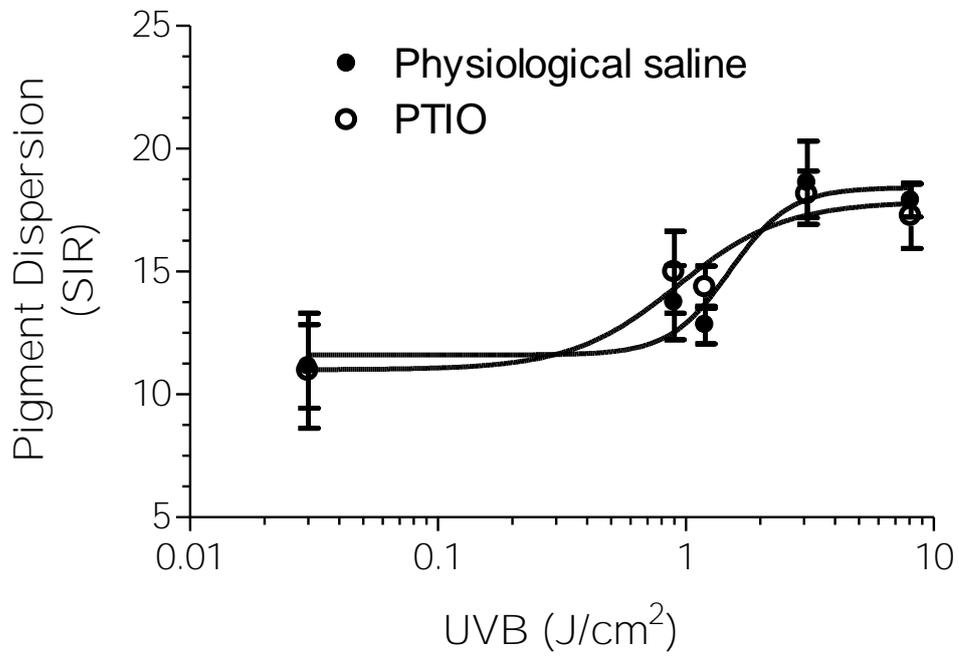


Figure 6

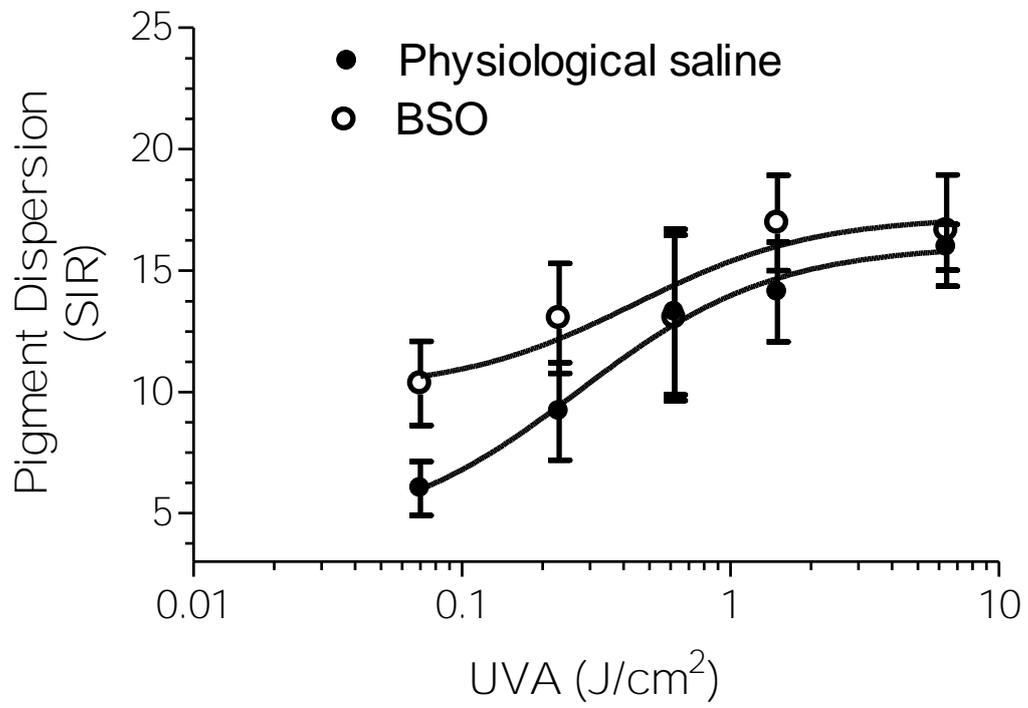


