UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

JOCELMO CÁSSIO DE ARAUJO LEITE

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE OURIÇOS-DO-MAR DA ESPÉCIE *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) ENVOLVE INFLUXO DE CÁLCIO ATRAVÉS DOS CANAIS DE CÁLCIO SENSÍVEIS À VOLTAGEM.

JOÃO PESSOA – PB
2011

JOCELMO CÁSSIO DE ARAUJO LEITE

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE OURIÇOS-DO-MAR DA ESPÉCIE *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) ENVOLVE INFLUXO DE CÁLCIO ATRAVÉS DOS CANAIS DE CÁLCIO SENSÍVEIS À VOLTAGEM.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica "Prof. Delby Fernandes de Medeiros" da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

JOÃO PESSOA – PB

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L533d Leite,Jocelmo Cássio de Araújo.
Desenvolvimento embrionário de Ouriços-do-mar da espécie Echinometra lucunter (Linnaeus, 1758) envolve influxo de cálcio através dos canais de cálcio sensíveis à voltagem / Jocelmo Cássio de Araújo Leite. - - João Pessoa : [s.n.], 2011.
133f. : il.
Orientador: Luis Fernando Marques dos Santos.
Co-orientador: Bagnólia Araújo da Silva.
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS.

1.Produtos naturais. 2.Farmacologia. 3.Echinometra lucunter. 4.Desenvolvimento embrionário. 5.Bloqueadores de Ca_v.

JOCELMO CÁSSIO DE ARAUJO LEITE

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE OURIÇOS DO MAR DA ESPÉCIE *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) ENVOLVE INFLUXO DE CÁLCIO ATRAVÉS DOS CANAIS DE CÁLCIO SENSÍVEIS À VOLTAGEM.

Aprovado em 25 de Fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos

Orientador

_____

Profa. Dra. Rosimeire Ferreira dos Santos

Examinadora Externa

_____

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Examinadora Interna

Dedicatórias

Aos meus pais, pelo imenso apoio e pelo amor incondicional que foram o impulso para seguir caminhando com coragem em meio às adversidades diárias.

A todos os membros do laboratório, desde alunos, técnicos e professores, que doam partes de si mesmos por amor à ciência.

Àqueles que se mantiveram firmes na busca de seus sonhos, sobretudo quando seria mais fácil desistir deles.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos pela ciência, paciência, apoio e incentivo para comigo e por todo esforço e dedicação depositados nesse trabalho. Pela confiança em entregar suas turmas de biologia celular para eu ministrar aulas no estágio docência. Por ser um grande exemplo de profissional e principalmente pela amizade construída ao longo desses quatro anos de trabalho.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva pelos ensinamentos passados durante a disciplina Mecanismos de Transdução Celular e pelas valiosas dicas que contribuíram para melhor execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. George Miranda por ter fornecido a água filtrada utilizada em parte desse trabalho.

Aos Professores Dr. José Maria Barbosa Filho, Dr. José Pinto de Siqueira Junior e Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas por terem gentilmente cedido substâncias imprescindíveis para a execução desse trabalho.

À Profa Dra. Regina Célia Bressan Queiroz Figueiredo do Centro de Pesquisa Ageu Magalhães por sua disponibilidade e auxílio nos ensaios utilizando microscopia confocal.

Aos membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

Aos Professores Barbosa, Celidarque, Demétrius, Isac, Liana, Luis Cezar, Margareth, Reinaldo, Rui e Sandra pelos conhecimentos passados.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos em nome dos Professores Dra. Maria de Fátima Agra e Dr. Josean Fechine Tavares pela competência pela qual coordenam esse Programa.

À Tânia, Carol e Francis, secretárias da Pós-Graduação, por toda dedicação, disponibilidade e eficiência.

Ao Departamento de Biologia Molecular (DBM) e a Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por possibilitar a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico através do Portal de Periódicos.

Aos técnicos do LABID, Antônio Bosco e Socorro Noronha, por sua dedicação, competência e ajuda indispensável nas nossas práticas laboratoriais.

Aos ex-colegas de laboratório: Airlla, Christiane, Gabriel e Larissa, com os quais iniciei meus primeiros passos na bancada, pelo aprendizado, apoio e incentivo.

À minhas alunas de IC, Airlla, Elis, Talita Oliveira e Talita Pacheco, pela amizade e imensa contribuição nesse trabalho.

A todos os colegas e amigos que estão ou passaram pelo Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, entre eles, Amanda, Aron, Elis, Eloi, Helena, Isabela, Laura, Layla, Leo, Lívia, Mônica, Rafaella, Taissa, Talita Oliveira, Talita Pacheco, Talitta Dantas e Suelenn, pela boa convivência, gargalhadas, por toda a ajuda e incentivo.

Aos alunos das turmas de farmácia 2010.1 e 2010.2, onde realizei o estágio docência, por toda contribuição na minha carreira profissional.

A todos os colegas e amigos da minha turma de mestrado, especialmente a Augusto, Camila, Corrinha, Gedson, Jaime, Juliana, Lázaro, Luciana, Mônica, Raquel e Thyago pela amizade construída ao longo desses dois anos de convivência.

Aos inesquecíveis amigos de graduação, especialmente a Carol, Dimitri, Felipe Alves, Felipe Campos, Héllio, João Guilherme, Marcela e Nyara, pelos inesquecíveis momentos e, por apesar da distância, fazerem parte da minha vida.

Aos “amigos do Altar”, que são minha segunda família, pelas orações e por tornar minha vida mais colorida.

À Socorro e Raisa pelos divertidíssimos domingos em família e pelo apoio em todos os momentos.

À minha mãe, Maria Selma de Araujo, pelo exemplo de amor e de fé, e por me ensinar valores inesquecíveis.

Ao meu pai, José Leite Formiga, pelo exemplo de força de vontade, pela confiança e incentivo, e por me ensinar a não ter medo do trabalho.

À Deus, âncora da minha vida, por permitir mais uma vez a realização de um sonho.

Agradeço de coração!

"Pensamos demasiadamente,

Sentimos muito pouco.

Necessitamos mais de humildade que de máquinas.

Mais de bondade e ternura que de inteligência.

Sem isso, a vida se tornará violenta e tudo se perderá.".

Charles Chaplin

Resumo

RESUMO

O Ca^{2+} é um mensageiro intracelular que controla uma ampla variedade de funções fisiológicas por meio de alterações na sua concentração citosólica ($[Ca^{2+}]_c$). O aumento na $[Ca^{2+}]_c$ é derivado da liberação a partir de estoques intracelulares ou do influxo através dos canais, principalmente os sensíveis à voltagem (Ca_v), presentes na superfície celular. De acordo com a literatura científica, a embriogênese de ouriços-do-mar é um processo regulado exclusivamente pela liberação de Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático, sendo o influxo dispensável para esse processo. Entretanto, há relatos em diversas espécies do reino animal onde o influxo de Ca^{2+} é crucial para a embriogênese. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação do influxo de Ca^{2+} na fertilização e no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*, uma espécie de ouriço-do-mar com ampla distribuição na costa Brasileira. Dessa forma, óvulos e embriões de *E. lucunter* foram tratados com diversas ferramentas farmacológicas e a fertilização e o desenvolvimento embrionário monitorados. A incubação dos gametas em meio isento de Ca^{2+} inibiu a fertilização e o tratamento dos embriões com quelantes de Ca^{2+} bloqueou o desenvolvimento embrionário, sugerindo que o Ca^{2+} extracelular é fundamental para ambos os processos. Os bloqueadores de Ca_v nifedipina, diltiazem e verapamil também foram eficazes no bloqueio da fertilização e do desenvolvimento embrionário, indicando a importância desses canais para a embriogênese de *E. lucunter*. O efeito inibitório sobre o desenvolvimento embrionário não está associado à modulação de proteínas da superfamília ABC, uma vez que o desenvolvimento embrionário ocorreu de forma normal, mesmo com a inibição dessas proteínas. O efeito inibitório do verapamil foi revertido pela adição prévia de valinomicina e tal fato pode estar relacionado a um provável aumento da $[Ca^{2+}]_c$ induzido por este ionóforo de K^+. A ouabaína, um bloqueador da Na^+/K^+-ATPase, capaz de ativar o modo reverso do trocador Na^+/Ca^{2+}, também reverteu a inibição do desenvolvimento induzida pelo verapamil. Essa reversão não foi observada quando os compostos foram adicionados aos embriões após o verapamil, sugerindo uma relação temporal no efeito inibitório desses bloqueadores. O efeito inibitório do verapamil e do quelante de Ca^{2+} EGTA foi dependente de tempo, sendo ausente 50 minutos após a fertilização, sugerindo que o influxo de Ca^{2+} é um fator determinante apenas nos primeiros minutos do desenvolvimento embrionário. Contudo, o Ca^{2+} intracelular é indispensável para a embriogênese, uma vez que os tratamentos com o BAPTA-AM, um quelante intracelular de Ca^{2+}, e com trifluoperazina ou clorpromazina, bloqueadores do complexo Ca^{2+}-calmodulina, inibiram a embriogênese de *E. lucunter.* Adicionalmente, foi verificado que a rotundifolona, um composto de origem vegetal com atividade vaso-relaxante atribuída ao bloqueio dos Ca_v, inibiu o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*, obtendo um perfil inibitório similar ao observado em musculatura lisa vascular. Portanto, esses resultados sugerem que o influxo de Ca^{2+} é essencial para a embriogênese de *Echinometra lucunter* e legitima o desenvolvimento embrionário desse animal como um excelente modelo farmacológico para a prospecção de produtos naturais e sintéticos bioativos que interferem na dinâmica celular do Ca^{2+}.

Palavras-Chave: *Echinometra lucunter*, cálcio, fertilização, desenvolvimento embrionário, bloqueadores de Ca_v.

Abstract

ABSTRACT

Ca^{2+} is an intracellular messenger that controls a wide range of physiological functions through changes in its cytosolic concentration ($[Ca^{2+}]_c$). The increase in $[Ca^{2+}]_c$ is derived of mobilization from intracellular stores or influx through channels, especially voltage-gated (Ca_v), present on cell surface. According to scientific literature, sea urchins embryogenesis is a process induced exclusively by the release of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum, and Ca^{2+} influx is not necessary for this process. However, there are studies in several species of the animal kingdom where Ca^{2+} influx is crucial for embryogenesis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the involvement of Ca^{2+} influx at fertilization and embryonic development of *Echinometra lucunter*, a species of sea urchins with wide distribution on Brazilian coast. Thereby, eggs and embryos of *E. lucunter* were treated with various pharmacological tools and fertilization and embryonic development were monitored. Incubation of gametes in Ca^{2+} free medium inhibited fertilization and embryo treatment with Ca^{2+} chelators blocked embryonic development, suggesting that extracellular Ca^{2+} is essential for both processes. Ca_v blockers nifedipine, diltiazem and verapamil were also effective in blocking fertilization and embryo development, showing the importance of these channels to embryogenesis of *E. lucunter.* Inhibitory effect on embryo development is not associated with modulation of ABC superfamily proteins, since embryonic development was not affected, even under inhibition of these proteins. Verapamil inhibitory effect was reversed by prior addition of valinomycin which may be related to a probable increase of $[Ca^{2+}]_c$ induced by K^+ ionophore. ouabain, a Na^+/K^+-ATPase blocker that activates the reverse mode of Na^+/Ca^{2+}, also reversed inhibition of development induced by verapamil. The reversal was not observed when compounds were added to embryos after verapamil, suggesting a temporal profile in inhibitory effect of these blockers. Inhibitory effects of verapamil and Ca^{2+} chelator EGTA were time-dependent, being absent 50 minutes after fertilization, suggesting that Ca^{2+} influx is seminal only in the first minutes of embryonic development. However, intracellular Ca^{2+} is essential for embryogenesis, since treatments with BAPTA-AM (chelator of intracellular Ca^{2+}) and chlorpromazine or Trifluoperazine (Ca^{2+}-calmodulin complex blockers) inhibited *E. lucunter* embryogenesis. Additionally, it was found that the rotundifolone, a plant-derived compound with vasorelaxing activity, attributed to the blockade of Ca_v, inhibited *E. lucunter* embryonic development showing an inhibitory profile similar to observed in vascular smooth muscle. Therefore, these results suggest that Ca^{2+} influx is essential for *Echinometra lucunter* embryogenesis and certify the embryonic development of this animal as appropriated pharmacological model for the investigation of natural and synthetic products that interferes in Ca^{2+} cellular dynamics.

Keywords: *Echinometra lucunter*, calcium, fertilization, embryo development, Ca_v blockers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação dos mecanismos de restituição da $[Ca^{2+}]_c$ 03

Figura 2: Representação esquemática da liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático regulada pelo IP_3..... 05

Figura 3: Representação esquemática de um canal de Ca^{2+} operado por voltagem..... 07

Figura 4: Fórmula estrutural dos principais bloqueadores de canais de Ca^{2+} utilizados na clínica e em estudos farmacológicos..... 09

Figura 5: Representação gráfica da onda de Ca^{2+} em óvulos fertilizados de *Lytechinus pictus*..... 12

Figura 6: Ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* em seu habitat..... 25

Figura 7: Identificação do sexo dos animais..... 29

Figura 8: Obtenção dos gametas por meio da injeção de KCl (0,5 M) na cavidade peritoneal de um ouriço-do-mar..... 30

Figura 9: Coleta dos gametas masculinos..... 30

Figura 10: Coleta dos gametas femininos..... 31

Figura 11: Protocolo experimental de avaliação do papel do Ca^{2+} extracelular na fertilização de *Echinometra lucunter*..... 33

Figura 12: Protocolo experimental de avaliação do efeito de bloqueadores de Cav na fertilização de *Echinometra lucunter*..... 34

Figura 13: Protocolo experimental de avaliação do efeito de quelantes de Ca^{2+} no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 35

Figura 14: Protocolo experimental para avaliar o efeito de bloqueadores de Ca_v no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 36

Figura 15: Representação esquemática do ensaio de C-AM para identificação de atividade de proteínas ABC em determinado tipo celular ou determinação de atividade moduladora de

diversos compostos sobre essas proteínas..... 38

Figura 16: Protocolo experimental de avaliação do efeito de bloqueadores de Cav no acúmulo intracelular de C-AM em embriões de *Echinometra lucunter*..... 39

Figura 17: Primeiro protocolo experimental para avaliar o efeito da VL, NG e OUA na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* induzido pelo VP..... 40

Figura 18: Segundo protocolo experimental de avaliação do efeito da VL, NG e OUA na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* induzido pelo VP..... 41

Figura 19: Protocolo experimental de avaliação do efeito do VP e do EGTA em diferentes intervalos de tempo na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 42

Figura 20: Protocolo experimental de avaliação do efeito da associação Reversina 205 e Verapamil no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 43

Figura 21: Protocolo experimental de avaliação do efeito do BAPTA-AM, da TFP e da CPZ no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 44

Figura 22: Protocolo experimental de avaliação do efeito da IONO na ativação de óvulos de E. lucunter..... 45

Figura 23: Protocolo experimental de avaliação do efeito da ROT no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 46

Figura 24: Fotomicrografias fluorescentes de embriões 2-4 células incubados com C-AM e tratados com diferentes concentrações de NF, VP e DT..... 68

Figura 25: Análise comparativa entre o espaço perivitelínico de óvulos fertilizados de *Strongilocentrotus purpuratus* (A) (VOGEL et al., 1999) e óvulos de *Echinometra lucunter* fertilizados (B) ou tratados com IONO em ASW (C)..... 93

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Envolvimento do Ca^{2+} extracelular na fertilização de *Echinometra lucunter*..... 50

Gráfico 2: Efeito de bloqueadores de Ca_v na fertilização de *Echinometra lucunter*..... 52

Gráfico 3: Efeito do EDTA na progressão para o estágio de primeira clivagem (A) e segunda clivagem (B)..... 55

Gráfico 4: Efeito do EGTA na progressão para o estágio de primeira clivagem (A) e segunda clivagem (B)..... 57

Gráfico 5: Efeito da NF na progressão para o estágio de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B) e mórula (C)..... 60

Gráfico 6: Efeito do VP na progressão para o estágio de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B) e mórula (C)..... 62

Gráfico 7: Efeito do DT na progressão para o estágio de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B) e mórula (C)..... 64

Gráfico 8: Efeito de bloqueadores de Ca_v no acúmulo intracelular de C-AM em embriões de 2-4 células..... 67

Gráfico 9: Efeito da VL na reversão do efeito inibitório do VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem (A) e para o estágio de mórula (B)..... 70

Gráfico 10: Efeito da adição tardia da VL na reversão do efeito inibitório do VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem (A) e para o estágio de mórula (B)..... 72

Gráfico 11: Efeito da NG na reversão do efeito inibitório do VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem (A) e para o estágio de mórula (B)..... 74

Gráfico 12: Efeito da adição tardia da NG na reversão do efeito inibitório do VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem (A) e para o estágio de mórula (B)..... 76

Gráfico 13: Efeito da OUA na reversão do efeito inibitório do VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem (A) e para o estágio de mórula (B)..... 78

Gráfico 14: Efeito da adição tardia de OUA na reversão do efeito inibitório do

VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem (A) e para o estágio de mórula (B)..... 80

Gráfico 15: Efeito tempo-dependente do bloqueio da progressão para o estágio de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B) e mórula (C) induzido pelo VP..... 83

Gráfico 16: Efeito da associação entre REV e VP na progressão para o estágio de segunda clivagem..... 85

Gráfico 17: Efeito do EGTA na progressão para o estágio de primeira clivagem (A) e segunda clivagem (B)..... 87

Gráfico 18: Efeito do BAPTA-AM na progressão para o estágio de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B) e mórula (C)..... 89

Gráfico 19 Efeito da TFP e da CPZ na progressão para os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B) e mórula (C)..... 91

Gráfico 20: Efeito da ROT na progressão para o estágio de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B) e mórula (C)..... 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Eventos iniciais e tardios da fertilização e do desenvolvimento embrionário de Ouriços-do-mar..... 18

Tabela 2: Composição da ASW..... 28

Tabela 3: Composição da ASW Ca^{2+} *free*..... 28

Tabela 4: Valores da CE_{50} para os bloqueadores de Ca_v na fertilização obtidos por meio de uma regressão não linear..... 53

Tabela 5: Valores da CE_{50} para o efeito inibitório do EDTA e EGTA no desenvolvimento embrionário, obtidos por meio de uma regressão não linear..... 58

Tabela 6: Valores da CE_{50} para os bloqueadores de Ca_v no desenvolvimento embrionário, obtidos por meio de uma regressão não linear..... 65

Tabela 7: Efeito da IONO na ativação dos óvulos de *E. lucunter* na presença (ASW) ou ausência de Ca^{2+} extracelular (ASW Ca^{2+} *free*)..... 92

LISTA DE ABREVIATURAS

$[Ca^{+2}]_i$	Concentração intracelular de íon cálcio
ABC	Do inglês, *ATP binding cassete*
ADP	Difosfato de adenosina
ASW	Água do mar artificial (do inglês, *Artificial Sea Water*)
ASW Ca^{2+} *free*	Água do mar artificial nominalmente isenta de íons Ca^{2+}
BAPTA-AM	1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético Tetra-(acetoximetil) Ester
C-AM	Calceína-AM
Ca_v	Canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem
$_c$ADPr	Adenosina difosfato ribose cíclica
CE_{50}	Concentração de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo
CPZ	Clorpromazina
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DT	Diltiazem
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetraacético
EGTA	Efeito do ácido etilenoglicol-bis-(β-aminoetiléter) N, N, N', N'-tetraacético
EPM	Erro padrão da média
FSW	Água do mar filtrada (do inglês, *Filtered Sea Water*)
HVA	Canais ativados por alta voltagem (do inglês, *high voltage-activate*).
IMF	Intensidade média de fluorescência
IONO	Ionomicina
IP_3	1,4,5 – trifosfato de inositol
LVA	Canais ativados por baixa voltagem (do inglês, *low voltage-activate*).
MDR	Resistência a múltiplas drogas (do inglês, *multidrug resistence*)
NAADP	Ácido nicotínico adenina dinucleotídeo fosfato

NF	Nifedipina
NG	Nigericina
OUA	Ouabaína
pHi	Potencial hidrogeniônico intracelular
PIP_2	4,5 – difosfato de fosfatidilinositol
PLC	Fosfolipase C
PMCA	Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática (do inglês, *Plasma membrane Ca^{2+} ATPase*)
ROT	Rotundifolona
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SERCA	Ca^{2+} ATPase do retículo sarco/endoplasmático (do inglês, *Sarco/endoplasmatic reticulum Ca^{2+} ATPase*)
SPCA	Ca^{2+} ATPase da via secretória (do inglês, *Secretory pathway Ca^{2+} ATPase*)
TFP	Trifluoperazina
u. a.	Unidades arbitrárias
VL	Valinomicina
VP	Verapamil

OBS: as abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontra-se descrita no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO.....**	01
1.1	O Cálcio Como Mensageiro Intracelular.....	02
1.2	Canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem e seus antagonistas.....	05
1.3	Papel biológico do Ca^{2+} na fertilização e desenvolvimento embrionário.....	11
1.4	Ouriços-do-mar como modelo experimental.....	14
1.5	Aspectos morfológicos e moleculares da fertilização e desenvolvimento embrionário de Ouriços-do-mar.....	16
1.6	Influxo e mobilização de Ca^{2+} em protostômios e deuterostômios.....	20
2	**OBJETIVOS.....**	22
2.1	Objetivo geral.....	23
2.2	Objetivos específicos.....	23
3	**MATERIAL E MÉTODOS.....**	24
3.1	**MATERIAL.....**	25
3.1.1	Animais.....	25
3.1.2	Fármacos utilizados.....	26
3.1.3	Soluções estoques.....	27
3.1.4	Água do mar artificial.....	27
3.2	**MÉTODOS.....**	28
3.2.1	Identificação do sexo dos animais.....	28
3.2.2	Obtenção dos gametas.....	29
3.2.3	Fertilização *in vitro*.....	31
3.4.4	Ensaios farmacológicos.....	32
3.4.4.1	Efeito do Ca^{2+} extracelular na fertilização de *Echinometra lucunter*.....	32
3.4.4.2	Efeito de bloqueadores de canais de Ca^{2+} na fertilização de *Echinometra lucunter*.....	34
3.4.4.3	Efeito de quelantes de Ca^{2+} no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*.....	35

3.4.4.4 Efeito de bloqueadores de canais de Ca^{2+} no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 36

3.4.4.5 Efeito dos bloqueadores de Ca_v no acúmulo intracelular de Calceína-AM em embriões de *Echinometra lucunter*..... 37

3.4.4.6 Efeito da Valinomicina, Nigericina e Ouabaína na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* induzido pelo Verapamil..... 40

3.4.4.7 Efeito do Verapamil e do EGTA em diferentes intervalos de adição no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 42

3.4.4.8 Efeito da Reversina 205 em associação com o Verapamil no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 43

3.4.4.9 Efeito do BAPTA-AM, da Trifluoperazina e da Clorpromazina no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 44

3.4.4.10 Efeito da Ionomicina na ativação de óvulos de *Echinometra lucunter*..... 45

3.4.4.11 Efeito da Rotundifolona no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 46

3.4.5 Análise estatística..... 47

4 RESULTADOS..... 48

4.1 Envolvimento do Ca^{2+} extracelular na fertilização de *Echinometra lucunter*..... 49

4.2 Efeito de bloqueadores de canais de Ca^{2+} na fertilização de *Echinometra lucunter*..... 51

4.3 Efeito de quelantes de Ca^{2+} no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 54

4.3.1 Efeito do EDTA no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 54

4.3.2 Efeito do EGTA no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 56

4.3.3 Valores da CE_{50} referentes ao tratamento dos embriões de *E.*

lucunter com quelantes de Ca^{2+}..... 58
4.4 Efeito de bloqueadores de canais de Ca^{2+} no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 59
4.4.1 Efeito da Nifedipina no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 59
4.4.2 Efeito do Verapamil no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 61
4.4.3 Efeito do Diltiazem no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 63
4.4.4 Valores da CE_{50} referentes ao tratamento dos embriões de *E. lucunter* com bloqueadores de Ca_v..... 65
4.5 Efeito dos bloqueadores de Ca_v no acúmulo intracelular de Calceína-AM em embriões de *E.lucunter*..... 66
4.6 Efeito da Valinomicina na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* induzido pelo Verapamil.... 69
4.7 Efeito da Nigericina na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* induzido pelo Verapamil..... 73
4.8 Efeito da Ouabaína na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* induzido pelo Verapamil..... 77
4.9 Efeito do VP em diferentes intervalos de adição no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 81
4.10 Efeito da Reversina 205 (REV) em associação com o VP no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 84
4.11 Efeito do EGTA em diferentes intervalos de adição no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 86
4.12 Efeito do BAPTA-AM no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 88
4.13 Efeito de bloqueadores do complexo Ca^{2+}- Calmodulina no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 90
4.14 Efeito da Ionomicina na ativação de óvulos de *Echinometra lucunter*..... 92
4.15 Análise comparativa entre o espaço perivitelínico de duas espécies de ouriços-do-mar..... 93

4.16 Efeito da Rotundifolona no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*..... 94

5 DISCUSSÃO..... 96

6 CONCLUSÕES..... 114

REFERÊNCIAS..... 116

ANEXOS..... 132

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Cálcio Como Mensageiro Intracelular

O Cálcio (Ca^{2+}) é um íon inorgânico divalente que apresenta uma considerável importância em numerosos processos biológicos. Em sua forma insolúvel, é o principal constituinte estrutural de ossos, dentes e cartilagens calcificadas. Já em sua forma solúvel representa um importante papel na estabilização da membrana plasmática e da parede celular, na modulação de atividade enzimática e reação de polimerização, atuando também, como mensageiro secundário intracelular (KASS; ORRENIUS, 1999; GILLIOT et al., 1990).