Figure 7

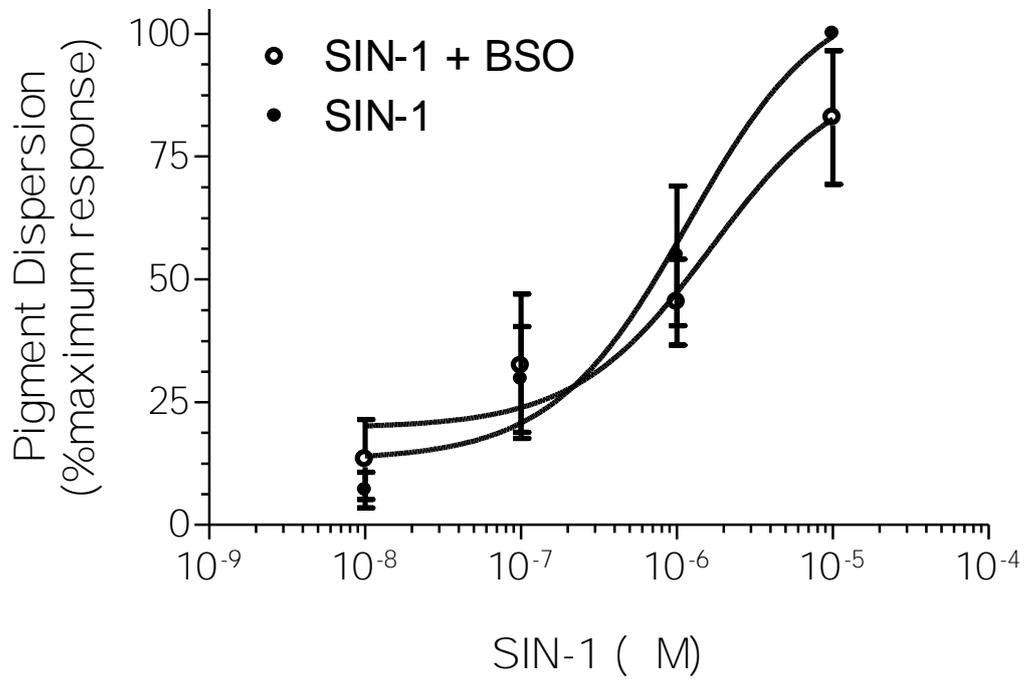
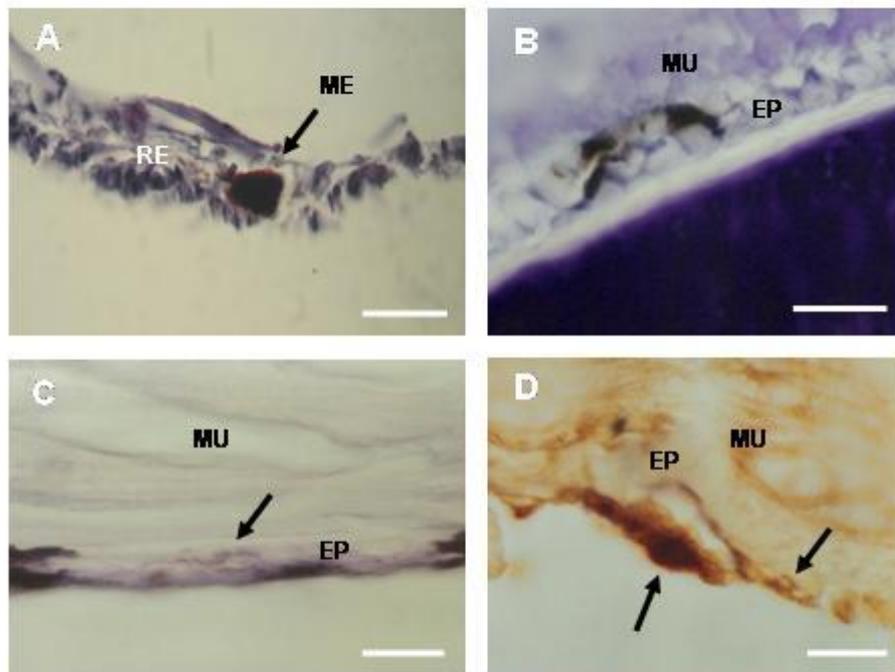


Figure 8



Apêndice

MATERIAL E MÉTODOS

Captura e Aclimação

Machos adultos do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*, pesando $7.0 \pm 0.5\text{g}$, foram coletados nos marismas perto da cidade do Rio Grande (Sul do Brasil). Os caranguejos foram aclimatados em tanques com salinidade 20‰, 20°C e fotoperíodo 12:12 L:D, por 7 dias antes dos experimentos. Durante este período os animais eram alimentados com carne moída bovina regularmente.

Reagentes e Soluções

Os moduladores de óxido nítrico usados neste experimento foram comprados da Sigma (USA) (L-NAME, PTIO e BSO) e da Cayman (USA) (SIN-1). As soluções estoque foram feitas em água (L-NAME), etanol (PTIO) ou DMSO (SIN-1). Para cada solução, a diluição final foi realizada em solução fisiológica, e a concentração final dos solventes nunca excedeu 1%. A solução de BSO foi feita diretamente em solução fisiológica sem estoque. A composição da solução fisiológica foi em mmol l^{-1} : MgCl_2 , 0.01; NaCl, 0.355; CaCl_2 , 0.016; H_3BO_3 , 0.005; KHCO_3 , 0.010; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 0.008; pH 7.6.

Ensaio *in vivo*

Nos ensaios *in vivo*, somente caranguejos apedunculados foram usados. A ablação foi realizada 24 horas antes do início do experimento. Os caranguejos receberam a injeção (100 μL) de L-NAME (N^G -nitro-L-arginina-metil-éster, um análogo e competidor da L-arginina) (500 nmol/animal), PTIO (2-Fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxi-3-óxido, um sequestrador de NO)

(10 nmol/animal) ou BSO (buthionina sulfoximina, um inibidor da - glutamincisteína) (14,5 nmol/animal) 15 minutos antes da exposição. O grupo controle recebeu somente injeção de solução fisiológica (100 μ L). Para o experimento com BSO, o grupo controle recebeu solução fisiológica e 1% de DMSO e para o experimento com PTIO, o grupo controle recebeu solução fisiológica com 1% de etanol.

Os animais foram irradiados durante 30 minutos com diferentes doses de UVA (6.4; 1.5; 0.6; 0.2; 0.07 J/cm²) e UVB (8.1; 3.1; 1.2; 0.9; 0.6; 0.03 J/cm²). As lâmpadas de UVA (VL:115 L, 30W) ou UVB (VL:115 C, 30W; Vilber Lourmat, Marne Lavalee, França) foram monitoradas usando um radiômetro-fotômetro (modelo IL 1400A, lâmpada internacional, Newburyport, MA, USA). A lâmpada de UVA tinha irradiação de 1.39 mW/cm², com contaminação de 0.006 1.39 mW/cm² de UVB e 928.0 mW/cm² de luz visível. A lâmpada de UVB tinha irradiação de 1.195 mW/cm², com contaminação de 493 W/cm² de UVA e 0.113 W/cm² de luz visível. Ambas as lâmpadas não apresentaram contaminação com UVC. Durante a exposição, os animais foram mantidos sob a mesma temperatura.

Um grupo controle extra mantinha os caranguejos sem a exposição a radiação UV, mas mantido sob a exposição de lâmpadas fluorescentes (Philips-TLT 40W/75, São Paulo Brasil com irradiação de 96.0 mW/cm² de luz visível). Esses animais também receberam a injeção (100 μ L) de reagentes (L-NAME, PTIO ou BSO) ou solução fisiológica.