O conceito do Ca^{2+} como condutor de sinais intracelulares foi introduzido em 1883 pelo cientista britânico Sydney Ringer. Estudando a contração de células musculares cardíacas isoladas de ratos, Ringer percebeu que a adição de sais de Ca^{2+} (cloreto de cálcio e bicarbonato de cálcio) no meio de suspensão induziu a manutenção da contração muscular. Com esse trabalho pioneiro, o autor inseriu o Ca^{2+} pela primeira vez no contexto da fisiologia celular, não se restringindo ao papel estrutural tão extensivamente relacionado a esse íon (RINGER, 1883).

Ao longo das décadas, com o avanço das técnicas de medidas da concentração citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$) e o advento de sondas fluorescentes sensíveis ao Ca^{2+}, vários processos celulares sinalizados por esse íon foram amplamente elucidados. Atualmente, é um consenso na literatura científica que o íon Ca^{2+} é um mensageiro intracelular ubíquo que controla funções vitais como a contração muscular (HEILBRUNN, 1940), a glicogenólise (LANDOWNE; RITCHIE, 1971), a diferenciação celular (GRIFFIN, 1966), a exocitose (SCHNEIDER et al., 1967), a dor (SCHROEDER; MCCLESKEY, 1993), a transcrição gênica (KAISER; EDELMAN, 1977), a apoptose (RODRIGUEZ-TARDUCHY et al., 1990), entre várias outras.

Todas as funções fisiológicas mediadas pelo íon Ca^{2+} são reguladas por alterações na $[Ca^{2+}]_c$. No meio citosólico, o Ca^{2+} é mantido normalmente em níveis muito baixos (~ 10^{-7} M) em relação ao meio extracelular (~ 10^{-3} M). Sob a indução de vários tipos de estímulos, a $[Ca^{2+}]_c$ aumenta transitoriamente para níveis que variam

de acordo com o tipo celular, como 10^{-1} M em células musculares estriadas esqueléticas, 10^{-3} M em células germinativas e 10^{-5} M em células do sistema imunológico (IINO, 2010). Ao fim do estímulo inicial os níveis de Ca^{2+} citosólicos são restituídos graças ao transporte ativo primário mediado pelas ATPases presentes na membrana plasmática (PMCA, do inglês *plasm membrane* Ca^{2+} *ATPase*), na membrana do retículo endoplasmático (SERCA, do inglês *sarco/endoplasmatic reticulum* Ca^{2+} *ATPase*), e na membrana do complexo golgiense (SPCA, do inglês *secretory pathway* Ca^{2+} *ATPase*), além da atividade do trocador Na^{+}/Ca^{2+} , que exerce um transporte ativo secundário acoplando o efluxo de Ca^{2+} ao influxo de Na^{+}, e do transporte passivo de Ca^{2+} para o interior da mitocôndria através do transportador presente na membrana mitocondrial interna (Figura 1) (BRINI; CARAFOLI, 2009; DUMAN et al., 2008; KIRICHOK et al., 2004).

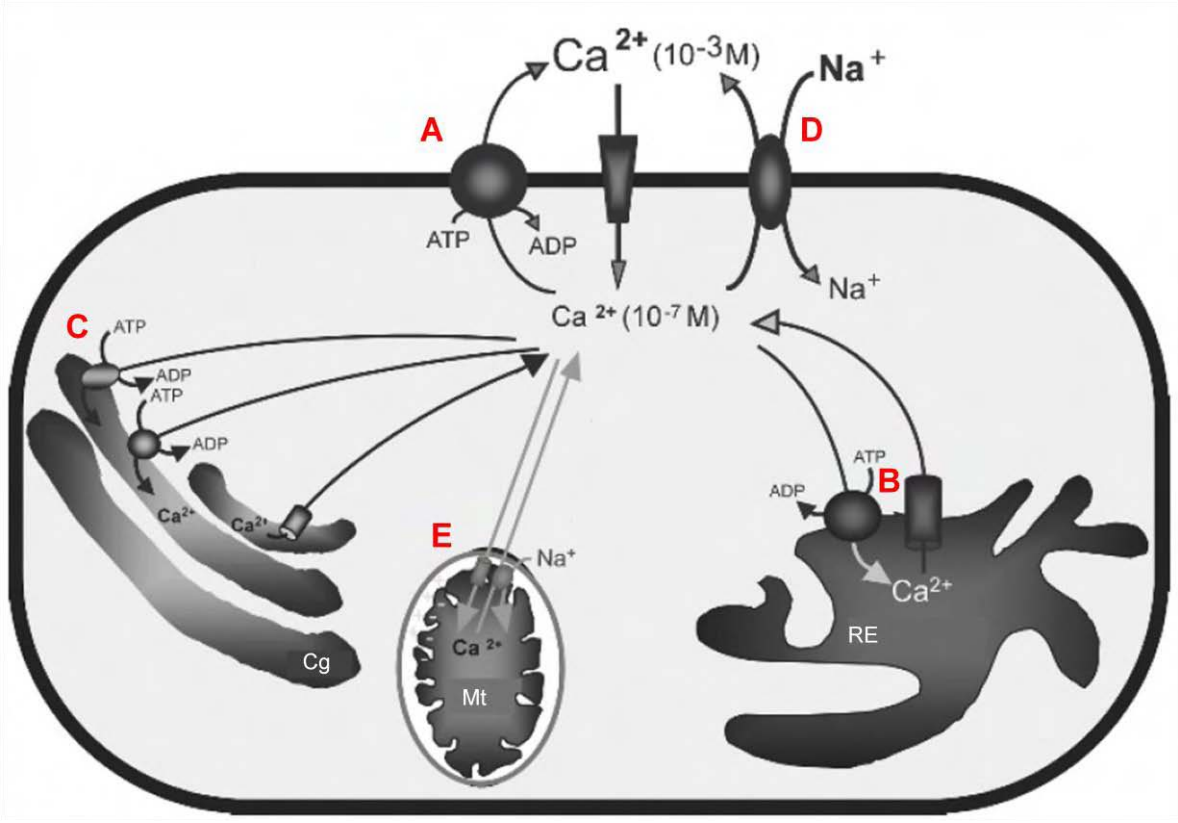

Figura 1 – Representação dos mecanismos de restituição da $[Ca^{2+}]_c$ por meio da atividade da Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática (A), Ca^{2+} ATPase do retículo sarco/endoplasmático (B), Ca^{2+} ATPase da via secretórias (C), trocador Na^{+}/Ca^{2+} (D) e transportador mitocondrial de Ca^{2+} (E). Estão representados também os mecanismos de influxo pela membrana e de liberação intracelular de Ca^{2+} a partir retículo endoplasmático, mitocôndria e complexo golgiense. Cg: Complexo Golgiense; Mt: Mitocôndria; RE: Retículo Endoplasmático. Fonte: Modificado de CARAFOLI, 2007.

Os aumentos transientes na $[Ca^{2+}]_c$ são oriundos de duas fontes principais: a liberação de Ca^{2+} a partir dos estoques intracelulares ou através do influxo desse íon por intermédio dos canais presentes na membrana plasmática (KASS; ORRENIUS, 1999).

Várias organelas intracelulares como a mitocôndria, os endossomos, os lisossomos, os calciossomos, as vesículas secretórias, o complexo golgiense, e o núcleo podem armazenar grandes quantidades de Ca^{2+} (PATEL; DOCAMPO, 2010), porém, o maior estoque intracelular é o retículo endoplasmático, que alcança concentrações desse íon de aproximadamente 10^{-2} M (MONTERO et al., 1995).

A liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático pode ser regulada pelo próprio Ca^{2+} ou por uma série de mensageiros intracelulares, como adenosina difosfato ribose cíclica ($_c$ADPr), ácido nicotínico adenina dinucleotídeo fosfato (NAADP), esfingosina-1-fosfato (S1P) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), sendo este mais conhecido e estudado em diversos tipos celulares. A geração de IP_3 é resultante da ativação da enzima fosfolipase C (PLC) por meio de diferentes mecanismos, tais como: receptores acoplados a proteína G, receptores acoplados a tirosina cinase, e por meio da proteína Ras. A PLC catalisa a hidrólise do fosfolipídio de membrana, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) gerando como produtos o diacilglicerol (DAG) e o IP_3, que por sua vez, difunde-se pelo citosol, por ser um composto hidrofílico, e liga-se a receptores específicos no retículo endoplasmático, resultando na liberação de Ca^{2+} para o citoplasma (Figura 2) (BERRIDGE et al., 2003; SHUTTLEWORTH, 1997).

Por outro lado, o influxo é a principal fonte para o aumento rápido da $[Ca^{2+}]_c$. Em resposta a alguns estímulos, esse processo pode ativar diversas funções como a contração do músculo esquelético, o acoplamento excitação-contração no músculo cardíaco, a fusão vesicular e a liberação de neurotransmissores, entre outros. O influxo de Ca^{2+} é realizado através de vários tipos de canais presentes na membrana plasmática, tais como: canais de Ca^{2+} sensíveis à ligante, canais de Ca^{2+} operados por segundo mensageiros, canais de Ca^{2+} operados por estoque e os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem. A entrada de Ca^{2+} por esses canais é dirigida pelo gradiente eletroquímico do íon sendo, portanto um transporte passivo sem gasto de energia (BERRIDGE et al., 2003).

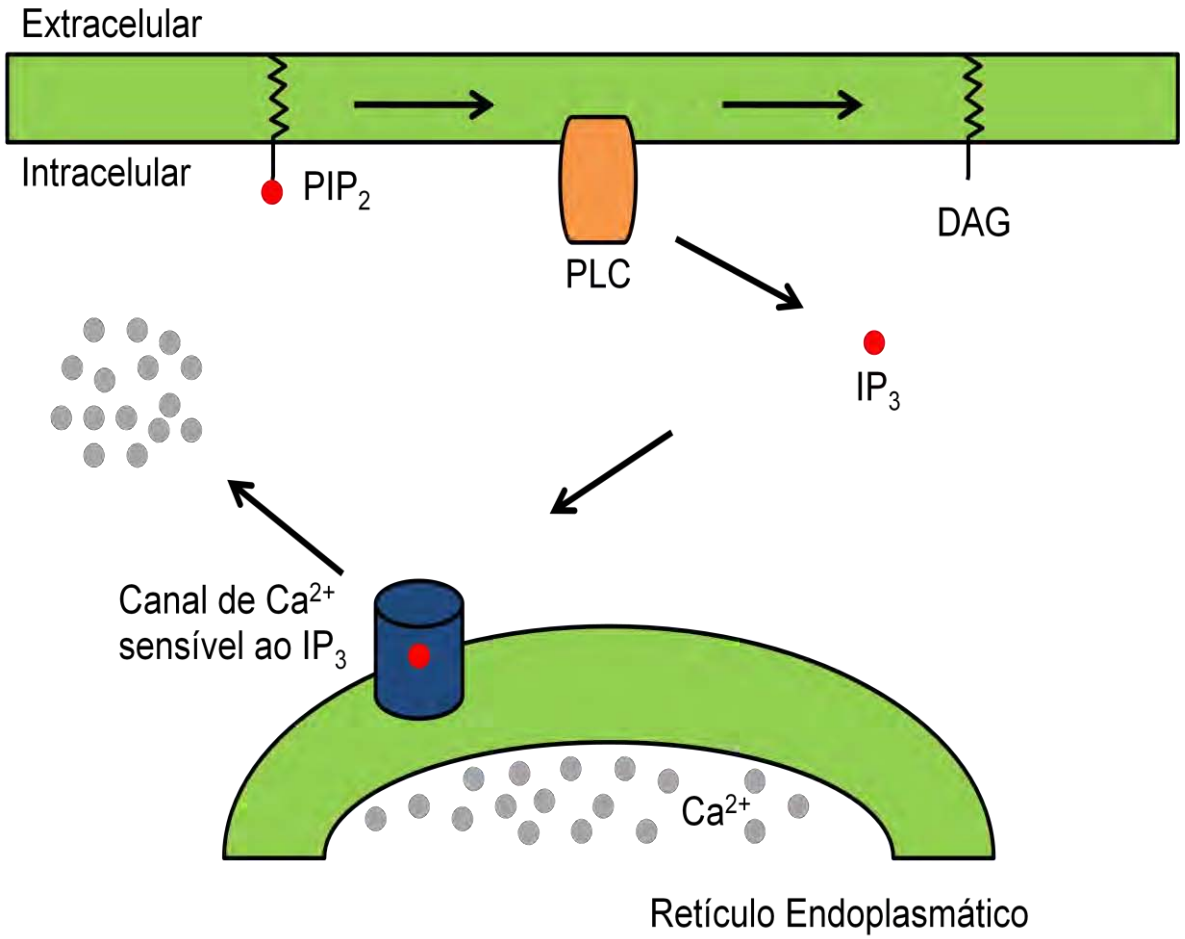

Figura 2: Representação esquemática da liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático regulada pelo IP_3. PIP_2 = fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PLC = Fosfolipase C; DAG = Diacilglicerol; IP_3 = inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3).

1.2 Canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem e seus antagonistas

Canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem são complexos protéicos presentes nas biomembranas de praticamente todas as células, desde procariontes a eucariontes. Esses canais funcionam como poros condutores de Ca^{2+} que, em resposta às alterações no potencial de membrana permitem o transporte desse íon por difusão simples. Essas proteínas representam a principal via de entrada de Ca^{2+} nos mais diversos tipos celulares (KHOSRAVANI; ZAMPONI, 2006).

Os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem foram identificados pela primeira vez em invertebrados marinhos pelos pesquisadores Pall Fatt e Bernard Katz em 1953.

Estudando fibras musculares dos crustáceos *Eupagurus bernhardus* e *Carcinus maenas*, os pesquisadores verificaram que alterações no potencial de membrana refletiam em modificação na permeabilidade da fibra ao Ca^{2+} (FATT; KATZ, 1953). Em 1985, o grupo do pesquisador francês Michel Lazdunski purificou pela primeira vez uma subunidade de um canal de Ca^{2+} sensível à voltagem a partir de fibras musculares de coelho, utilizando uma técnica similar a que obteve sucesso na purificação do primeiro canal de Na^{+} sensível à voltagem (BORSOTTO, 1985).

A partir do desenvolvimento dos métodos de patch-clamp, técnicas de biologia molecular, cristalografia de raios X e microscopia confocal pôde-se determinar, ao longo das décadas, as características biofísicas, farmacológicas, e estruturais, além da distribuição tecidual e funcional desses canais (YANG; BERGGREN, 2006).

Quanto a sua estrutura, os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem são complexos protéicos heterooligoméricos formados pelas subunidades: α_1, α_2, β, δ, e γ, cada uma com unidade de massa atômica (Da) variando conforme o tipo celular (Figura 3). A principal subunidade é a α_1, a qual forma o poro, expressa o filtro de seletividade e o sensor de voltagem do canal e apresenta o sítio de ligação para a maioria dos agonistas e antagonistas, além de conter sítios de fosforilação para diferentes proteínas cinases e sítios de interação com proteínas G. Essa subunidade é composta por quatro repetições homólogas (I – IV) que contém, em cada uma, seis domínios transmembrana em alfa-hélice. O poro é formado pelos domínios 5 e 6 de cada repetição. Já o 4º domínio transmembrana apresenta o sensor de voltagem que é formado por resíduos de aminoácidos com cadeia lateral carregada positivamente (arginina ou lisina). A subunidade β é encontrada no meio intracelular e o sítio de interação com a α_1 está localizado entre as repetições homólogas I e II. As subunidades α_2 e δ são codificadas pelo mesmo gene, sendo a primeira uma subunidade extracelular e a segunda transmembrana, sendo unidas por pontes de dissulfeto. A subunidade γ está presente apenas em alguns tecidos, como músculo esquelético, retina e cérebro e sua função precisa ainda não é bem estabelecida (ANDERSON et al., 2000; DOLPHIN, 2006).

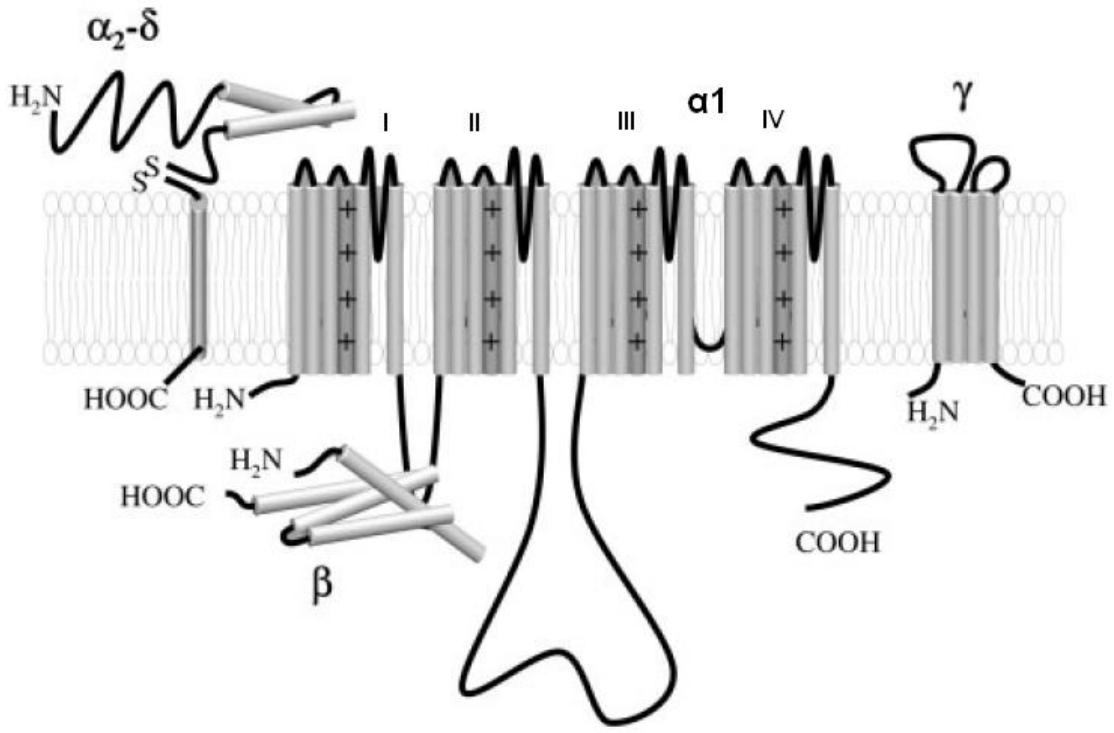

Figura 3: Representação esquemática de um canal de Ca^{2+} operado por voltagem. (+) = sensor de voltagem formado por resíduos de aminoácidos com cadeia lateral carregada positivamente. Fonte: Modificado de DOERING; ZAMPONI, 2006.

A subunidade α_1 dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem é codificada por no mínimo dez genes diferentes, cada um produzindo um tipo de canal com sequência primária de aminoácidos, função fisiológica e localização tecidual distintas (CATTERAL et al., 2005). Historicamente, vários nomes foram dados aos produtos de cada gene, gerando nomenclaturas diferentes e confusas. Por esta razão foi proposto um modelo de nomenclatura para esses canais baseado no sistema empregado para os canais de K^+. Segundo esse sistema, os canais são nomeados usando o símbolo químico do principal íon permeável (Ca) com o principal regulador fisiológico indicado em subscrito (voltagem - Ca_v) e um número correspondendo ao gene codificador da subunidade α e a sua ordem de descoberta dentro do grupo. De acordo com essa nomenclatura, os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem são divididos em três famílias (ERTEL et al., 2000):

1) A família Ca_v1, com quatro membros ($Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ e $Ca_v1.4$), são os canais tradicionalmente chamados de tipo L e são localizados em células endócrinas e musculares.

2) A família Ca_v2, com três membros: $Ca_v2.1$ (canais do tipo P/Q), $Ca_v2.2$ (canais do tipo N) e $Ca_v2.3$ (canais do tipo R). Esses canais são expressos principalmente em neurônios.

3) A família Ca_v3, com três membros ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ e $Ca_v3.3$) conhecidos classicamente como canais do tipo T e expressos em uma ampla variedade de tipos celulares.

De acordo com o tipo de corrente a ser conduzida através do canal, os Ca_v podem ser divididos em dois grandes grupos. Os Ca_v1 e Ca_v2 requerem potenciais de membrana mais positivos para sua ativação (na faixa de -30 mV), sendo essa ativação de longa duração. Devido a essas características são chamados de canais ativados por alta voltagem (HVA, do inglês *high voltage-activate*). Já os Ca_v3 necessitam de potenciais de membrana mais negativos para serem ativados (em torno de -70 mV). A condutância desse tipo de canal é baixa e de curta duração. Por essa razão são chamados de canais ativados por baixa voltagem (LVA, do inglês *low voltage-activate*) (LEHMANN-HORN; JURKAT-ROTT, 1999).

Os aspectos fisiológicos dos Ca_v têm sido amplamente estudados por meio de diversas ferramentas farmacológicas, onde as principais são os bloqueadores de canais de Ca^{2+}. Esses compostos, das mais variadas classes químicas, são eficazes no bloqueio do acoplamento excitação-contração do mesmo modo que a remoção de Ca^{2+} do meio externo (DOLPHIN, 2006). Eles foram descobertos pelo cientista alemão Albrecht Fleckenstein em 1967, que sintetizou a primeira molécula orgânica com essa propriedade: o verapamil. Desde então, vários outros compostos surgiram e passaram a ser utilizados tanto na clínica para o tratamento de doenças cardiovasculares como nos estudos in vitro sobre o papel fisiológico de canais de cálcio. (DARGIE et al., 1981).

Esses fármacos são classificados em quatro grupos: fenilalquilaminas (tais como verapamil e D600), diidropiridinas (como nifedipina e nitrendipina), benzotiazepinas (como diltiazen) e difenilalquilaminas (como lidoflazina e prenilamina) (Figura 4). Eles diferenciam entre si com relação ao sítio de ligação e a afinidade a cada subtipo de canal (WINKLER et al., 1987).

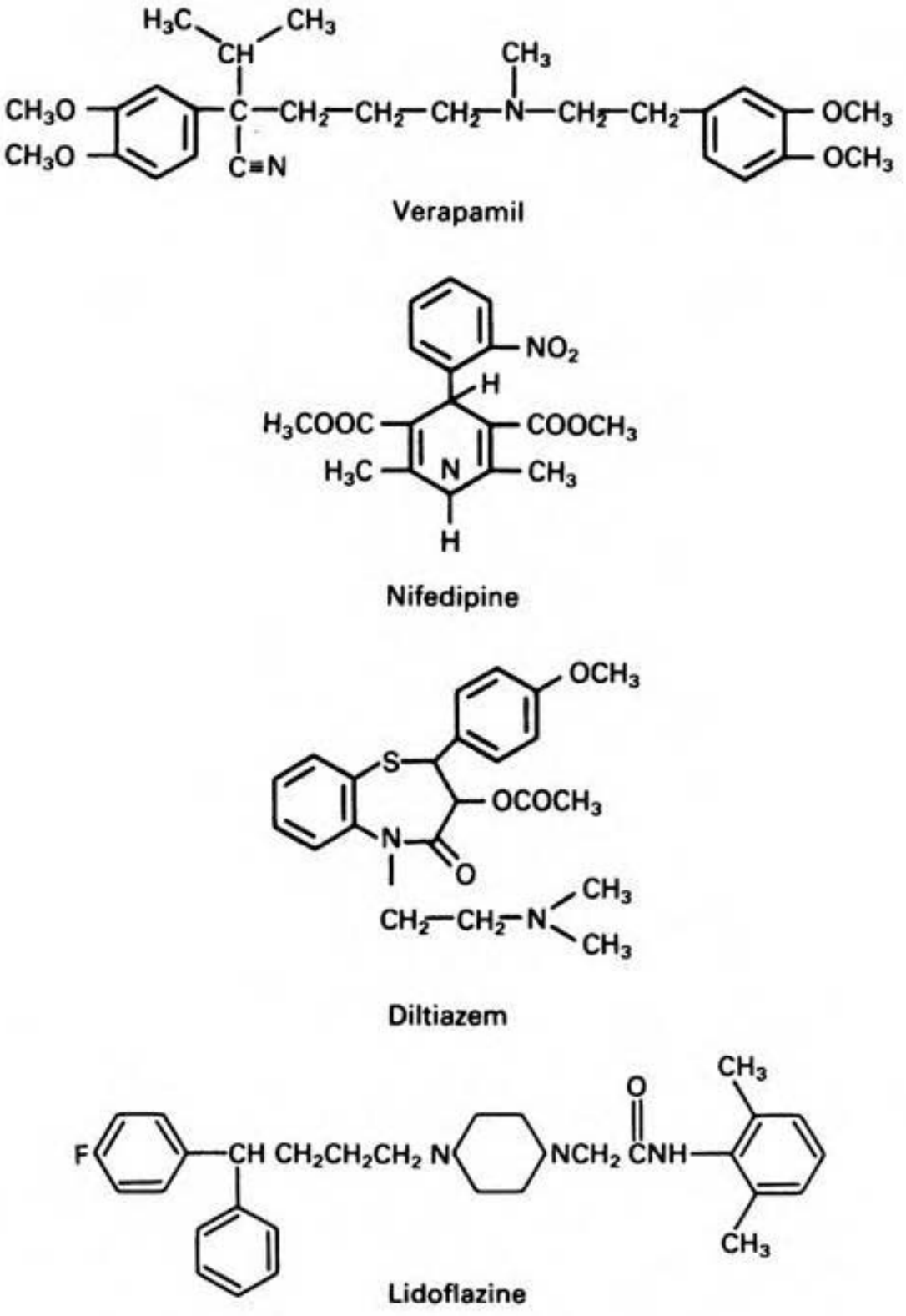

Figura 4: Fórmula estrutural dos principais bloqueadores de canais de Ca^{2+} utilizados na clínica e em estudos farmacológicos. Fonte: SINGH, 1986.

As diidropiridinas são os bloqueadores mais seletivos e potentes dos Ca_v1, não exercendo efeito significativo sobre os demais canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem (WELLING et al., 1993). Seu sítio de ligação é localizado do 6º domínio transmembrana da 3ª e 4ª região homóloga do canal e no 5º domínio transmembrana da 3ª repetição homóloga (Figura 3) (STRIESSNIG et al., 1991; HE et al., 1997). Por outro lado, as fenilalquilaminas e benzotiazepinas são bloqueadores inespecíficos dos Ca_v, sendo o sítio de ligação dos primeiros no 6º domínio transmembrana da 3ª e 4ª repetição homóloga e o segundo ligando-se apenas ao 6º domínio transmembrana da 4ª repetição (Figura 3) (DOBREV et al.; 1999; FREEZE et al., 2006; SCHUSTER et al., 1996; HOCKERMAN, et al., 1997; HERING, et al., 1996).

Apesar da alta especificidade com esses canais, alguns antagonistas de Ca_v podem também interagir com outros alvos farmacológicos. Em 1981, Tsuro e colaboradores, relataram que o verapamil foi eficaz na reversão da resistência ao quimioterápico vincristina em modelos *in vitro* e *in vivo* e que esse efeito foi devido à inibição do influxo do quimioterápico (TSURO et a., 1981). A partir desse trabalho, a eficácia de bloqueadores de canais de Ca^{2+} na reversão do fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR) passou também a ser alvo de vários estudos. O fenótipo MDR é um dos maiores responsáveis pela falência terapêutica no tratamento do câncer e está associado com a atividade de proteínas da superfamília ABC (do inglês *ATP binding cassete*) (JAEGER, 2009). Essas proteínas têm sido identificadas em uma grande variedade de organismos, e medeiam o transporte de vários compostos, tais como: hormônios, lipídios, peptídios, metais pesados, xenobióticos e até mesmo íons (LOO; CLARKE, 2008).

Trabalhos mais recentes identificaram outros bloqueadores de canais de Ca^{2+}, pertencentes à classe das diidropiridinas (barnidipina, benidipina, efonidipina, manidipina, nicardipina, nifedipina e nivaldipina) e benzotiazepinas (diltiazem), como inibidores do transporte mediado pela proteína ABCB1 (TAKARA et al., 2002; KOMOTO et al., 2007). Portanto, as investigações clínicas, fisiológicas e farmacológicas envolvendo esses bloqueadores devem levar em consideração também a atividade sobre essas proteínas para, dessa forma, obter uma maior confiabilidade dos seus resultados.

1.3 Papel biológico do Ca^{2+} na fertilização e desenvolvimento embrionário

A evidência de que os íons são essenciais para a formação de novos organismos estende-se desde o trabalho pioneiro do cientista alemão Jacques Loeb em 1913, que estudou a influência de íons inorgânicos na ativação de óvulos de ouriços-do-mar. Loeb chegou a afirmar que a contribuição mais relevante do espermatozóide para o processo de fertilização era o aporte iônico (LOEB, 1913).

A primeira demonstração do aumento intracelular de Ca^{2+} em resposta a diversos estímulos foi realizada pelo cientista americano Daniel Mazia em células vegetais e em óvulos do ouriço-do-mar *Arbacia punctulata* (MAZIA; CLARK, 1936; MAZIA, 1937). Em 1974, Richard Steinhardt e David Epel demonstraram que o tratamento de óvulos de duas espécies de ouriços-do-mar com o ionóforo de Ca^{2+} A23187 provocou a ativação dos mesmos, induzindo várias características comuns a óvulos fertilizados, tais como: elevação da membrana de fertilização (a principal feição morfológica de um óvulo fertilizado), mudança na condutância de alguns íons pela membrana, aumento do consumo de O_2, e síntese protéica e de DNA (STEINHARDT; EPEL, 1974). Um ano mais tarde, Robert Zucker e Steinhardt observaram que a microinjeção de quelantes de Ca^{2+} (EDTA ou EGTA) bloqueava a elevação da membrana de fertilização, uma característica morfológica marcante de um óvulo fertilizado, em ouriços-do-mar da espécie *Lytechinus pictus* (ZUCKER; STEINHARDT, 1974). Uma demonstração direta do envolvimento do Ca^{2+} nesse processo foi feita em 1978 por John Gilkey e colaboradores em óvulos de peixe medaka (*Oryzias latipes*) utilizando a fotoproteína Aequorina que é sensível a variação na concentração de Ca^{2+}. Empregando essa metodologia, os autores visualizaram um grande aumento da $[Ca^{2+}]_c$ que se inicia no ponto de entrada do espermatozóide e, a partir desse, atravessa lentamente o óvulo até a sua outra extremidade (Figura 5). Esse fenômeno ficou conhecido como onda de Ca^{2+} e é através dela que todos os eventos subseqüentes a ativação são induzidos (GILKEY et al., 1978).

Em alguns animais, a primeira ação do Ca^{2+} após a entrada do espermatozóide é alterar o potencial de membrana, causando uma despolarização por meio da abertura dos Ca_v, impedindo, desta forma, a fusão de outro espermatozóide ao gameta feminino, uma vez que a interação entre os gametas só

é possível se o potencial de membrana do óvulo estiver em torno de -70 mV. Esse processo é chamado de bloqueio rápido da polispermia e também é dependente de íons Na^+, visto que alguns autores também identificaram uma participação do influxo de Na^+ nesse mecanismo (DAVID et al., 1988; JAFFE, 1976).

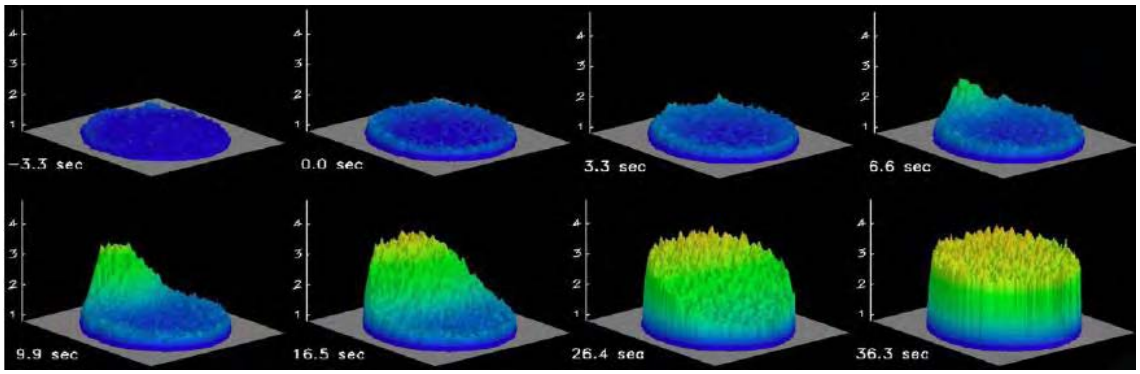

Figura 5: Representação gráfica da onda de Ca^{2+} em óvulos fertilizados de *Lytechinus pictus*. A onda de Ca^{2+} se inicia no ponto de entrada do espermatozóide e atravessa todo o óvulo em aproximadamente 20 segundos. As concentrações de Ca^{2+} foram visualizadas usando o indicador fluorescente Cálcio Green Dextran e microscopia confocal. Os níveis de Ca^{2+} são representados pelas cores e alturas das barras. Fonte: WHITAKER, 2006.

O bloqueio rápido da poliespermina é apenas transitório, pois o potencial de repouso é rapidamente restituído. Por essa razão é necessário uma prevenção mais efetiva para a polispermia, que é realizada pela exocitose dos grânulos presentes no córtex do óvulo (grânulos corticais). A fusão das membranas dos grânulos corticais com a membrana plasmática do gameta feminino, e a consequente liberação de seus conteúdos (hialina, proteases, peroxidases, e mucopolissacarídeos) promove a elevação do envelope de fertilização, uma camada glicoprotéica que funciona como uma barreira física, impedindo definitivamente a fusão de novos espermatozóides ao gameta feminino, e que também protege o embrião de danos mecânicos inerente ao ambiente. Além disto, o envelope de fertilização confere a própria unidade ao embrião, ao confinar as células embrionárias em um único espaço. A exocitose dos grânulos corticais e a liberação do conteúdo dos grânulos são processos dependentes de Ca^{2+}, como demonstrado no trabalho supracitado de Zucker e

Steinhardt em 1978 (GILLOT et al., 1990; MIYAKE; MCNEIL, 1998; ZUCKER; STEINHARDT, 1978).

Uma conseqüência negativa da exocitose dos grânulos corticais é a adição maciça de membranas vesiculares à membrana plasmática. Por esta razão, esse processo é seguido por uma restituição da superfície do embrião recém formado através do mecanismo de endocitose, que compensa o excesso de membrana adicionada ao zigoto. Steven Vogel e colaboradores mostraram que esse mecanismo está presente em embriões de duas espécies de ouriços-do-mar e é dependente do influxo Ca^{2+} pelos $Ca_v2.1$, uma vez que inibidores específicos para este canal impediram a endocitose (VOGEL et al., 1999).

O Ca^{2+} também é importante para a migração e fusão dos pró-núcleos, como demonstrado pelo trabalho de Isabelle Gillot e colaboradores (1998). Utilizando um corante fluorescente e microscopia confocal, os autores observaram um aumento da $[Ca^{2+}]_c$ correspondente ao início da migração dos pró-núcleos e após poucos segundos visualizaram um segundo pico da $[Ca^{2+}]_c$ na região da fusão dos mesmos. A microinjeção do BAPTA, um conhecido quelante de Ca^{2+}, bloqueou as elevações nos níveis de fluorescência intracelular, bem como a migração e fusão dos pró-núcleos dos gametas (GILLOT et al., 1998).

Apesar de promover todos esses eventos iniciais para o desenvolvimento embrionário, um dos maiores papeis da onda de Ca^{2+} é a ativação do metabolismo quiescente do óvulo e a preparação para as divisões celulares subseqüentes (WHITAKER, 2008). O Ca^{2+} citosólico livre junto com o DAG, produzido pela atividade da PLC (Figura 2), induzem a ativação da proteína cinase C (PKC) que, por sua vez, é responsável pela adição de grupos fosfato em resíduos de aminoácidos específicos de proteínas alvo. Um dos alvos ativados pela PKC é o trocador Na^+/H^+ que exerce um transporte ativo secundário acoplando o influxo de Na^+ com o efluxo de H^+ e dessa forma promovendo a alcalinização do citoplasma do zigoto (FRIIS; JOHANSEN, 1996). Nessas condições, a síntese protéica é estimulada originando proteínas importantes para a progressão do ciclo celular, como é o caso das ciclinas (GRAINGER et al., 1979).

O desenvolvimento embrionário tardio também é regulado pela onda de Ca^{2+}. Eventos como estabelecimento dos eixos corporais, migrações celulares, indução neural, adesão celular e especificação do destino de algumas células, são todos dependentes do aumento da $[Ca^{2+}]_c$ no início da formação do zigoto, e enfatizam a

importância desse íon para a fertilização e desenvolvimento embrionário de diversos organismos (WHITAKER; SMITH, 2008).

1.4 Ouriços-do-mar como modelo experimental

Ouriços-do-mar são animais pertencentes ao filo Echinodermata, e representam um dos grupos mais amplamente encontrado nas faixas litorâneas do planeta. Esse filo reúne em cerca de 7.000 espécies viventes e seus principais representantes são estrelas-do-mar, serpentes-do-mar, bolachas-da-praia, lírios-do-mar, pepinos-do-mar e ouriços-do-mar. São animais exclusivamente marinhos e a maioria é bentônica. São caracterizados por apresentar um endoesqueleto composto de ossículos calcários, um exoesqueleto que possui projeções externas na forma de espinhos, celoma bem desenvolvido, e simetria radial pentâmera nos animais adultos (SMITH et al., 1993; WADA; SATOH, 1994).

A classe Echinoidea, a qual agrupa ouriços-do-mar e bolachas-da-praia, compreende cerca de 900 espécies, sendo 105 presentes no litoral brasileiro. Ouriços-do-mar são equinóides regulares, pois seu corpo tem formato arredondado. As principais características dessa classe é a presença de uma carapaça rígida coberta de espinhos e um aparelho complexo utilizado na alimentação, chamado de lanterna de Aristóteles (CARNEIRO; CERQUEIRA, 2008).

Echinometra lucunter (Linnaeus, 1758) é uma espécie de ouriço-do-mar tropical, encontrada em altas temperaturas na costa brasileira, vivendo em fendas feitas em rochas, com intenso potencial bioerosivo. São animais conhecidos pela culinária de suas gônodas e artesanato de sua carapaça e espinhos (MARIANTE et al., 2009). Podem ser encontrados em águas costeiras acima de 45 metros de profundidade e sua distribuição geográfica estende-se desde a Carolina do Norte (EUA) até Santa Catarina (Brasil), também sendo registrada na costa oeste africana (LIMA et al., 2009).

Apesar de sua grande distribuição e importância ecológica e econômica, poucos estudos científicos foram realizados com essa espécie (DE FARIA; DA SILVA, 2008). Um levantamento de artigos indexados no banco de dados do *National Institutes of Health* (*National Institutes of Health*, 2010) indica, até dezembro

de 2010, a publicação de 7.164 artigos indexados com o termo "*Sea urchin"* (Ouriços-do-mar em inglês) e somente 13 artigos indexados com o termo *Echinometra lucunter*. Esse valor mostra que apenas 0,18% das pesquisas envolvendo ouriços-do-mar foram realizadas com essa espécie. Essa produção científica é muito baixa em relação a outras espécies mais estudadas como S*trongylocentrotus purpuratus* (1.056 trabalhos), *Paracentrotus lividus* (502 trabalhos), *Arbacia punctulata* (286 trabalhos) e *Lytechinus variegatus* (252 trabalhos).

Os Ouriços-do-mar vêm sendo utilizados como modelo experimental em estudos científicos de diversas áreas devido à diversas características. Os animais adultos possuem uma ampla distribuição geográfica e são de fácil coleta e simples manutenção em laboratório. A obtenção dos gametas é realizada de forma não invasiva e milhões de gametas maduros são obtidos a partir de um único indivíduo. A fertilização *in vitro* ocorre com alta eficiência e o desenvolvimento embrionário é rápido e sincrônico. Os embriões são cultivados em água do mar, não necessitando de condições estéreis (MONTENEGRO et al., 2004; SEMENOVA et al., 2006). Além disso, fatos como o ciclo celular embrionário apresentando várias similaridades com o de células humanas e a existência de vários processos dependentes de Ca^{2+} durante a embriogênese fazem desses animais um ótimo modelo para prospecção de compostos com atividade antimitótica e também de compostos que interferem na homeostase celular do Ca^{2+} (MILITÃO et al., 2007; SCHAFER et al., 2009).

Trabalhos utilizando ouriços-do-mar como modelo biológico datam desde 1847. Entretanto nessa época os animais eram vistos como impróprios e inadequados para o estudo científico (BRIGGS; WESSEL, 2006). Apenas em 1876 com o trabalho do alemão Oscar Hertwig, esse modelo experimental ganhou um grande destaque na literatura científica e passou a ser amplamente utilizado nas mais diversas áreas de pesquisas, tais como: biologia celular e molecular, bioquímica, genética, evolução e biologia do desenvolvimento (MONROY, 1986; ERNST, 1997). Hertwig mostrou que o evento chave do processo de fertilização é a fusão dos pró-núcleos do espermatozóide e do óvulo. Essa descoberta foi um grande marco na história do desenvolvimento embrionário e foi o primeiro passo no entendimento do papel dos dois progenitores na formação de um novo organismo (HERTWIG, 1876 *apud* MONROY, 1986).

Grande parte dos nossos conhecimentos atuais sobre a fertilização e a formação de organismos multicelulares foram adquiridos a partir de estudos desenvolvidos em ouriços-do-mar. A origem materna das mitocôndrias (MEVES, 1912 *apud* MONROY, 1986), a reação acrossômica (DAN, 1952) e a descoberta das ciclinas como principal regulador do ciclo celular embrionário (EVANS et al., 1983) foram conhecimentos originados em estudos utilizando esses animais como modelo experimental.

Além disso, a ideia da participação do Ca^{2+} como mensageiro intracelular para os processos de fertilização e desenvolvimento embrionário também foi originada a partir de pesquisas científicas com ouriços-do-mar graças aos trabalhos pioneiros supracitados (LOEB, 1913; MAZIA, 1937; STEINHARDT; EPEL, 1974). Ao longo dos anos, vários outros autores, também utilizando esse modelo biológico, contribuíram bastante para o avanço dessa área do conhecimento (MIYAZAKI, 2006).

1.5 Aspectos morfológicos e moleculares da fertilização e desenvolvimento embrionário de Ouriços-do-mar

O processo de fertilização, em ouriços-do-mar, inicia-se com o contato entre o espermatozóide e a camada gelatinosa do óvulo, um envoltório constituído por mucopolissacarídeos e diversos tipos de proteínas que tem como função a atração e a ativação dos espermatozóides. Esse contato causa a fusão da vesícula acrossômica com a membrana plasmática do gameta masculino, em um processo de exocitose conhecido como reação acrossômica. Esse mecanismo promove a liberação de enzimas proteolíticas que irão degradar os envoltórios externos do óvulo, facilitando a ligação e fusão dos gametas (COLWIN; COLWIN, 1963). Um segundo componente da reação acrossômica é a extensão do processo acrossômico por meio da polimerização de moléculas globulares de actina, criando uma evaginação na membrana posterior do acrossomo que se projeta em direção à membrana do óvulo (TILNEY et al., 1978). É por meio do processo acrossômico que as bindinas, lectinas responsáveis pelo reconhecimento espécie-específico, são postas em contato com seus receptores na membrana do óvulo, garantindo dessa forma, a ligação e fusão apenas de gametas da mesma espécie (GLABE;

LENNARZ, 1979). Os dois componentes da reação acrossômica são dependentes do Ca^{2+} extracelular, uma vez que bloqueadores de Ca_v inibem eficientemente esse mecanismo (KAZAZOGLOU et al., 1985).