Observação

A dispersão pigmentar foi verificada usando a escala de Hogben e Slome (1931), o qual define o estágio 1 como o grau de agregação máxima, estágio 5 como grau de dispersão máxima e os estágios 2,3 e 4 como estágios intermediários. A região escolhida para observação foi o meropodito do terceiro par de maxilípedes, devido o fato desta região ter um exoesqueleto fino e de coloração clara, facilitando assim a observação.

O grau de dispersão pigmentar foi avaliado antes da injeção, 15 min após a injeção e 0, 15, 30, 60, 90, 120 e 150 min depois da exposição à radiação UV. Para esse resultados, a resposta integrada padrão (SIR) como descrito por Fingerman e Yamamoto (1967), foi calculado para determinar a curva dose-resposta (DRCs).

Ensaio *in vitro*

Nos ensaios *in vitro*, o meropodito do terceiro par de maxilípedes foi encubado em solução fisiológica por 30 min antes dos experimentos. As peças foram tapadas com um vidro, o qual foram virados e montados numa câmara de perfusão, como descrito por Britto *et al.* (1990). Essa preparação recebeu concentrações crescentes de SIN-1 (0.01 M; 0.1 M; 1 M; 10 M). Para o teste do efeito do BSO, as peças foram previamente encubadas em uma solução de BSO (300 M) durante 30 min antes do experimento. Concentrações crescentes de SIN-1 (0.01 M; 0.1 M; 1 M; 10 M) e BSO (300 M) foi colocado na câmara de perfusão. As curvas dose-resposta cumulativas para o SIN-1 foram determinadas como segue: a solução fisiológica foi substituída pelas concentrações do doador de NO, e a resposta

pigmentar avaliada sobre a luz com auxílio de um ocular micrométrico. Depois a resposta máxima para uma concentração foi determinada, a resposta foi calculada como a percentagem do processo de mudança aparente no comprimento dos braços de um melanóforo previamente escolhido.

Análise Histológica

NADPH diaforase

Pereiópodos de caranguejos adultos foram dissecados e fixados em 4% de paraformaldeído por 4h em solução tampão fosfato (PBS) 0.1 M, lavados em PBS (3 vezes) e imersos em PBS e sacarose (30%) durante a noite. No dia seguinte o material foi empreguinado em OCT (Miles Inc.) e os cortes de 16 μ m foram obtidos usando criostato. Os cortes histológicos foram lavados em PBS com Tween 20 (0.05%) durante 5 min e incubados com 100 μ L do substrato contendo 1mg/mL β -NADPH (Sigma) e 1mg/mL de NBT (Nitro blue tetrazolium, Sigma) por 2h a 37°C em uma câmara úmida. Os cortes foram então lavados em 0.05 M Tris/HCl com pH 7.6, desidratados em álcool e montados em Entelan (Merck).

Imunocitoquímica

Os pereiópodos de caranguejos adultos foram fixados com solução de Lillie por 30 dias no verão e 90 dias no inverno, e empreguinados em parafina e cortados usando um micrótomo de rotina. Os cortes (10 μ m) montados em lâminas contendo gelatina foram desparafinizadas e levados em PBS 0.1 M por 5 min. O próximo procedimento foi realizado usando o ProTaq[®] Stain ABC-POD kit. Para bloquear as endógenas peroxidases, os cortes foram incubados

com 3% de H₂O₂ e levados em PBS. Para bloquear a ligação dos sítios inespecíficos foram realizados com reagentes bloqueadores. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo primário (coelho anti nNOS; Sigma) durante a noite a 4°C. No dia seguinte, foram lavados em PBS, incubados com o anticorpo secundário e lavados em PBS novamente. Os cortes foram então cobertos com Strptavidin-complex e incubados por 30 min. Após, os cortes foram lavados em PBS e cobertos com solução de DAB-Chromogeno e incubados até corar satisfatoriamente. Os cortes foram lavados em água destilada, corados com hematoxilina e montados com ProaTaq^s® (PARAMount).

Análise Estatística

As curvas dose-resposta foram obtidas pelo método de regressão não linear. Para verificar as diferenças na dispersão pigmentar em função da radiação UV ou da exposição ao NO, os dados foram comparados com a análise de variância de duas vias. O nível de significância foi 95%.