Após a ligação entre os gametas é iniciada uma cascata de eventos no citoplasma do gameta feminino, coletivamente chamados de ativação do óvulo (Tabela 1). Um dos primeiros sinais desse mecanismo é o bloqueio rápido da poliespermia, que corresponde à mudança do potencial de repouso da membrana (-70 mV) para valores mais positivos (aproximadamente +20 mV), dependente de Ca^{2+} e Na^{+} (DAVID et al., 1988; MCCULLOH; CHAMBERS, 1999). Logo em seguida ocorre a fusão da membrana grânulos corticais com a membrana plasmática que consiste no bloqueio lento da poliespermia e promove a elevação do envelope de fertilização, (GLABE; VACQUIER, 1978). Esse processo é induzido pela onda de aumento na $[Ca^{2+}]_c$ conforme mencionado nas seções anteriores (GILLOT et al., 1990; MIYAKE; MCNEIL, 1998; ZUCKER; STEINHARDT, 1978).

Posteriormente, ocorre uma série de alterações metabólicas no gameta feminino em decorrência da ativação de diversas enzimas dependentes de Ca^{2+}. Um exemplo é a NAD^{+} cinase, que converte o NAD^{+} em $NADP^{+}$, uma importante coenzima envolvida na biossíntese de lipídios, os quais são importantes para a formação de novas membranas durante o período de divisão celular (EPEL et al., 1981). Um aumento do consumo de O_2 e alcalinização do pH intracelular também são processos dependentes de Ca^{2+} e contribuem para o início da síntese protéica e de DNA (FRIIS; JOHANSEN, 1996; GRAINGER et al., 1979). Durante um período de 5 a 10 minutos após a fertilização ocorre uma intensa síntese de proteínas, utilizando mRNA já presente do citoplasma do óvulo, uma vez que não há transcrição de DNA nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário (GOTOH et al., 2007).

Após a fertilização, o desenvolvimento de um organismo multicelular passa por um processo chamado de clivagem, uma série de divisões mitóticas por onde o volume do óvulo é dividido em numerosas e pequenas células chamadas de blastômeros. O ciclo celular dos blastômeros é constituído apenas de duas fases: a fase S (do inglês *Synthesis)*, onde ocorre a duplicação de DNA, e fase M (do inglês *Mitosis)*, que é o período de divisão mitótica. Em consequência disso, as divisões celulares dos blastômeros são rápidas e sincrônicas (GERHART et al., 1984).

Tabela 1: Eventos iniciais e tardios da fertilização e do desenvolvimento embrionário de Ouriços-do-mar. Fonte: GILBERT; SINAUER; 2000.

Eventos	Tempo Aproximado
EVENTOS INICIAIS DA FERTILIZAÇÃO	
Ligação entre os gametas	0 segundo
Bloqueio rápido da polispemia	1 segundo
Fusão da membrana dos gametas	6 segundos
Bloqueio lento da poliespermia	15-60 segundos
EVENTOS TARDIOS DA FERTILIZAÇÃO	
Ativação da NAD^+ cinase	1 minuto
Elevação dos níveis de NADH e NADPH	1 minuto
Aumento do consumo de O_2	1 minuto
Entrada do espermatozóide	1-2 minutos
Aumento do pH intracelular (pH_i)	1-5 minutos
Ativação da síntese protéica	5-10 minutos
Início da síntese de DNA	20-40 minutos
EVENTOS INICIAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	
Primeira Clivagem	85-90 minutos
Segunda Clivagem	115-120 minutos
Estágio de Mórula	200-240 minutos
EVENTOS TARDIOS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	
Blástula inicial	10 horas
Blástula tardia	14 horas
Gástrula inicial	18 horas
Gástrula tardia	20 horas
Estágio de Prisma	22 horas
Larva plúteos	36 horas

Em ouriços-do-mar, as primeiras clivagens são holoblásticas, onde o sulco de clivagem estende-se por todo o óvulo. Esse tipo de divisão forma sempre blastômeros de tamanhos iguais. A primeira clivagem forma o embrião de duas células e é uma divisão meridional ou longitudinal. A segunda clivagem também é meridional, porém o eixo de divisão é perpendicular em relação ao eixo da primeira clivagem. A terceira divisão forma o embrião de oito células e é transversal ou equatorial, dividindo o embrião em dois pólos: o vegetal (rico em vitelo) e o animal (pobre em vitelo). A quarta clivagem corresponde ao início do estágio de mórula, o qual compreende também a quinta e a sexta divisão celular. Nessa fase, os blastômeros passam a ter tamanhos diferentes e, de acordo com seu tamanho, são chamados de macrômeros, mesômeros e micrômeros (SUMMERS et al., 1993 *apud* STEPHENS, 2004).

A sétima clivagem marca o início do estágio de blástula. Nessa fase, o embrião consiste em uma única camada de células periféricas circundando uma cavidade central, a blastocele. Após a décima clivagem os blastômeros perdem a sincronia das divisões, com a inserção das fases G1 e G2 no ciclo celular, e passam a expressar os genes do próprio embrião com a retomada do processo de transcrição de DNA. As células da superfície desenvolvem cílios e a membrana de fertilização é rompida, tornando o embrião livre-natante (DAN-SOHKAWA; FUJISAWA, 1980; KADOKAWA et al., 1986).

O estágio de gástrula tem início quando as células do pólo vegetal migram em direção a blastocele, gerando uma invaginação e formando uma depressão chamada de blastóporo. De acordo com o destino do blastóporo os representantes do reino animal podem ser divididos em dois grandes grupos: os protostômios, nos quais o blastóporo origina a boca, e os deuterostômios, animais onde o blastóporo origina o ânus. No estágio de gástrula também são formados os três folhetos germinativos: o ectoderma, a mesoderma e a endoderma, os quais darão origem aos diferentes tecidos e órgãos da futura larva (WILT, 1987; STRICKER, 1999).

A larva de ouriços-do-mar, chamada de larva plúteos, é móvel e alimenta-se do plâncton marinho. Ela se desenvolve por volta de 24 a 72 horas após a fertilização, dependendo de cada espécie. O período larval dura de quatro a seis semanas e no final dele ocorre a metamorfose, transformando a larva em um animal adulto de tamanho reduzido (HINEGARDNER, 1969).

1.6 Influxo e mobilização de Ca^{2+} em protostômios e deuterostômios

Em 1983, o cientista americano Lionel Jaffe, propôs uma hipótese correlacionando a mobilização/influxo de Ca^{2+} com o destino do blastóporo durante o desenvolvimento embrionário. Essa hipótese vem sendo extensivamente estudada ao longo dos anos e foi fundamentada, principalmente, nos estudos de Steinhardt e Epel, que mostraram que o ionóforo de Ca^{2+} A23187 induziu a ativação de óvulos de duas espécies de ouriços-do-mar mesmo em um meio isento de Ca^{2+} extracelular, e nos resultados de Gilkey, que também observou a propagação da onda de Ca^{2+} na total ausência extracelular desse íon (STEINHARDT; EPEL, 1974; GILKEY et al., 1978).

Baseado nesses dados e em mais de 70 anos de observações morfológicas descritas na literatura, Jaffe propôs que em protostômios (animais onde a boca é originada do blastóporo embrionário), o aumento da $[Ca^{2+}]_c$ é provocado pelo influxo do íon a partir dos canais sensíveis à voltagem presentes na membrana plasmática. Já em deuterostômios (animais onde o ânus é derivado do blastóporo embrionário) o aumento da $[Ca^{2+}]_c$ é causado por uma mobilização intracelular do íon a partir de estoques como o retículo endoplasmático, sendo o influxo dispensável para a formação da onda de Ca^{2+} (JAFFE, 1983).

Anos depois, a proposta do Jaffe foi reforçada por alguns estudos em protostômios, como o poliqueto marinho *Chaetopterus pergamentace* (ECKBERG et al., 1993) e o equiúro *Urechis caupo* (STEPHANO; GOULD, 1997) e também em deuterostômios, como ouriços-do-mar (CRÉTON; JAFFE, 1995) e hamster (MIYAZAKI et al., 1993).

Entretanto, relatos recentes mostraram exceções a essa hipótese. Estudos utilizando o molusco bivalve *Mytilus edulis* (DEGUCHI et al., 1996), o crustáceo *Sicyonia ingentis* (LINDSAY; CLARK, 1994), e o nemertino *Cerebratulus lacteus* (STRICKER, 1996), onde todos esses animais protostômios, identificaram mecanismos de liberação de Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático. Do mesmo modo, pesquisas em ascídia *Phallusia mammillata* (GOUDEAU; GOUDEAU, 1993), um animal deuterostômio, demonstraram uma grande dependência do influxo de Ca^{2+} pelos canais sensíveis à voltagem para a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial.

Em 1999, o americano Stephen Stricker realizou um estudo sobre as características da onda de Ca^{2+} de diversos organismos. O autor identificou exceções à proposta do Jaffe em praticamente todos os grupos analisados, desde cnidários a urocordados, passando por moluscos, anelídios e artrópodes. No entanto, em seu relato não foi encontrada nenhuma exceção à hipótese proposta por Jaffe no grupo dos equinóides (STRICKER, 1999).

Tendo em vista o reduzido número de estudos científicos sobre a espécie *Echinometra lucunter,* e a importância desse organismo devido à sua ampla distribuição geográfica na costa brasileira, tornam-se atraentes os estudos sobre a fisiologia do desenvolvimento embrionário da referida espécie. O presente trabalho pretendeu, assim, investigar o papel do Ca^{2+} extracelular na embriogênese de ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter*, utilizando para tanto, técnicas e ferramentas farmacológicas. O conhecimento acerca do fluxo de Ca^{2+} na espécie supracitada pode permitir o estabelecimento de um modelo biológico alternativo para a prospecção de produtos naturais ou sintéticos bioativos que interfiram na fisiologia celular do Ca^{2+}.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o envolvimento do Ca^{2+} extracelular na fertilização e no desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter*.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o envolvimento do Ca^{2+} extracelular na fertilização de *E. lucunter*.
- Avaliar a ação de bloqueadores de Ca_v na fertilização de *E. lucunter*.
- Investigar o efeito de quelantes de Ca^{2+} no desenvolvimento embrionário inicial de *E. lucunter*.
- Avaliar a ação de bloqueadores de Ca_v no desenvolvimento embrionário inicial de *E. lucunter*.
- Caracterizar a dependência temporal do influxo de Ca^{2+} no desenvolvimento embrionário inicial de *E. lucunter*.
- Investigar a capacidade do Ca^{2+} armazenado nos estoques intracelulares de óvulos de *E. lucunter* em promover a ativação dos mesmos.
- Comparar as características morfológicas entre óvulos fertilizados de duas espécies de ouriços-do-mar.
- Avaliar o efeito da Rotundifolona no desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Os Ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* foram coletados na Praia do Cabo Branco, localizada na cidade de João Pessoa, Paraíba – Brasil (7º 07’ S, 34º 49’ W). As coletas foram realizadas em períodos de maré baixa, variando entre 0,1 m e 0,5 m. Os animais eram retirados de seu habitat com o auxílio de facas e garfos, uma vez que são comumente encontrados em locas feitas em rochas nas regiões entre-marés (Figura 6). As coletas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob o número 11545-3 (Anexo). A submissão do presente projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa não foi necessária, uma vez que a LEI Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do §1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, aplica-se somente aos animais das espécies classificadas como filo Chordata, subfilo Vertebrata (§3º, art. 2).

Figura 6: Ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* em seu habitat. Fonte: Jocelmo Leite.

Após a coleta, os animais foram transportados até o laboratório em um recipiente plástico contendo água do mar coletada no local. No laboratório, os ouriços-do-mar foram lavados com FSW (do inglês *Filtered Sea Water)* para retirada de fezes, microorganismos e parasitas aderidos à sua superfície e em seguida dispostos em um aquário (81 cm de comprimento, 41 cm de largura e 42 cm de altura) contendo FSW sob constante aeração. Inicialmente, o nível de água do aquário era mantido até a metade da altura da carapaça dos animais, para prevenir a liberação repentina de gametas, e após 2 horas o nível era ajustado para 3,7 L/ espécime.

Toda a água utilizada no laboratório foi coletada na Praia do Seixas na cidade de João Pessoa, Paraíba – Brasil (7º 09’ S, 34º 47’ W) e filtrada no próprio laboratório com uma rede de malha de 50 µm. A água apresentava salinidade de 3,5%, pH 8,0 e temperatura em torno dos 25ºC.

3.1.2 Substâncias utilizadas

As seguintes substâncias foram utilizadas:

O ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA); o ácido etilenoglicol-bis-(β-aminoetiléter) N, N, N’, N’-tetraacético (EGTA); o verapamil (VP); a nifedipina (NF); o diltiazem (DT); a calceína-AM (C-AM); a reversina 205 (REV); o 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético tetra-(acetoximetil) ester (BAPTA-AM); a valinomicina (VL); a nigericina (NG); a trifluoperazina (TFP); e a ionomicina (IONO) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

A clorpromazina (CPZ) e a ouabaína (OUA) foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e foram gentilmente cedidas, respectivamente, pelo Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Junior, do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba e pela Profª Drª. Sandra Rodrigues Mascarenhas, do Departamento de Fisiologia e Patologia da mesma universidade.

A rotundifolona (ROT), um produto de origem natural obtido do vegetal *Mentha x villosa* (ALMEIDA et al., 1996), foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba.

3.1.3 Soluções estoques

A C-AM, a REV, o BAPTA-AM, a VL, a NG e a IONO foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração final do DMSO foi mantida abaixo de 1% v/v. A NF foi dissolvida em Etanol absoluto na concentração final de 0,8% v/v. A ROT foi dissolvida em cremofor® e a concentração final do veículo foi de 1,5%. O EDTA e o EGTA foram dissolvidos diretamente em FSW e os demais compostos foram dissolvidos em água destilada. Os veículos acima descritos, nas concentrações utilizadas para dissolução dos fármacos, não apresentaram efeito sobre o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*.

O VP, a NF, o DT, a TFP, a CPZ, a OUA e a IONO foram mantidos a 4ºC. O EDTA e EGTA foram armazenados em temperatura ambiente e os demais fármacos foram conservados à - 20ºC.

3.1.4 Água do mar artificial

A água do mar artificial (ASW, do inglês *Artificial Sea Water*) era composta pelos seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), cloreto de magnésio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$). Essa solução (pH 8,0) foi preparada de acordo com Vogel e colaboradores (1999) e a sua composição é descrita na tabela 2.

Adicionalmente foi preparada uma água do mar artificial nominalmente isenta de íons Ca^{2+} (ASW Ca^{2+} *free*) para a utilização em alguns ensaios. Essa solução (pH 8,0) foi composta dos mesmos sais da ASW, com exceção do $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, e também foi preparada de acordo com Vogel e colaboradores (1999). A composição da ASW Ca^{2+} *free* está descrita na tabela 3.

Todos os sais foram obtidos da VETEC Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil).

Tabela 2: Composição da ASW. * Valores equivalentes para a dissolução em 1 L de água destilada (VOGEL et al., 1999).

Substância	Concentração (mM)	Peso (g)*
NaCl	425,0	24,72
KCl	9,0	0,67
$CaCl_2 . 2H_2O$	9,3	1,36
$MgCl_2 . 6H_2O$	19,9	4,05
$MgSO_4 . 7H_2O$	25,5	6,29
$NaHCO_3$	2,1	0,18

Tabela 3: Composição da ASW Ca^{2+} *free*. * Valores equivalentes para a dissolução em 1 L de água destilada (VOGEL et al., 1999).

Substância	Concentração (mM)	Peso (g)*
NaCl	436,8	25,53
KCl	9,0	0,67
$MgCl_2 . 6H_2O$	22,9	4,66
$MgSO_4 . 7H_2O$	25,5	6,29
$NaHCO_3$	2,1	0,18

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Identificação do sexo dos animais

Os animais foram aleatoriamente retirados do aquário, lavados com FSW, e estimulados eletricamente com uma corrente alternada de 12 V, promovendo uma pequena e controlada liberação de gametas, o que nos permitia identificar e separar os animais de sexos diferentes, uma vez que não há distinções morfológicas entre machos e fêmeas.

Os eletrodos foram dispostos na carapaça do animal durante alguns minutos. A identificação do sexo era feita de acordo com a coloração dos gametas expelidos, sendo os machos aqueles que liberavam uma secreção branca e as fêmeas as que expeliam uma secreção alaranjada (Figura 7).

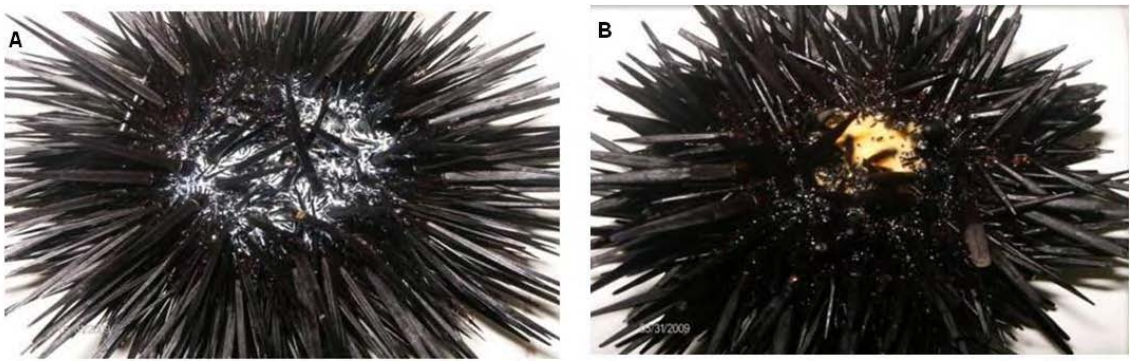

Figura 7: Identificação do sexo dos animais: Os machos liberavam uma secreção branca (A) enquanto que a secreção expelida pelas fêmeas era em tons alaranjados (B). Fonte: Jocelmo Leite.

3.2.2 Obtenção dos gametas

Após a identificação do sexo, os animais foram lavados com FSW para garantir que nenhuma impureza presente em sua superfície entre em contato com os gametas. Em seguida era injetado 3 mL de KCl (0,5 M) na região peritoneal de cada espécime, com o propósito de induzir uma acentuada contração dos músculos que revestem as gônadas e a consequente liberação dos gametas (Figura 8). O tempo máximo de coleta dos óvulos ou espermatozóides foi de 10 minutos de forma a evitar a liberação de gametas imaturos.

Os espermatozóides foram coletados a seco, com o auxílio de uma pipeta paster de vidro, e imediatamente armazenados em tubos de microcentrífuga e refrigerados a 4ºC até o momento da fertilização. Nessas condições, os gametas masculinos permaneciam viáveis durante aproximadamente 10 dias (Figura 9).

Figura 8: Obtenção dos gametas por meio da injeção de KCl (0,5 M) na cavidade peritoneal de um ouriço-do-mar. Fonte: Jocelmo Leite.

Figura 9: Coleta dos gametas masculinos. Os espermatozóides obtidos foram armazenados em tubos de microcentrífuga e refrigerados a 4ºC. Fonte: Jocelmo Leite.

Para a coleta dos óvulos, as fêmeas foram colocadas em béqueres de volume apropriado ao seu tamanho, de forma que os gonóporos ficassem em contato direto com a FSW promovendo, assim, a precipitação dos gametas (Figura 10). Após a coleta, os óvulos foram transferidos para uma proveta de 500 mL onde foram realizados dois processos de lavagem em FSW com o propósito de retirar a camada gelatinosa que envolve o gameta feminino e, dessa forma, garantir uma fertilização uniforme. Após a última lavagem, os óvulos foram ressuspendidos em 50 mL de ASW e a concentração celular ajustada para 1 x 10^4 óvulos / mL com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

Figura 10: Coleta dos gametas femininos. A fêmea foi invertida em béquer a fim de manter os gonóporos em contato com a FSW. Fonte: Jocelmo Leite.

3.2.3 Fertilização *in vitro*

A fertilização foi induzida pela adição de uma suspensão de espermatozóides (1 parte de esperma seco em 49 partes de ASW) em uma suspensão de óvulos (1 x 10^4 óvulos / mL) numa razão de 1:100, sob leve agitação e em temperatura ambiente. A fertilização foi confirmada após 15 minutos pela elevação do envelepe de fertilização, evidenciado em microscopia óptica comum. Em seguida, os embriões foram transferidos para uma placa de cultura de 24 poços, com volume final de 2 mL por poço, e foram mantidos sob temperatura de 26º $\pm$ 2 ºC até o final do ensaio.

3.4.4 Ensaios farmacológicos

3.4.4.1 Efeito do Ca^{2+} extracelular na fertilização de *Echinometra lucunter*

Para investigar o papel do Ca^{2+} extracelular na fertilização de *E. lucunter*, foi preparada uma água do mar isenta de íons Ca^{2+} (ASW Ca^{2+} *free*), de acordo com os valores apresentados na tabela 3.

Nesse ensaio, a fêmea depositou seus óvulos em béqueres contendo ASW Ca^{2+} *free* durante os primeiros 5 minutos. Em seguida, o mesmo animal foi posto em outro béquer contendo ASW, que foi utilizado como controle, onde permaneceu por mais 5 minutos. Após a coleta, os óvulos de cada béquer foram lavados, por decantação, duas vezes em suas respectivas soluções. Posteriormente, foram preparadas duas suspensões de espermatozóides, uma em ASW e outra em ASW Ca^{2+} *free*. Para a fertilização, cada suspensão de espermatozóide foi adicionada em cada suspensão de óvulos, de modo que foram avaliados 4 tratamentos diferentes: Óvulos e espermatozóides em ASW; Óvulos em ASW e espermatozóides em ASW Ca^{2+} *free*; Óvulos em ASW Ca^{2+} *free* e espermatozóides em ASW; e Óvulos e espermatozóides em ASW Ca^{2+} *free*.

Trinta minutos após a indução da fertilização, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4%, e o percentual de óvulos fertilizados foi analisado sob microscopia óptica comum (Figura 11).

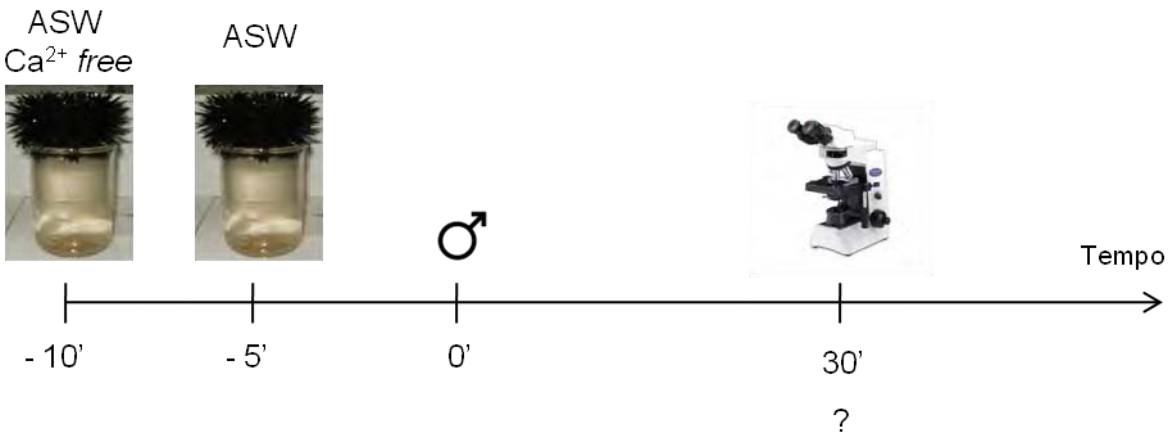

Figura 11: Protocolo experimental de avaliação do papel do Ca^{2+} extracelular na fertilização de *Echinometra lucunter.* Os óvulos foram depositados em ASW Ca^{2+} *free* e ASW, respectivamente. No tempo 0' foi adicionada uma suspensão de espermatozóide, diluída em ASW Ca^{2+} *free* ou em ASW, em cada suspensão de óvulo. A fertilização foi monitorada em microscopia óptica comum.

3.4.4.2 Efeito de bloqueadores de canais de Ca^{2+} na fertilização de *Echinometra lucunter*

Os óvulos foram previamente tratados com diversas concentrações dos bloqueadores de Ca_v (NF, VP e DT) em diferentes concentrações e preparações durante um período de 10 minutos. Em seguida, a fertilização foi induzida a partir da adição da suspensão de espermatozóides, e após 30 minutos as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e o percentual de óvulos fertilizados foi determinado sob microscopia óptica comum (Figura 12).

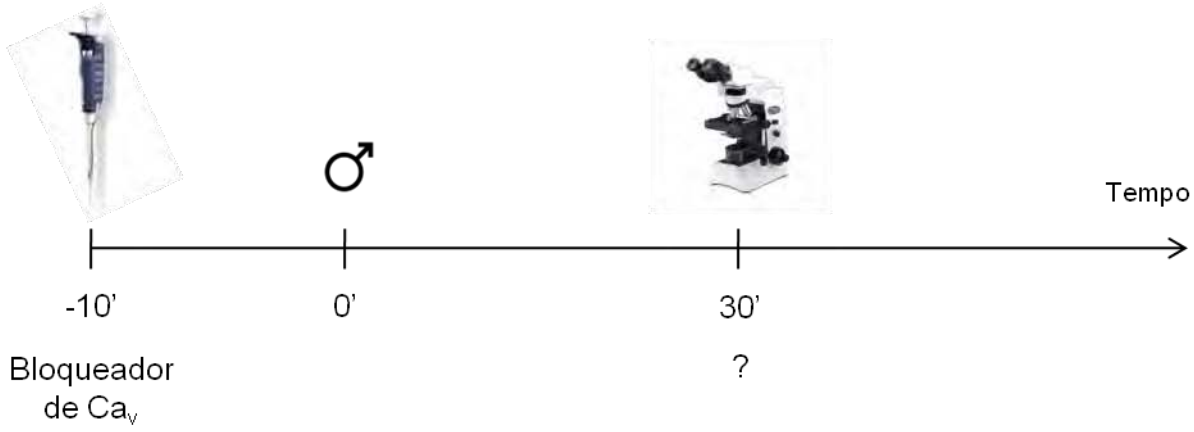

Figura 12: Protocolo experimental de avaliação do efeito de bloqueadores de Ca_v na fertilização de *Echinometra lucunter*. Os óvulos foram previamente tratados com diferentes concentrações de NF, VP ou DT durante 10 minutos, em seguida a fertilização foi induzida e o percentual de óvulos fertilizados foi obtido por microscopia óptica comum.

3.4.4.3 Efeito de quelantes de Ca^{2+} no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Os óvulos foram fertilizados (tempo 0') e após 10 minutos foram tratados com diversas concentrações dos seguintes quelantes de Ca^{2+}: ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA) e do ácido etilenoglicol-bis-(β-aminoetiléter) N, N, N', N'-tetraacético (EGTA). Nos tempos de 90 (estágio de primeira clivagem) e 120 minutos (estágio de segunda clivagem) após a indução da fertilização, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e o desenvolvimento embrionário analisado sob microscopia óptica comum. Os ensaios foram realizados em triplicata e um total de 100 embriões foi analisado em cada amostra. Após as análises foi determinado o percentual de inibição correspondente aos embriões que não haviam atingido o estágio do desenvolvimento característico daquele intervalo de tempo (Figura 13).

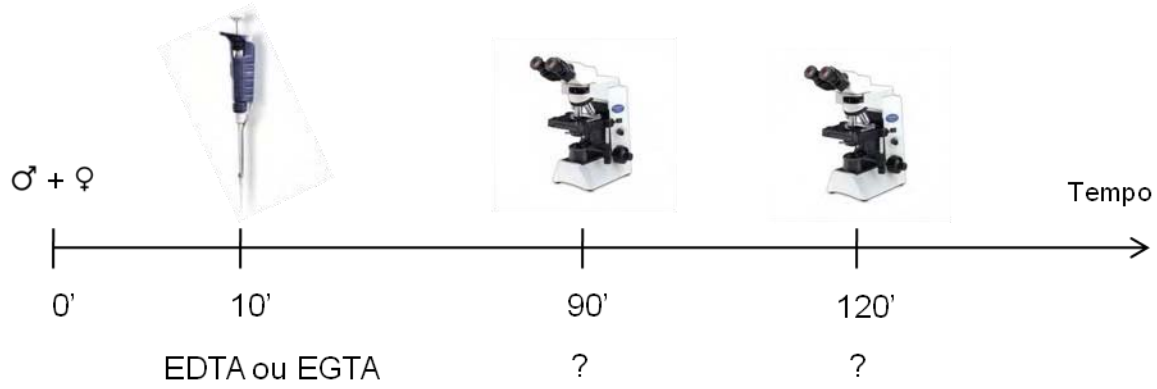

Figura 13: Protocolo experimental de avaliação do efeito de quelantes de Ca^{2+} no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*. Os óvulos foram fertilizados no tempo 0' e após 10 minutos tratados com diferentes concentrações de EDTA ou EGTA. O desenvolvimento embrionário foi acompanhado durante a primeira e segunda clivagem.

3.4.4.4 Efeito de bloqueadores de canais de Ca^{2+} no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Foram avaliados os efeitos de três bloqueadores de Ca_v no desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*: A NF, o VP e o DT, sendo o primeiro um bloqueador específico para Ca_v1, e os dois últimos inespecíficos para todos os tipos de Ca_v.

Os óvulos foram fertilizados (tempo 0') e após 10 minutos tratados com diversas concentrações de cada um dos compostos. Nos tempos de 90, 120 e 240 minutos após a indução da fertilização, referentes aos estágios de primeira clivagem, segunda clivagem e mórula, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e o estágio do desenvolvimento embrionário analisado sob microscopia óptica comum. Os ensaios foram realizados em triplicata e um total de 100 embriões analisado em cada amostra. Após as análises foi determinado o percentual de inibição correspondente aos embriões que não haviam atingido o estágio do desenvolvimento característico daquele intervalo de tempo (Figura 14).

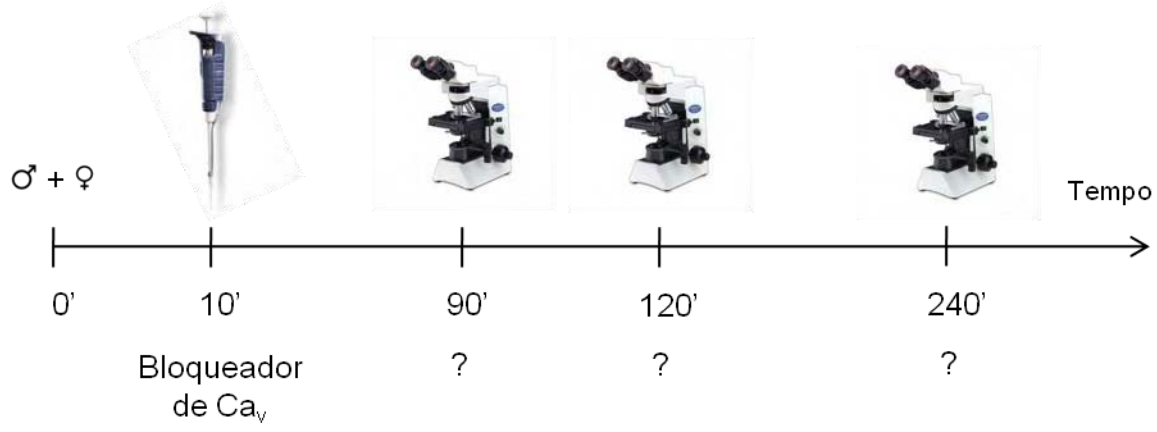

Figura 14: Protocolo experimental para avaliar o efeito de bloqueadores de Ca_v no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*. Os óvulos foram fertilizados no tempo 0' e após 10 minutos foram tratados com diferentes concentrações de NF, VP ou DT. O desenvolvimento embrionário foi acompanhado durante a primeira clivagem, segunda clivagem e estágio de mórula.

3.4.4.5 Efeito dos bloqueadores de Ca_v no acúmulo intracelular de Calceína-AM em embriões de *Echinometra lucunter*

O ensaio de acúmulo intracelular de C-AM é utilizado para investigar a atividade funcional de proteínas ABC em diferentes tipos celulares, como também avaliar a ação de determinados compostos na modulação da atividade dessas proteínas.

A C-AM, é um substrato não fluorescente de proteínas ABC e seu acúmulo intracelular é inversamente proporcional à atividade dessas proteínas. C-AM é convertida em calceína fluorescente por esterases intracelulares. Em sua forma fluorescente, a calceína permanece retida na célula, não sendo substrato para proteínas ABC. Dessa forma, uma alta fluorescência intracelular é indicador de baixa atividade de proteínas ABC e uma baixa fluorescência é sinal de intensa atividade de transporte mediado por estas proteínas (Figura 15).

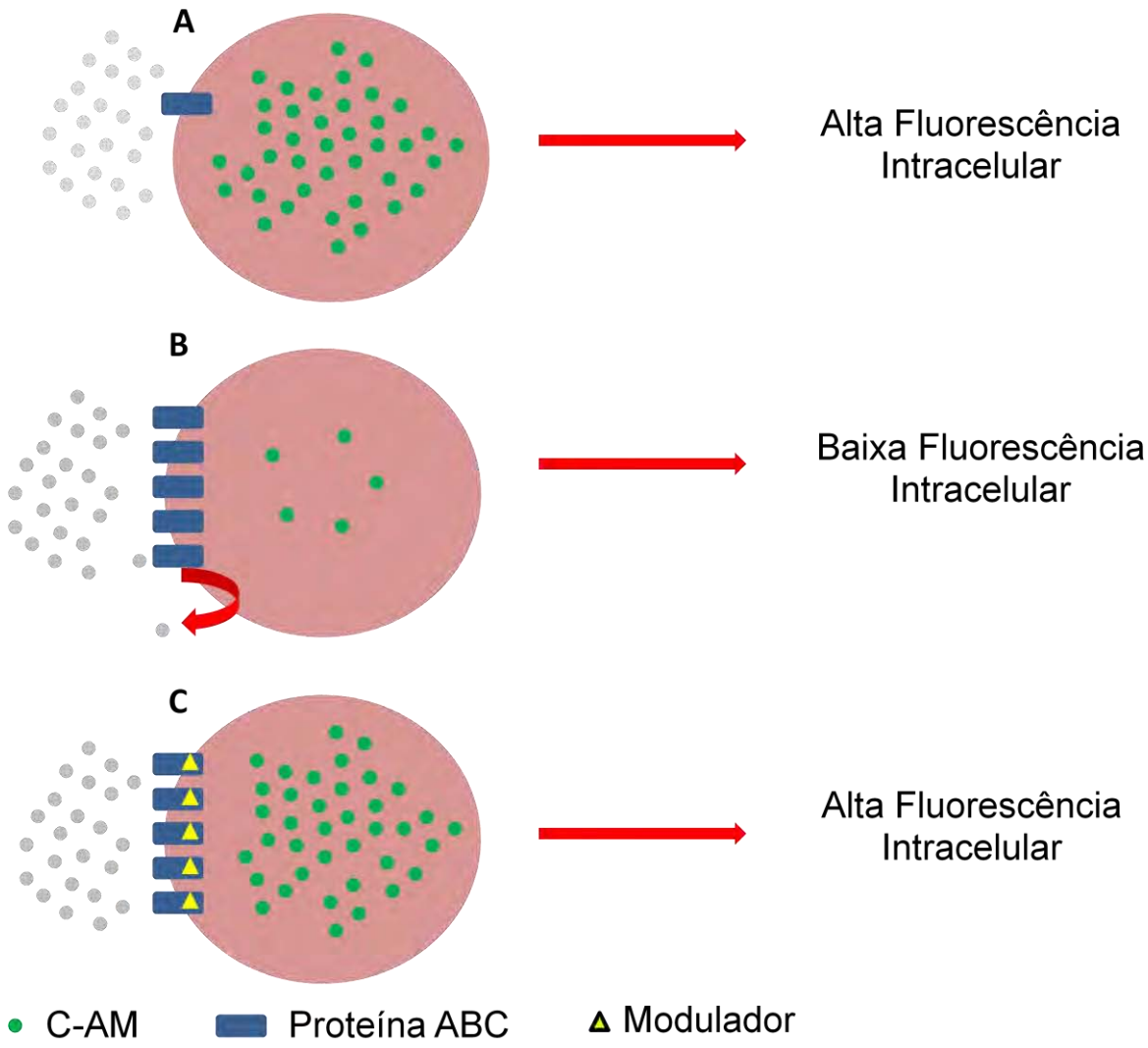

Figura 15: Representação esquemática do ensaio de C-AM para identificação da atividade de proteínas ABC em determinado tipo celular ou para a determinação da atividade moduladora de diversos compostos sobre essas proteínas. (A) Célula com baixa expressão de Proteínas ABC. (B) Célula com alta expressão de Proteínas ABC. (C) Célula com alta expressão de proteínas ABC tratada com um agente modulador.

Para a condução do ensaio, os óvulos foram fertilizados (tempo 0') e após 10 minutos tratados com os bloqueadores de Ca_v (NF, VP e DT) em diferentes concentrações durante um período de 20 minutos. Em seguida, foram incubados por 60 minutos com C-AM (250 nM) em placas de culturas estéreis e protegidas da luz. A análise do experimento foi realizada em microscopia de fluorescência (Olympus BX41 equipado com lâmpada de mercúrio – excitação a 488 nm). As imagens foram obtidas com o auxílio de uma câmera digital (Sony Cyber-Shot H3 com lentes Carl Zeiss), com o tempo de exposição de ¼ segundos, F 3,5 de abertura do diafragma, e ISO 800. Todas as imagens foram capturadas com um aumento total de 400 vezes. A intensidade de fluorescência das imagens foi analisada com o software IMAGE J (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) e os valores foram expressos como unidades arbitrárias (u.a.) ou média da intensidade de fluorescência (MIF) (Figura 16).

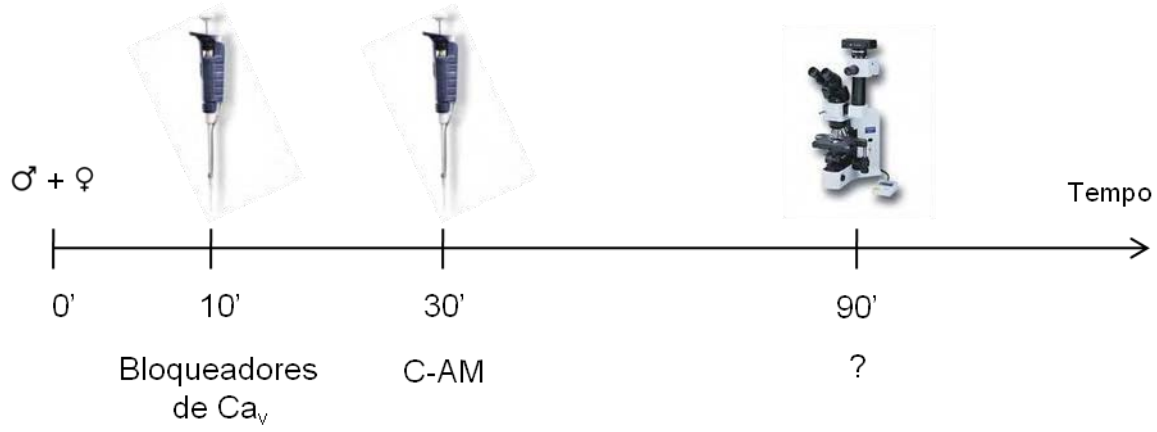

Figura 16: Protocolo experimental de avaliação do efeito de bloqueadores de Ca_v no acúmulo intracelular de C-AM em embriões de *Echinometra lucunter*. Os óvulos foram fertilizados e após 10 minutos foram tratados com NF, VP ou DT em diferentes concentrações durante um período de 20 minutos. Em seguida, foram incubados com C-AM durante 60 minutos e a leitura do experimento foi realizada em microscopia de fluorescência.

3.4.4.6 Efeito da Valinomicina, Nigericina e Ouabaína na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* induzido pelo Verapamil

Foi avaliado o efeito da VL (um ionóforo seletivo para K^+), da NG, (um ionóforo que promove a troca entre K^+ e H^+ através da membrana), e a OUA, (um inibidor da Na^+/K^+ ATPase), na inibição do desenvolvimento embrionário de *E. lucunter* utilizando, para tanto, dois protocolos distintos.

No primeiro protocolo, os óvulos foram fertilizados (tempo 0') e após 5 minutos tratados com diversas concentrações de cada um dos compostos por um período de 5 minutos. Posteriormente foi adicionado o VP em uma concentração pré-determinada. Nos tempos de 120 e 240 minutos após a indução da fertilização, referentes aos estágios de segunda clivagem e mórula, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e o estágio do desenvolvimento embrionário analisado sob microscopia óptica comum. Os ensaios foram realizados em triplicata e um total de 100 embriões foi avaliado em cada amostra. Após as análises foi determinado o percentual de inibição correspondente aos embriões que não atingiram o estágio do desenvolvimento característico daquele intervalo de tempo (Figura 17).

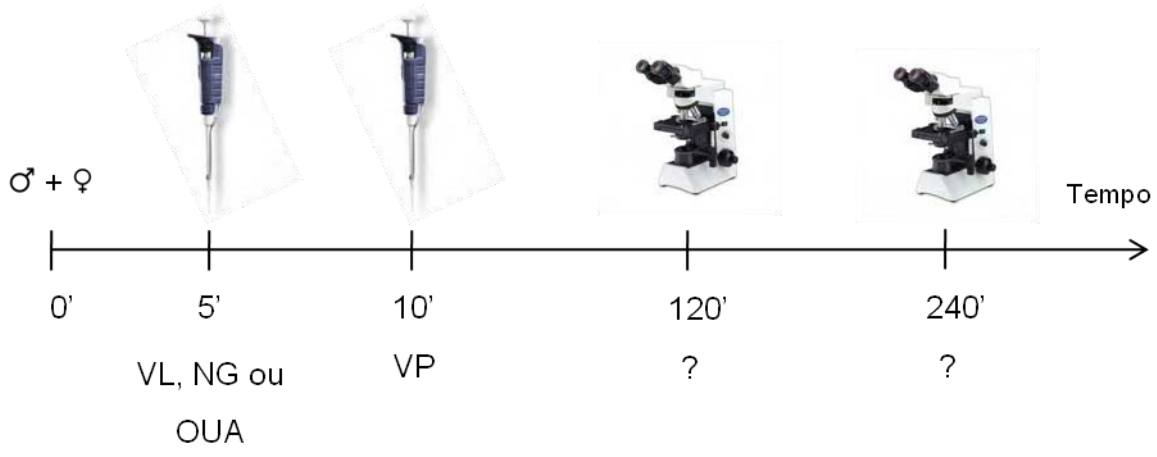

Figura 17: Primeiro protocolo experimental para avaliar o efeito da VL, NG e OUA na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* induzido pelo VP. Os óvulos foram fertilizados no tempo 0' e foram tratados com diferentes concentrações dos compostos no tempo 5' e com VP no tempo 10'. O desenvolvimento embrionário foi acompanhado durante a segunda clivagem e o estágio de mórula.

No segundo protocolo, os óvulos foram fertilizados (tempo 0') e após 10 minutos tratados com uma concentração pré-estabelecida de VP por um período de 5 minutos. Em seguida, foi adicionado, em diferentes concentrações, VL, NG ou OUA. As amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% nos tempos de 120 e 240 minutos, referentes aos estágios de segunda clivagem e mórula, respectivamente. A percentagem de inibição da progressão para cada fase do desenvolvimento foi determinada a partir da análise do estágio do desenvolvimento em microscopia óptica comum (Figura 18).

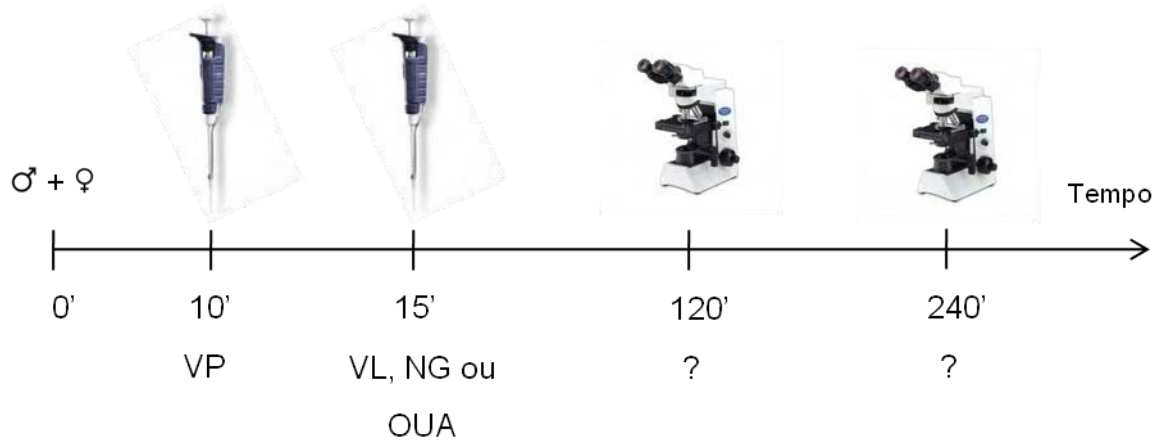

Figura 18: Segundo protocolo experimental de avaliação do efeito da VL, NG e OUA na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* induzido pelo VP. Os óvulos foram fertilizados no tempo 0' e foram tratados com VP no tempo 10' e com diferentes concentrações de cada composto no tempo 15'. O desenvolvimento embrionário foi acompanhado durante a segunda clivagem e o estágio de mórula.

3.4.4.7 Efeito do Verapamil e do EGTA em diferentes intervalos de adição no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Os embriões recém fertilizados foram tratados com concentrações pré-estabelecidas de VP ou EGTA em intervalos de tempo variando de 30 segundos a 80 minutos. Nos tempos de 90, 120 e 240 minutos após a indução da fertilização, referentes aos estágios de primeira clivagem, segunda clivagem e mórula, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e o estágio do desenvolvimento embrionário foi analisado sob microscopia óptica comum. Os ensaios foram realizados em triplicata e um total de 100 embriões foi analisado em cada amostra. Após as análises foi determinado o percentual de inibição, correspondente aos embriões que não atingiram o estágio do desenvolvimento característico daquele intervalo de tempo (Figura 19).

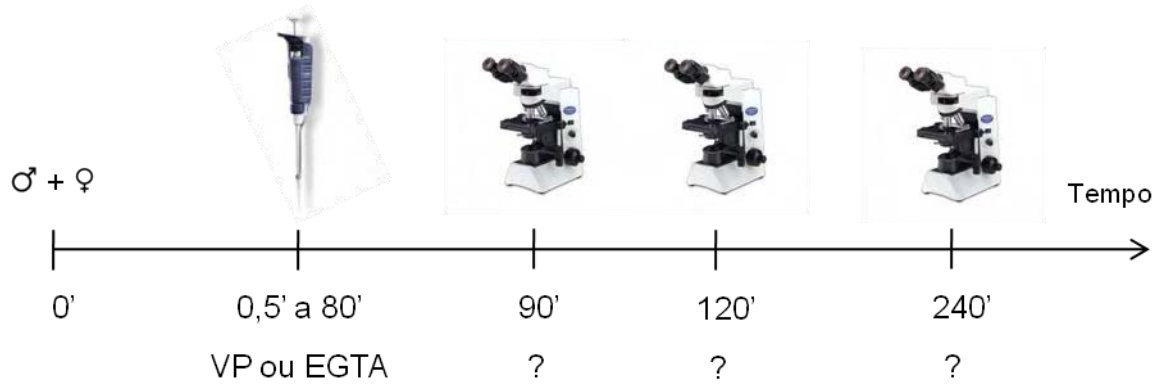

Figura 19: Protocolo experimental de avaliação do efeito do VP e do EGTA em diferentes intervalos de tempo na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*. Os embriões foram tratados com concentrações pré-estabelecidas de ambos os compostos em intervalos de tempo que variaram de 30 segundos a 80 minutos. O desenvolvimento embrionário foi acompanhado durante a segunda clivagem e o estágio de mórula.

3.4.4.8 Efeito da Reversina 205 em associação com o Verapamil no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Os óvulos foram fertilizados e após 5 minutos tratados com VER, um inibidor específico do transporte mediado por proteínas ABC, na concentração de 5 µM. O VP, em uma concentração pré-estabelecida, foi adicionado em intervalos de tempo variando de 20 a 80 minutos após a indução da fertilização. No período de 120 minutos, referentes ao estágio de segunda clivagem, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e o desenvolvimento embrionário foi analisado sob microscopia óptica comum. Os ensaios foram realizados em triplicata e um total de 100 embriões foi analisado em cada amostra. Após as análises foi determinado o percentual de inibição, correspondente aos embriões que não atingiram o estágio de segunda clivagem (Figura 20).

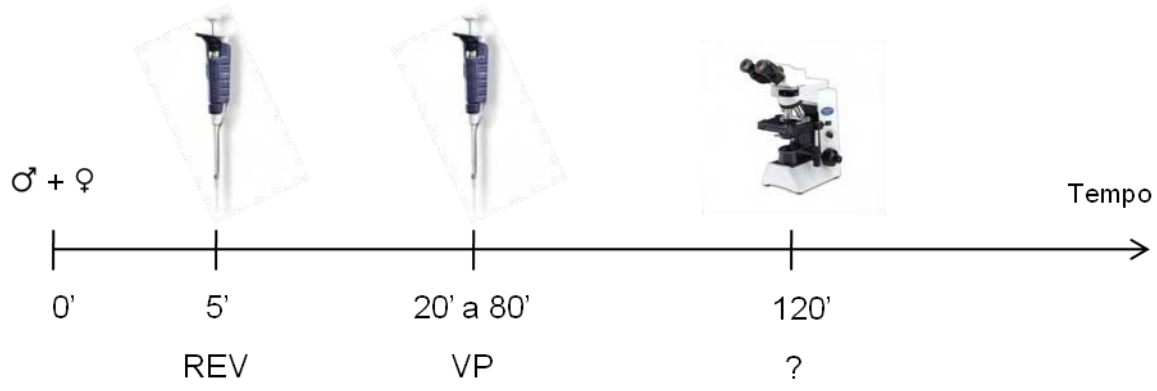

Figura 20: Protocolo experimental de avaliação do efeito da associação reversina 205 e verapamil no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*. Os óvulos foram fertilizados e após 5 minutos foram tratados com REV na concentração de 5 µM. O VP foi adicionado, em uma concentração pré-estabelecida, em intervalos de tempo variando de 20 a 80 minutos após a indução da fertilização. O desenvolvimento embrionário foi analisado durante o estágio de segunda clivagem.

3.4.4.9 Efeito do BAPTA-AM, da Trifluoperazina e da Clorpromazina no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Os óvulos foram fertilizados (tempo 0') e após 50 minutos tratados com o BAPTA-AM (10 µM), um quelante intracelular de Ca^{2+} e com os bloqueadores do complexo Ca^{2+}-Calmodulina, TFP (70 µM) e CPZ (35 µM). Nos tempos de 90, 120 e 240 minutos após a indução da fertilização, referentes aos estágios de primeira clivagem, segunda clivagem e mórula, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e o desenvolvimento embrionário analisado sob microscopia óptica comum. Os ensaios foram realizados em triplicata e um total de 100 embriões foi analisado em cada amostra. Após as análises foi determinado o percentual de inibição, correspondente aos embriões que não atingiram o estágio do desenvolvimento característico daquele intervalo de tempo (Figura 21).

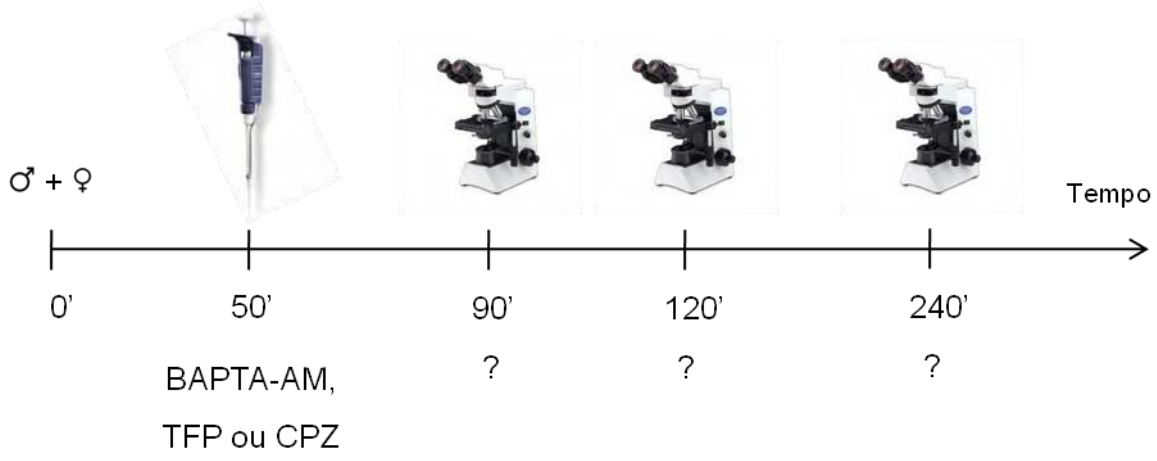

Figura 21: Protocolo experimental de avaliação do efeito do BAPTA-AM, da TFP e da CPZ no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*. Os óvulos foram fertilizados e após 50 minutos foram tratados com BAPTA-AM (10 µM), TFP (70 µM) e CPZ (35 µM). O desenvolvimento embrionário foi acompanhado durante a primeira clivagem, a segunda clivagem e o estágio de mórula.

3.4.4.10 Efeito da Ionomicina na ativação de óvulos de *Echinometra lucunter*

Os óvulos foram incubados em ASW ou ASW Ca^{2+} *free* e tratados com deferentes concentrações de IONO, um ionóforo de Ca^{2+}, no tempo 0'. A ativação foi monitorada sob microscopia óptica comum nos tempos de 1 e 5 minutos após a adição de IONO. De acordo com a elevação do envelope fertilização, os óvulos foram classificados em ativados, quando era observada a formação do espaço perivitelínico, ou não ativados, quando este espaço não era visualizado. A morte celular era identificada morfologicamente quando ocorria extravasamento do conteúdo intracelular dos óvulos (Figura 22).

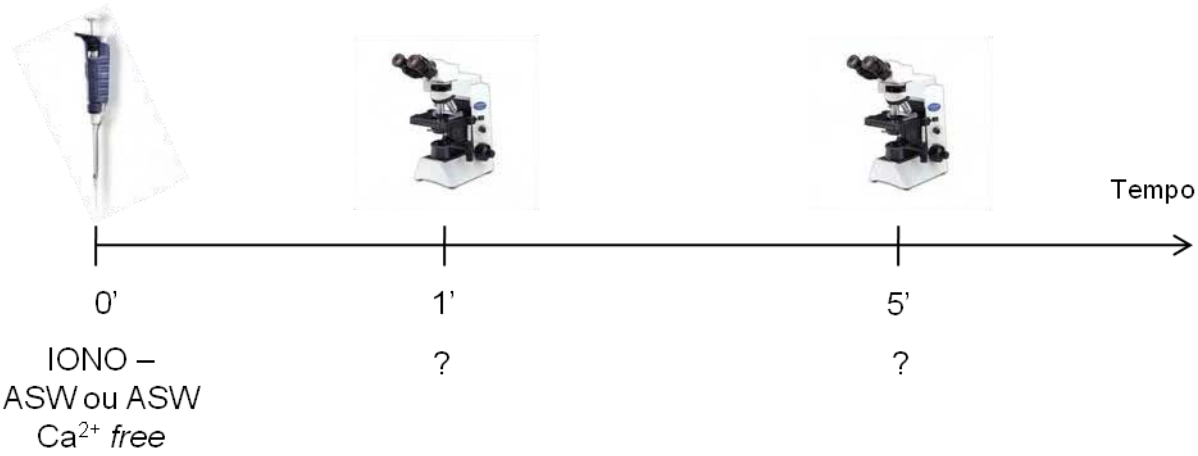

Figura 22: Protocolo experimental de avaliação do efeito da IONO na ativação de óvulos de *E. lucunter*. Os óvulos foram incubados em ASW ou ASW Ca^{2+} *free* e foram tratados com diversas concentrações de IONO (tempo 0'). A ativação foi monitorada sob microscopia óptica comum nos tempos de 1 e 5 minutos após a adição de IONO.

3.4.4.11 Efeito da Rotundifolona no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Foi avaliado o efeito da ROT, um monoterpeno isolado a partir das folhas do vegetal *Mentha x villosa*, sobre o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*.

Os óvulos foram fertilizados (tempo 0') e após 10 minutos foram tratados com diferentes concentrações de ROT. Nos tempos de 90, 120 e 240 minutos após a indução da fertilização, referentes aos estágios de primeira clivagem, segunda clivagem e mórula, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e o desenvolvimento embrionário foi analisado sob microscopia óptica comum. Os ensaios foram realizados em triplicata e um total de 100 embriões foi analisado em cada amostra. Após as análises foi determinado o percentual de inibição, correspondente aos embriões que não atingiram o estágio do desenvolvimento característico daquele intervalo de tempo (Figura 23).

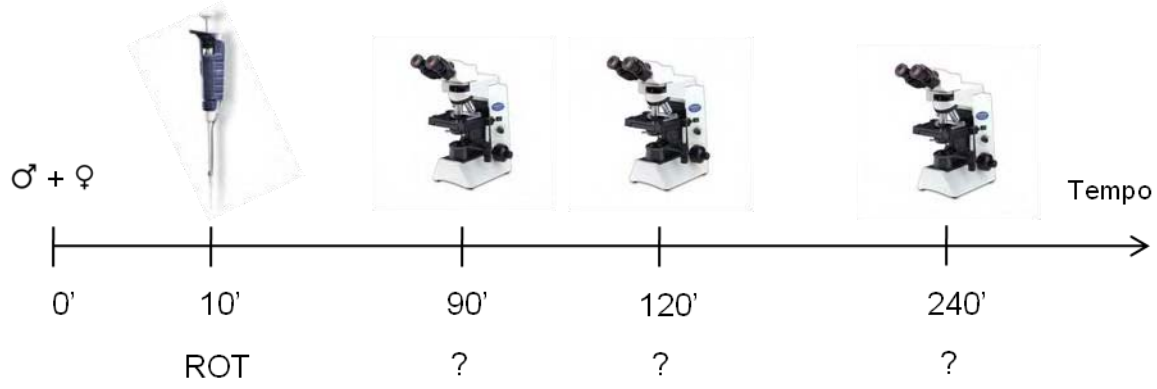

Figura 23: Protocolo experimental de avaliação do efeito da ROT no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*. Os óvulos foram fertilizados no tempo 0' e após 10 minutos foram tratados com diferentes concentrações do composto. O desenvolvimento embrionário foi acompanhado durante a primeira clivagem, segunda clivagem e estágio de mórula.

3.4.5 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e foram analisados estatisticamente empregando a análise de variância One-way (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para os valores de CE_{50} foi empregado o teste t de Student não-pareado e os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Os valores de CE_{50}, concentração de uma substância que promove 50% de seu efeito máximo, foram calculados por regressão não-linear.

Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Envolvimento do Ca^{2+} extracelular na fertilização de *Echinometra lucunter*

Esse ensaio foi realizado seguindo quatro tratamentos distintos: óvulos e espermatozóides incubados em ASW (A); óvulos incubados em ASW e espermatozóides incubados em ASW Ca^{2+} *free* (B); óvulos incubados em ASW Ca^{2+} *free* e espermatozóides incubados em ASW (C); e óvulos e espermatozóides incubados em ASW Ca^{2+} *free* (D). Portanto, o meio A e B eram abundantes em Ca^{2+}, o meio C continha pouco Ca^{2+} (100 µM) e o meio D era nominalmente isento de Ca^{2+}.

Após 30 minutos da adição dos espermatozóides à suspensão de óvulos, os tratamentos A e B apresentaram um percentual de fertilização próximo de 100%, atingindo valores de 98,9 $\pm$ 0,3 e 98,3 + 0,6%, respectivamente. No tratamento C, o percentual de óvulos fertilizados caiu para 39,2 + 6,9% e no tratamento D (meio totalmente isento de cálcio) a percentagem de fertilização foi de apenas 4,2 + 2,0% (Gráfico 1).

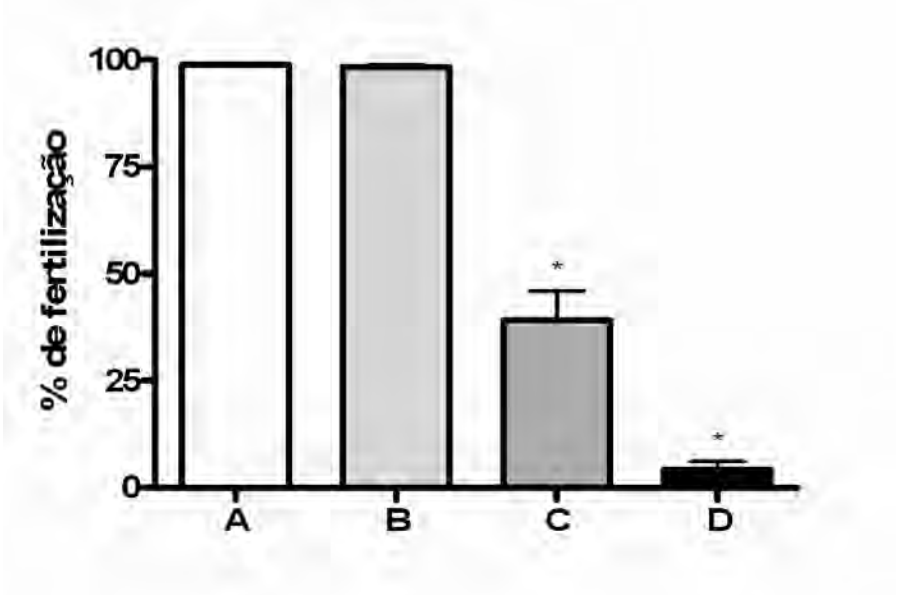

Gráfico 1: Envolvimento do Ca^{2+} extracelular na fertilização de *Echinometra lucunter.* **(A)** Óvulos e espermatozóides em ASW; **(B)** Óvulos em ASW e espermatozóides em ASW Ca^{2+} *free*; **(C)** Óvulos em ASW Ca^{2+} *free* e espermatozóides em ASW; **(D)** Óvulos e espermatozóides em ASW Ca^{2+} *free*. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos realizados em triplicata de maneira independente. * $p < 0,001$ em relação ao controle (A).

4.2 Efeito de bloqueadores de canais de Ca^{2+} na fertilização de *Echinometra lucunter*

Para investigar a participação dos canais de cálcio operados por voltagem na fertilização de *E. lucunter*, foram utilizados os mesmos bloqueadores de Ca_v efetivos na inibição do desenvolvimento embrionário como ferramenta farmacológicas.

A NF apresentou um efeito inibitório discreto na fertilização, bloqueando esse processo nas concentrações de 150 e 200 µM, porém de forma bastante sutil, com percentagens de inibição de cerca de 6,2 e 11,82%, respectivamente (Gráfico 2).

O bloqueio induzido pelo VP foi mais acentuado, inibindo a fertilização de maneira dependente de concentração a partir de 50 µM. Nesses tratamentos, a percentagem de óvulos fertilizados foi de 85,5 $\pm$ 2,4% (50 µM), 52,5 $\pm$ 2,6% (75 µM), 4,8 $\pm$ 1,9% (100 µM), e 0% (150 µM), em relação ao controle, o que equivale a um percentual de inibição aproximado de 14,5, 47,5, 95,2 e 100%, respectivamente (Gráfico 2).

O DT também foi bastante eficaz na inibição da fertilização, impedindo esse processo nas concentrações de 50, 75, 100, 150 e 200 µM e induzindo uma inibição de aproximadamente de 12,4, 35,8 , 87,8, 99,5 e 100%, respectivamente (Gráfico 2).

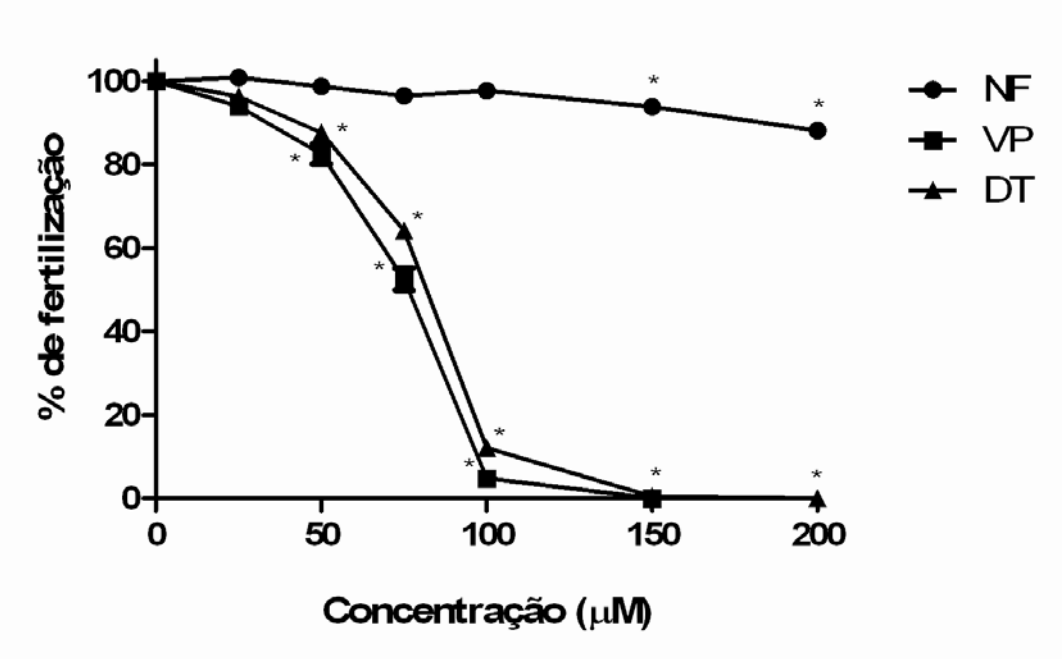

Gráfico 2: Efeito de bloqueadores de Ca_v na fertilização. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos realizados em triplicata de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. * $p < 0,001$ em relação ao controle.

Para comparar a potência dos três bloqueadores de Ca_v na fertilização de *E. lucunter*, foi calculada a CE_{50}, por meio de uma regressão não linear, e os valores obtidos são mostrados na tabela 4.

Tabela 4: Valores da CE_{50} dos bloqueadores de Ca_v na fertilização de *E. lucunter* obtidos por meio de uma regressão não linear. (NC) Não calculado. (n = 3).

Bloqueadores de Ca_v	**CE_{50} – Média (Intervalo de Confiança 95%) (µM)**
NF	NC
VP	77,7 (68,6 a 87,9)
DT	81,8 (73,9 a 90,4)

Não foi possível obter os valores da CE_{50} para a NF, uma vez que todas as concentrações analisadas apresentaram um percentual de inibição superior a 50%, o que comprova a baixa efetividade desse composto no bloqueio da fertilização. Por outro lado, o VP e DT apresentaram valores de CE_{50} relativamente baixos e não significativamente diferentes, o que ressalta a grande potência desses fármacos no bloqueio da fertilização.

4.3 Efeito de quelantes de Ca^{2+} no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

4.3.1 Efeito do EDTA no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

O EDTA bloqueou a progressão para o estágio de primeira clivagem de maneira dependente de concentração a partir de 500 µM. Nesses tratamentos a percentagem de embriões que realizaram a primeira divisão celular foi de 80 ± 7,7 (500 µM), 52,1 ± 8,7 (625 µM), 12,2 ± 87,8 (750 µM), 3,9 ± 0,6 (875 µM) e 2,1 ± 0,4% (1 mM) em relação ao controle, representando uma inibição de cerca de 20, 47,9, 87,8, 96,1 e 97,9, respectivamente (Gráfico 3A).

O EDTA também bloqueou a progressão para o estágio de segunda clivagem, onde apresentou um percentual de inibição de aproximadamente 32,6 (500 µM), 58,2 (625 µM), 90,0 (750 µM), 93,6 (875 µM) e 98,6% (1 mM), em relação ao controle (Gráfico 3B).

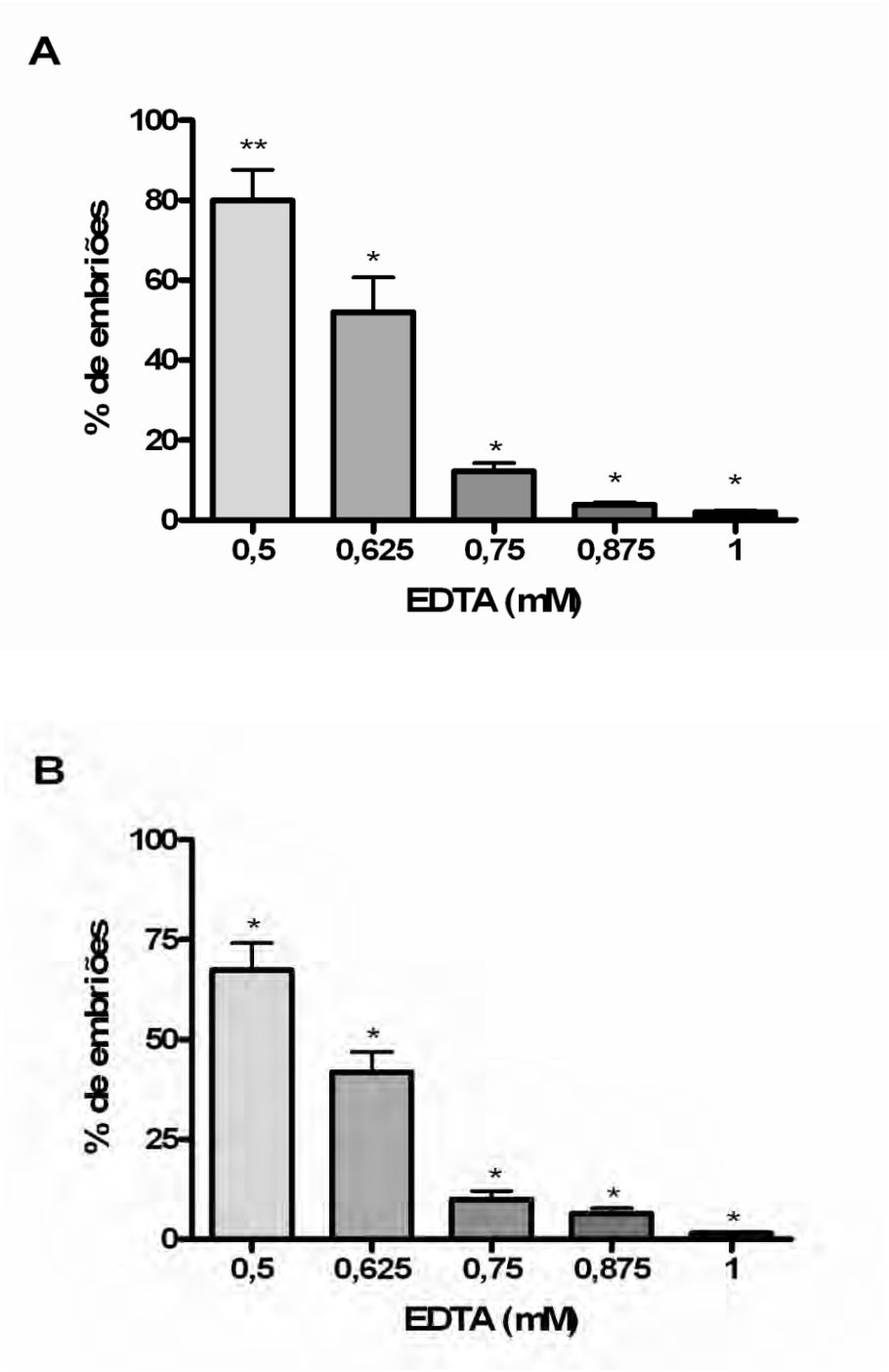

Gráfico 3: Efeito do EDTA na progressão para o estágio de primeira clivagem **(A)** e segunda clivagem **(B)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões em primeira clivagem ou segunda clivagem. Os dados representam a média ± EPM de 6 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%.* $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. ** $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.3.2 Efeito do EGTA no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

O EGTA mostrou-se bastante potente no bloqueio da progressão para a primeira clivagem, inibindo esse estágio de maneira dependente de concentração a partir de 300 µM. Nesses tratamentos a percentagem de embriões que realizaram a primeira divisão celular foi de 75,0 ± 4,0 (300 µM), 43,7 ± 1,8 (350 µM), 11,1 ± 2,6 (400 µM), 4,8 ± 2,0 (500 µM) e 0,0 ± 0,0% (600 µM) em relação ao controle, o que equivale a uma inibição de aproximadamente 25, 55,3, 88,9, 95,2 e 100%, respectivamente (Gráfico 4A).

O EGTA também inibiu a progressão para o estágio de segunda clivagem, porém com uma intensidade maior nas concentrações mais elevadas. A percentagem de embriões que atingiram esse estágio foi de 62,9 ± 7,0 (300 µM), 26,4 ± 2,1 (350 µM), 5,3 ± 2,6 (400 µM), 2,6 ± 1,2 (500 µM) e 0,0 ± 0,0% (600 µM), representando uma inibição de cerca de 37,1, 73,6, 94,7, 97,4 e 100%, respectivamente (Gráfico 4B).

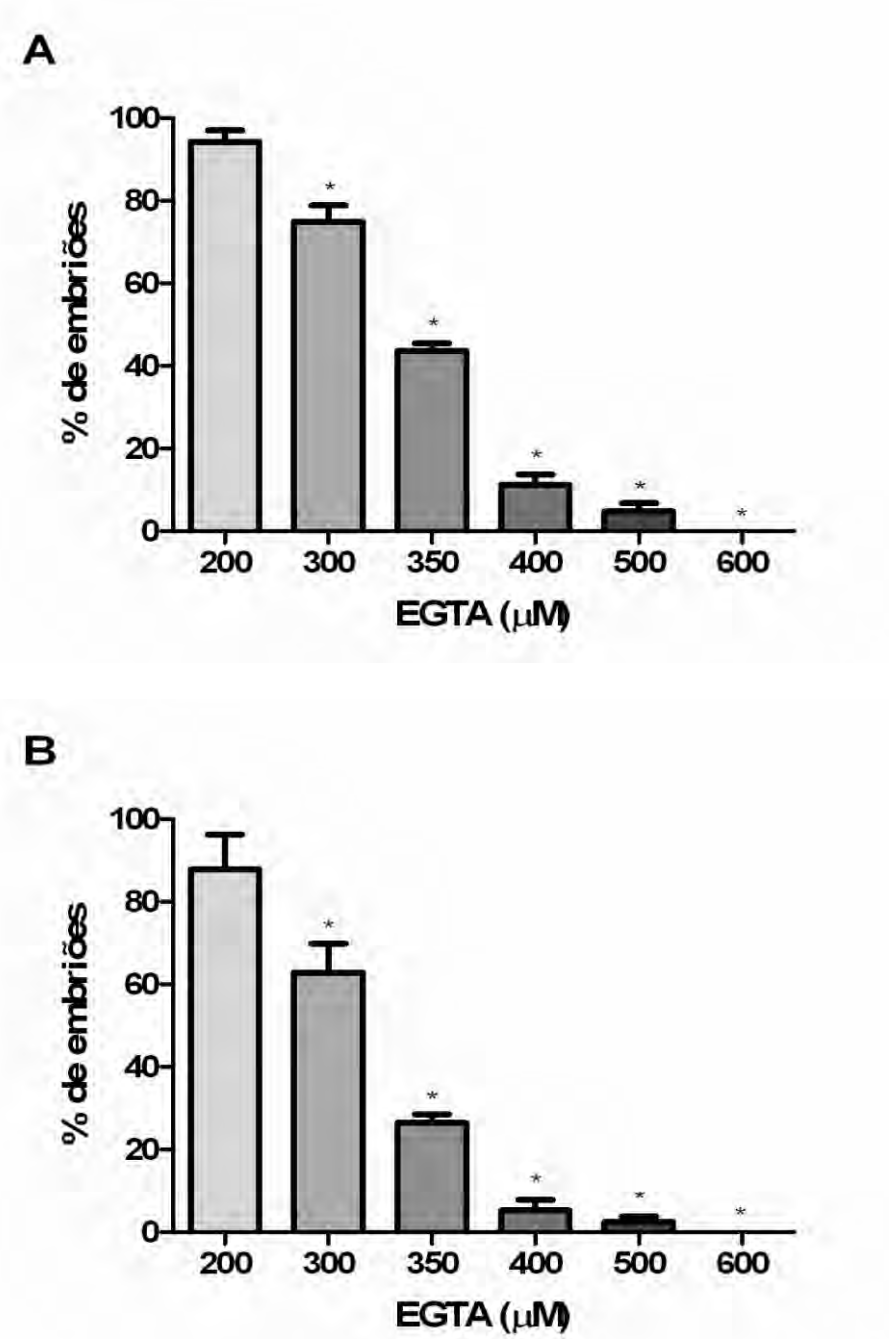

Gráfico 4: Efeito do EGTA na progressão para o estágio de primeira clivagem **(A)** e segunda clivagem **(B)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a primeira **(A)** ou segunda clivagem **(B)**. Os dados representam a média ± EPM de 4 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%.* $p < 0{,}001$ em relação ao grupo controle.

4.3.3 Valores da CE_{50} referentes ao tratamento dos embriões de *E. lucunter* com quelantes de Ca^{2+}

Para comparar a eficácia dos dois quelantes de Ca^{2+} no tratamento dos embriões, foi calculada a CE_{50} (concentração de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo), por meio de uma regressão não linear, para todos os estágios analisados. Os valores obtidos foram apresentados na forma de média e intervalo de confiança 95% (tabela 4).

Tabela 5: Valores da CE_{50} para o efeito inibitório do EDTA e EGTA no desenvolvimento embrionário, obtidos por meio de uma regressão não linear. Todos os valores são significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste *t* de Student não-pareado (EDTA x EGTA) para os dois estágios monitorados.

Quelante	CE_{50} – Média (Intervalo de Confiança 95%) (µM)	
	1ª Clivagem	2ª Clivagem
EDTA	649,0 (613,8 a 666,6)	572,1 (532,6 a 614,5)
EGTA	341,9 (319,3 a 366,2)	324,3 (313,1 a 336,0)

Pode-se observar que o EGTA apresentou uma potência farmacológica mais elevada que o EDTA, uma vez que os seus valores de CE_{50} são menores em todos os estágios monitorados.

4. 4 Efeito de bloqueadores de canais de Ca^{2+} no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Os óvulos fertilizados foram tratados com esses compostos em diferentes concentrações e o desenvolvimento embrionário foi monitorado durante a primeira clivagem, segunda clivagem e estágio de mórula.

4.4.1 Efeito da Nifedipina no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

A NF, uma diidropiridina que bloqueia especificamente os Ca_V1, inibiu a progressão para a primeira clivagem, de maneira dependente de concentração, em 200, 250, 300, 350 e 400 µM. Nesses tratamentos, a percentagem de embriões que passaram desse estágio do desenvolvimento foi de 81,3 $\pm$ 1,5% (200 µM), 60,5 $\pm$ 1,4% (250 µM), 31,7 $\pm$ 2,0% (300 µM), 23,0 $\pm$ 1,5% (350 µM) e 14,5 $\pm$ 1,7% (400 µM), em relação ao controle, representando uma inibição aproximada de 18,7, 39,5, 68,3, 77 e 85,5%, respectivamente (Gráfico 5A).

A NF bloqueou a progressão para a segunda clivagem nas mesmas concentrações, porém de forma mais eficiente. A percentagem de embriões que efetuaram a segunda clivagem foi de 68,3 $\pm$ 1,9% (200 µM), 37,7 $\pm$ 2,5% (250 µM), 23,2 $\pm$ 1,5% (300 µM), 17,1 $\pm$ 0,9% (350 µM) e 9,9 $\pm$ 1,1% (400 µM), em relação ao controle, o que equivale a uma inibição de cerca de 31,7, 62,3, 76,8, 82,9 e 90,1% respectivamente (Gráfico 5B).

A NF também bloqueou o desenvolvimento embrionário na fase de mórula nas mesmas concentrações anteriores, obtendo um percentual de inibição de aproximadamente 35,9% (200 µM), 55,5% (250 µM), 68,8% (300 µM), 83,2% (350 µM) e 93,5% (400 µM) em relação ao controle (Gráfico 5C).

O veículo (0,8% etanol absoluto) não apresentou efeito inibitório sobre o desenvolvimento embrionário em nenhum dos estágios monitorados (dados não mostrados).

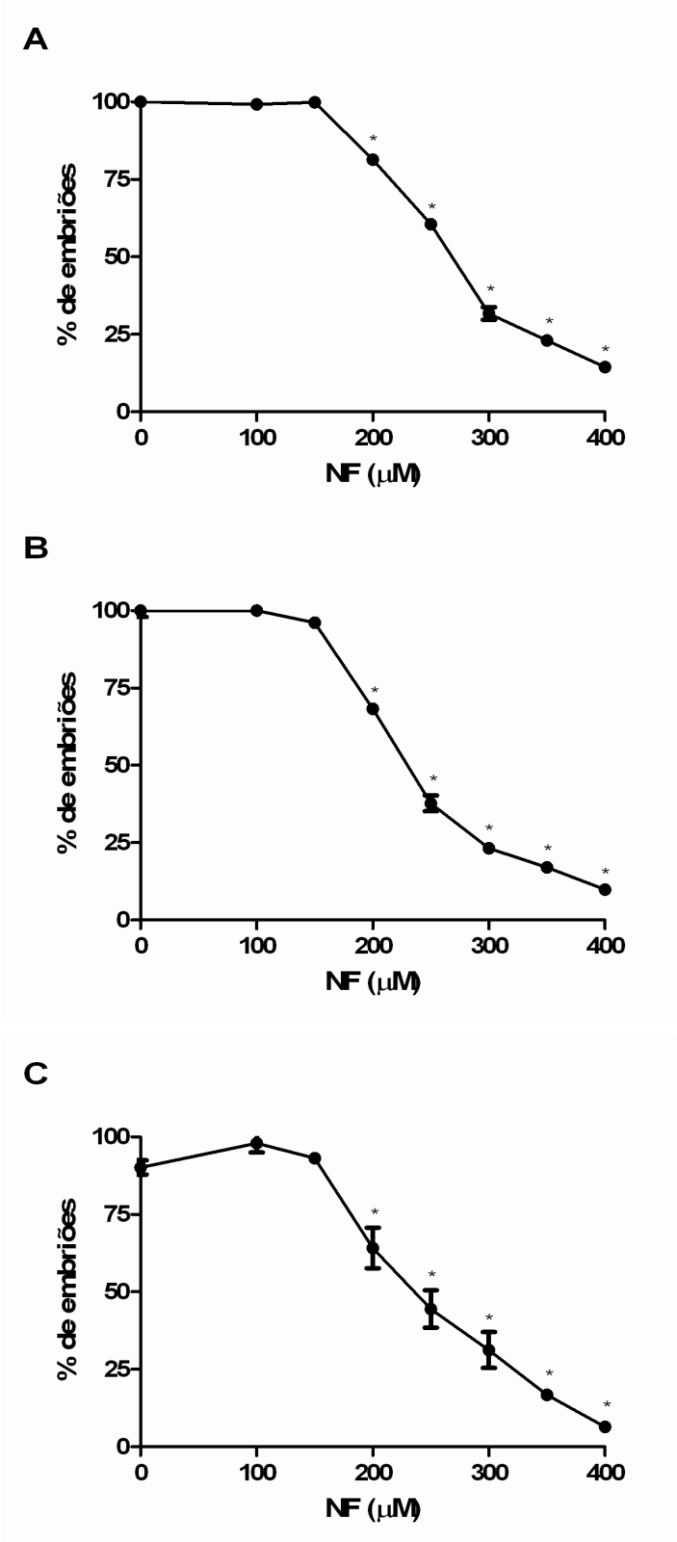

Gráfico 5: Efeito da NF na progressão para o estágio de primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** e mórula **(C)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** ou atingiram o estágio de mórula **(C)**. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%.* $p < 0{,}001$ em relação ao grupo controle.

4.4.2 Efeito do Verapamil no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

O VP, um fármaco pertencente ao grupo das fenilalquilaminas, que bloqueia inespecificamente todos os tipos de Ca_v, bloqueou a progressão para a primeira clivagem, inibindo a primeira divisão celular de maneira dependente de concentração em 200, 250, 300, 350 e 400 µM. A percentagem de embriões que passaram por esse estágio foi de 92,8 ± 1,0% (200 µM), 77,7 ± 1,3% (250 µM), 69,4 ± 1,7% (300 µM), 61,4 ± 1,8% (350 µM) e 55,5 ± 1,2% (400 µM), em relação ao controle, representando uma inibição de aproximadamente 7,2, 22,3, 30,6, 38,6 e 44,5%, respectivamente (Gráfico 6A).

O efeito do VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem foi mais notável, uma vez que o composto bloqueou o desenvolvimento a partir da concentração de 80 µM. O tratamento com as concentrações a partir de 250 µM resultou em 100% de inibição sobre esse estágio do desenvolvimento (Gráfico 6B).

O VP apresentou um efeito ainda mais acentuado sobre a progressão para o estágio de mórula. A percentagem de embriões que atingiram esse estágio foi de 63,6 ± 7,5% (60 µM), 36,0 ± 5,8% (80 µM), 14,2 ± 2,1% (100 µM), 7,7 ± 1,6% (120 µM) e 0% (150 µM, 200 µM, 250 µM, 300 µM, 350 µM e 400 µM), em relação ao controle, o que equivale a um bloqueio aproximado de 36,4, 64,0, 85,8, 92,3 e 100,0%, respectivamente (Gráfico 6C).

O veículo (água destilada) não apresentou efeito inibitório sobre o desenvolvimento embrionário em nenhum dos estágios monitorados (dados não mostrados).

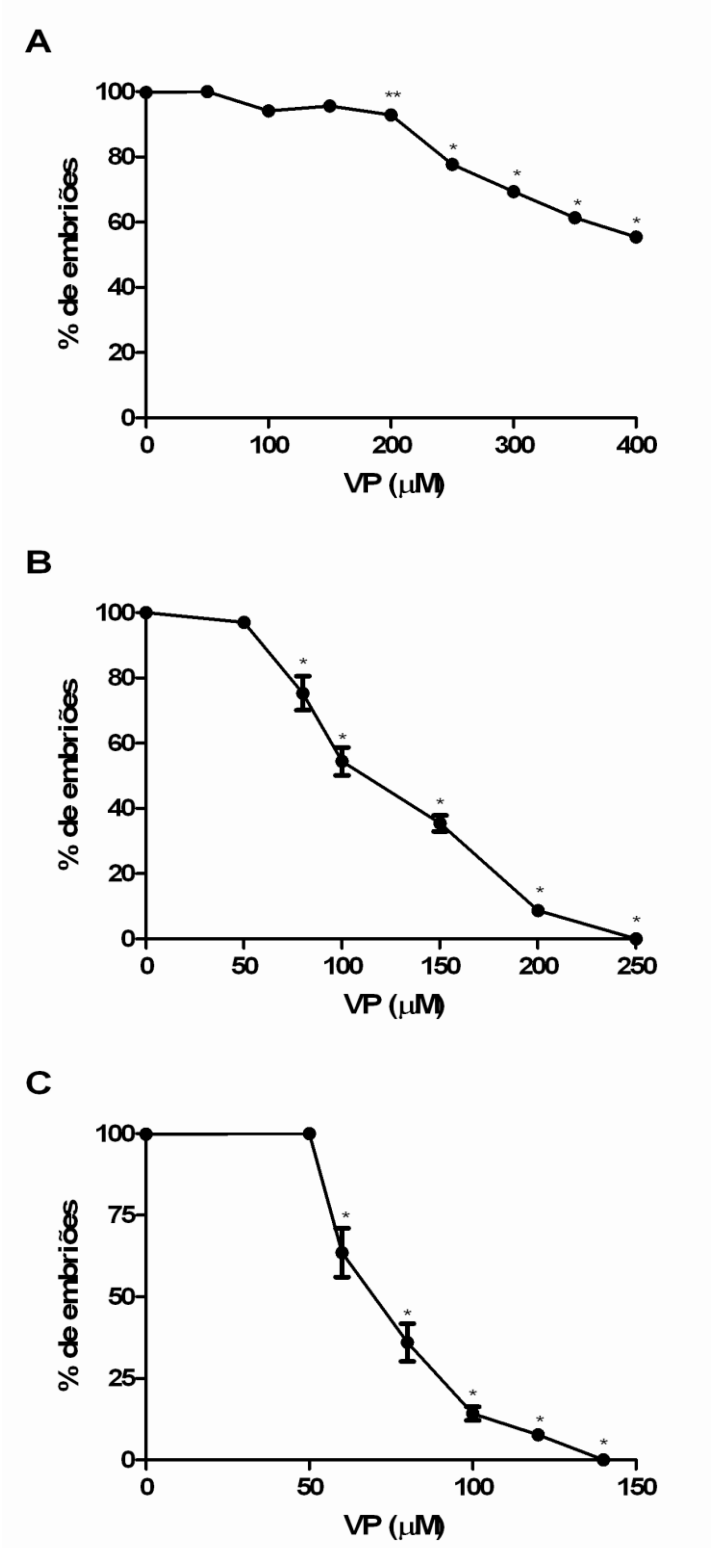

Gráfico 6: Efeito do VP na progressão para o estágio de primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** e mórula **(C)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** ou atingiram o estágio de mórula **(C)**. Os dados representam a média ± EPM de 7 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. ** $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.4.3 Efeito do Diltiazem no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

O DT, um composto da classe das benzotiazepinas que também bloqueia inespecificamente todos os tipos de Ca_v, inibiu a progressão para a primeira clivagem nas concentrações acima de 150 µM, atingindo um percentual de inibição máximo de cerca de 40% na concentração de 300 µM (Gráfico 7A).

O DT foi bastante efetivo no bloqueio para a progressão para a segunda clivagem a partir da concentração de 50 µM. Nesses tratamentos, o percentual de embriões que realizaram a segunda divisão celular foi de 73,4 ± 5,3% (50 µM), 44,6 ± 6,5% (100 µM), 27,6 ± 6,0% (150 µM), 20,1 ± 5,4% (200 µM), 7,0 ± 3,0% (250 µM), 4,3 ± 2,1% (300 µM), 11,7 ± 4,5% (350 µM) e 3,0 ± 1,0% (400 µM), em relação ao controle, representando uma inibição de 26,6, 55,4, 72,4, 79,9, 93,0, 95,7, 88,3% e 97,0%, respectivamente (Gráfico 7B).

O efeito do DT sobre o desenvolvimento embrionário foi bem mais acentuado na progressão para o estágio de mórula, inibindo completamente essa fase a partir da concentração de 200 µM (Gráfico 7C).

O veículo (água destilada) não apresentou efeito inibitório sobre o desenvolvimento embrionário em nenhum dos estágios monitorados (dados não mostrados).

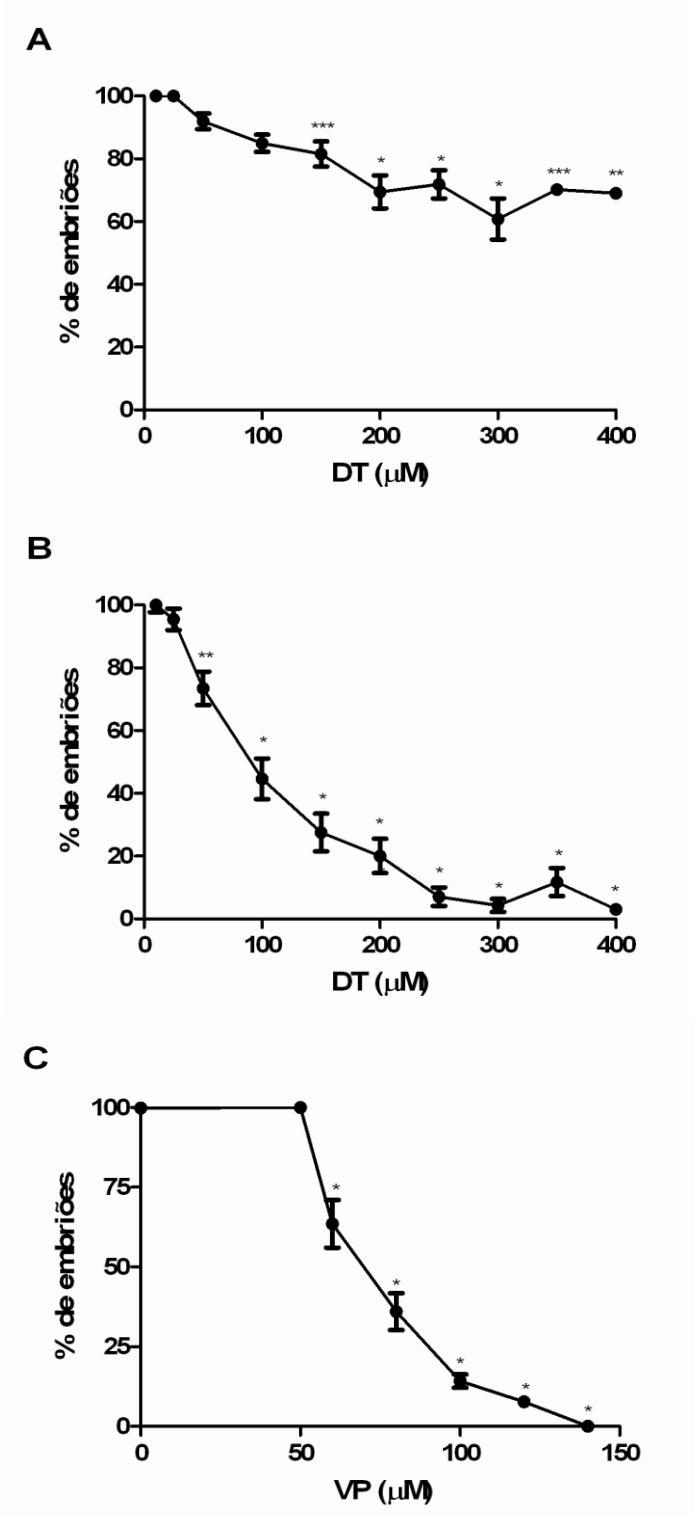

Gráfico 7: Efeito do DT na progressão para o estágio de primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** e mórula **(C)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** ou atingiram o estágio de mórula **(C)**. Os dados representam a média ± EPM de 4 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%.* $p < 0,001$ em relação ao controle. ** $p < 0,01$ em relação ao controle. *** $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.4.4 Valores da CE_{50} referentes ao tratamento dos embriões de *E. lucunter* com bloqueadores de Ca_v

Para comparar a eficácia dos três bloqueadores de Ca_v no tratamento dos embriões, foi calculada a CE_{50}, por meio de uma regressão não linear, para todos os estágios analisados. Os valores obtidos foram apresentados na forma de intervalo de confiança 95% e estão informados na tabela abaixo:

Tabela 6: Valores da CE_{50} para os bloqueadores de Ca_v no desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*, obtidos por meio de uma regressão não linear. (NC) não calculado. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com NF. ** $p < 0,05$ em relação aos grupos tratados com VP ou DT (teste *t* de Student não-pareado).

Compostos	CE_{50} – Média (Intervalo de Confiança 95%) (µM)		
	1ª Clivagem	2ª Clivagem	Mórula
NF	255,2 (231,2 a 281,8)	219,5 (205,5 a 234,3) **	239,1 (226,9 a 252,0) **
VP	NC	113,5 (103,3 a 124,7) *	70,56 (63,9 a 77,8) *
DT	NC	87,96 (70,0 a 110,4) *	78,02 (73,4 a 82,9) *

A NF foi o bloqueador de Ca_v mais efetivo na inibição da progressão para a primeira clivagem. Porém, nos estágios seguintes, o inibidor específico de Ca_v1 apresentou baixa efetividade, sendo o composto de menor eficácia para essas fases.

Não foi possível obter os valores da CE_{50} para o VP e DT na progressão para a primeira clivagem, uma vez que todas as concentrações analisadas apresentaram um percentual de inibição superior a 50%. Entretanto, nos estágios posteriores foram os bloqueadores mais eficientes. Segundo o teste *t* de Student não pareado, não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os valores da CE_{50} do VP e do DT em nenhum estágio monitorado.

4.5 Efeito dos bloqueadores de Ca_v no acúmulo intracelular de Calceína-AM em embriões de *E.lucunter*

Todos os bloqueadores de Ca_v investigados foram capazes de modular negativamente a atividade das proteínas ABC de maneira dependente de concentração (Gráfico 8). A modulação da atividade dos transportadores ABC foi obtida, inclusive, em concentrações que não afetam o desenvolvimento embrionário (Gráficos 8 em comparação com os Gráficos 5, 6 e 7).

Os embriões tratados com NF apresentaram uma IMF de 1,78 (25 µM) e 1,97 (50 µM) vezes maior que o grupo controle (embriões incubados apenas com C-AM). A concentração de 10 µM não apresentou nenhuma diferença significativa na IMF.

O tratamento com o DT também foi capaz de aumentar a IMF em 1,97 vezes em relação ao grupo controle, sendo este resultado obtido na concentração de 10 µM. Dessa forma, o DT mostrou-se mais efetivo que a NF no acúmulo intracelular de C-AM. As concentrações de 25 µM e 50 µM induziram um aumento de 2,44 e 2,49 vezes, respectivamente, em relação ao controle.

O VP foi o bloqueador de Ca_v mais eficaz no aumento da IMF, apresentando valores de 2,41 (10 µM), 3,08 (25 µM) e 3,52 (50 µM) vezes maior em relação ao controle.

As fotomicrografias fluorescentes representativas deste ensaio são apresentadas na figura 24.

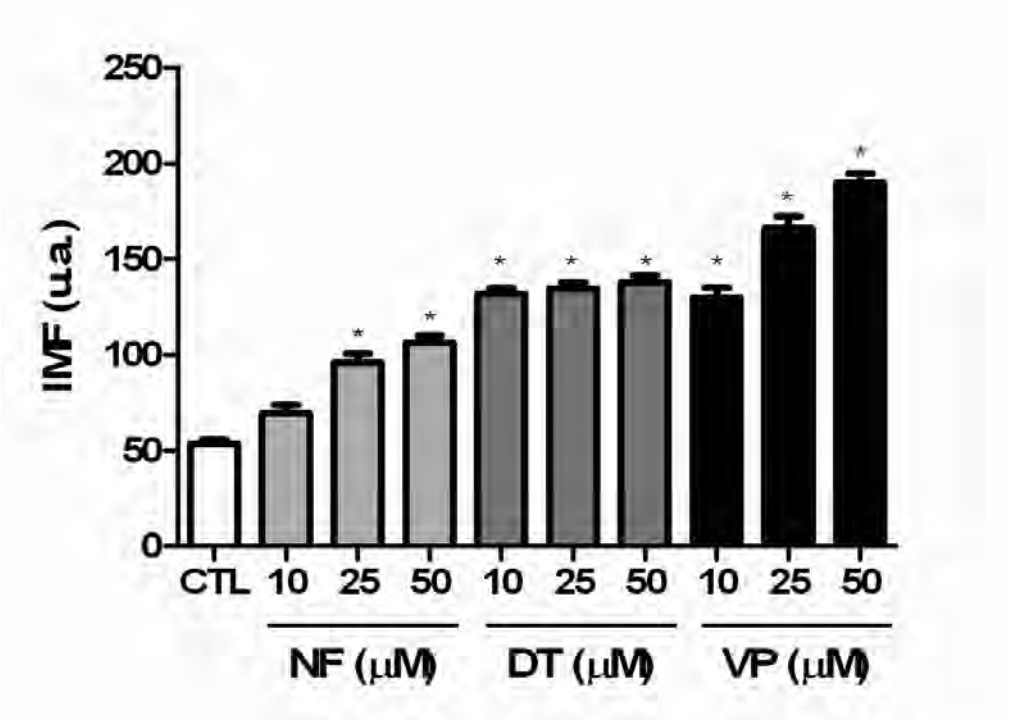

Gráfico 8: Efeito de bloqueadores de Ca_v no acúmulo intracelular de C-AM em embriões de 2-4 células. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. Em cada experimento foram analisados no mínimo 15 embriões. IMF = intensidade média de fluorescência. U.a. = unidades arbitrárias. CTL – controle. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

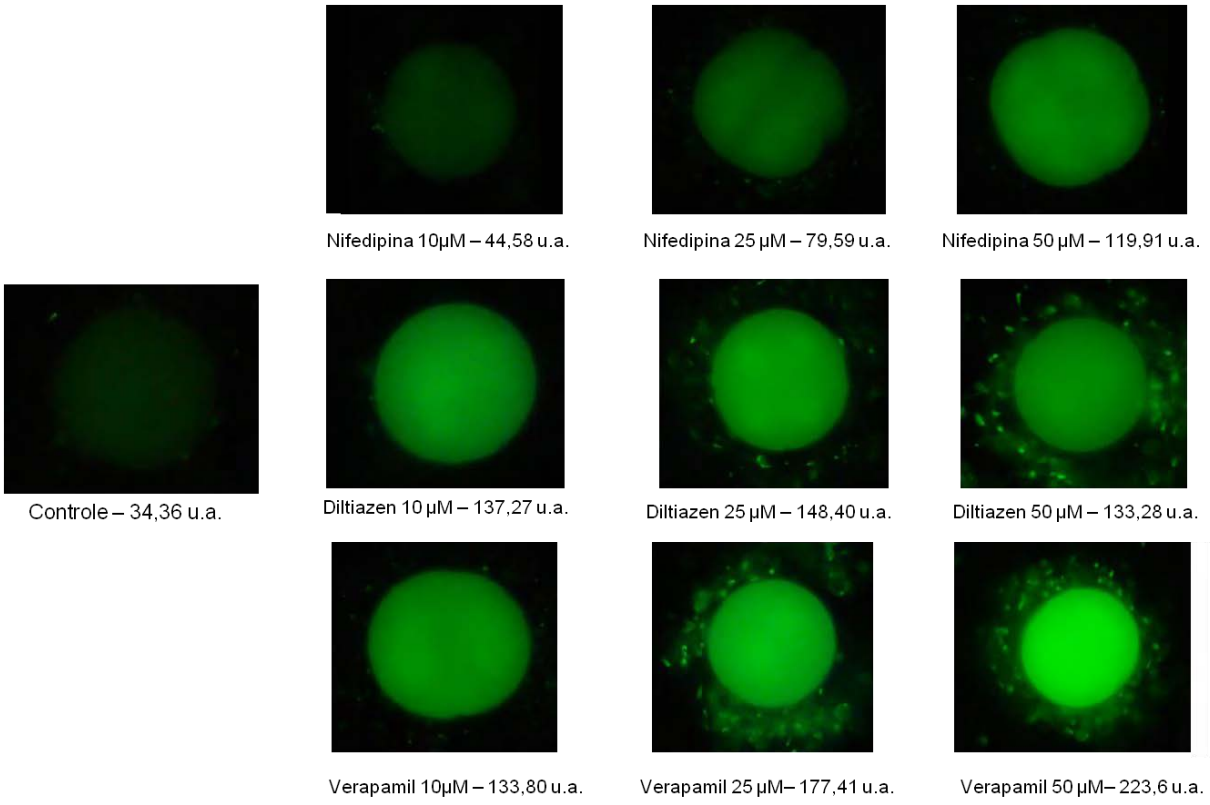

Figura 24: Fotomicrografias fluorescentes de embriões 2-4 células incubados com C-AM e tratados com diferentes concentrações de NF, VP e DT. Os valores apresentados correspondem à Intensidade Média de Fluorescência (IMF) de três experimentos realizados em triplicata e de forma independente e são expressos em unidades arbitrárias (u. a.). As imagem apresentam embriões representativos.

4.6 Efeito da Valinomicina na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* induzido pelo Verapamil

Nos ensaios subseqüentes utilizamos o VP como protótipo dos bloqueadores de Ca_v, tendo em vista que este composto, entre os bloqueadores de Ca_v, é o mais comumente utilizado nos estudos de biologia do desenvolvimento.

Assim, para avaliar se o efeito inibitório dos bloqueadores de Ca_v sobre o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter* foi causado pelo impedimento do influxo de Ca^{2+} através desses canais, foi investigada a ação da VL na inibição do desenvolvimento embrionário induzido pelo VP.

A VL é um ionóforo seletivo para K^+, capaz de transportar esse íon para o meio extracelular, alterando, assim, o potencial da membrana plasmática e consequentemente influenciando a abertura de alguns tipos de Ca_v, bem como a sua regulação farmacológica (BOITANO; OMOTO, 1991). A concentração de VP utilizada nestes ensaios foi a CE_{50} obtida no bloqueio da progressão para o estágio de segunda clivagem.

A VL, nas concentrações utilizadas (1 µM, 10 µM e 20 µM), não interferiu em nenhum estágio do desenvolvimento embrionário. O VP induziu um bloqueio de cerca de 41,0 $\pm$ 3,3% na progressão para a segunda clivagem, uma vez que cerca de 59,0% dos embriões realizaram a segunda divisão celular. O tratamento com VL, em todas as concentrações analisadas, diminuiu significativamente o percentual de inibição para 10,0 $\pm$ 2,7% (1 µM), 6,9 $\pm$ 1,6% (10 µM) e 5,6 $\pm$ 1,3% (20 µM). Tais percentuais são estatisticamente semelhantes ao grupo controle (não tratado com VP e nem com VL) (Gráfico 9A).

A VL também foi eficaz na reversão da inibição do VP sobre a progressão para o estágio de mórula. O percentual de inibição induzido pelo bloqueador de Ca_v para essa fase foi de 60,8 $\pm$ 3,9%. O tratamento com VL reduziu esse bloqueio para 13,8 $\pm$ 1,0% (1 µM), 10,4 $\pm$ 2,2% (10 µM) e 7,4 $\pm$ 0,8% (20 µM) (Gráfico 9B).

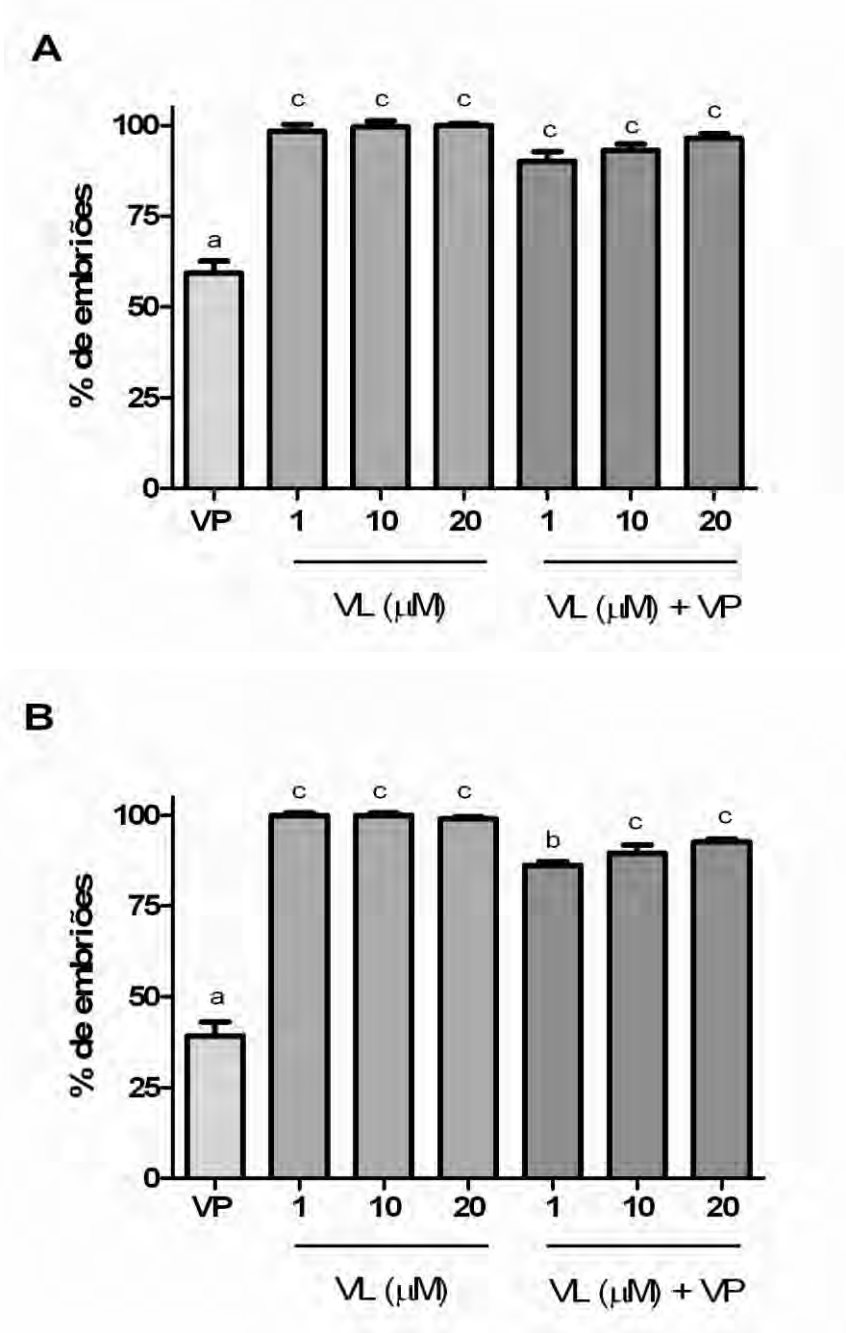

Gráfico 9: Efeito da VL na reversão do efeito inibitório do VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem **(A)** e para o estágio de mórula **(B)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a segunda clivagem **(A)** ou atingiram o estágio de mórula **(B)**. Os dados representam a média ± EPM de 4 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. VP – 113,5 µM. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%.[a] $p < 0,001$ em relação ao controle. [b] $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. [c] $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com VP.

A VL quando adicionada após o VP não reverteu a inibição induzida pelo bloqueador de Ca_v em nenhuma fase monitorada. O VP *per si* inibiu a progressão para a segunda clivagem em 49,9 ± 3,4%. Quando os embriões foram tratados com VP, e posteriormente com VL, observou-se uma inibição de 51 ± 2,5% (Gráfico 10A) na progressão para a segunda divisão celular. Da mesma forma, o VP *per si* bloqueou a progressão para o estágio de mórula em 77,3 ± 2,5%. A adição tardia de VL promoveu uma inibição de 79,6 ± 2,6% na progressão para o estágio de mórula (Gráfico 10B).

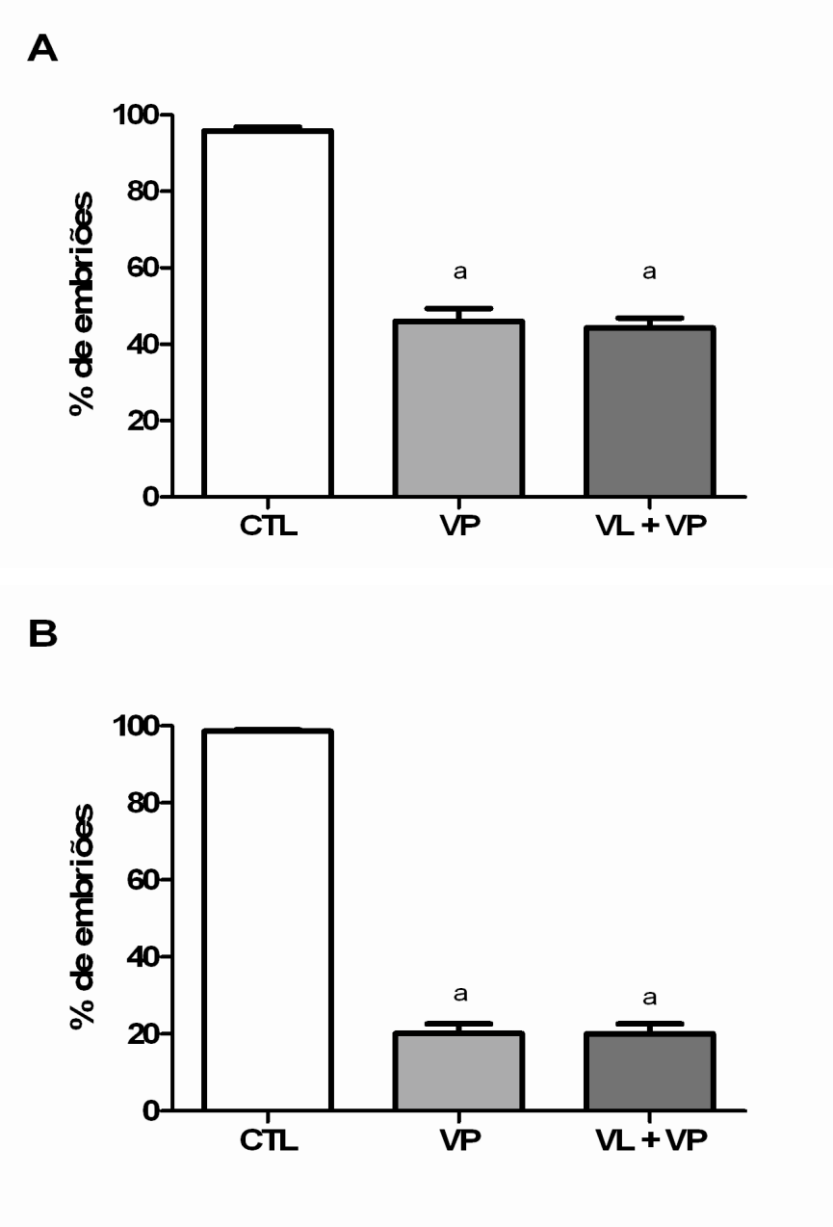

Gráfico 10: Efeito da adição tardia da VL na reversão do efeito inibitório do VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem **(A)** e para o estágio de mórula **(B)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a segunda clivagem **(A)** ou atingiram o estágio de mórula **(B)**. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. CTL – controle; VP – 113,5 µM; VL – 10,0 µM. [a] $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

4.7 Efeito da Nigericina na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* induzida pelo Verapamil

Para verificar se a eficácia do VL em impedir o efeito inibitório induzido pelo bloqueador de Ca_v foi devido à alteração no potencial de membrana ou à provável redução intracelular de íons K^+, foi avaliada a ação da NG na reversão do efeito inibitório do VP sobre o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*.

A NG é um ionóforo que promove a troca entre K^+ e H^+ através das biomembranas (DANIELE et al., 1978). Dessa forma, esse composto induz o efluxo de K^+ sem alterar o potencial de membrana, sendo, portanto, uma ferramenta ideal para essa investigação.

Nesse ensaio, os embriões foram tratados com diferentes concentrações do ionóforo, e em seguida foram submetidos ao bloqueador de Ca_v (CE_{50} da progressão para a segunda clivagem) e o desenvolvimento embrionário foi monitorado nas fases de segunda clivagem e estágio de mórula.

A NG apresentou um efeito inibitório próprio sobre o desenvolvimento embrionário em concentrações maiores que 250 nM (dados não mostrados), deste modo optou-se em utilizar esse ionóforo nas concentrações de 50 nM, 150 nM e 250 nM.

A NG não foi capaz de reverter a inibição induzida pelo VP em nenhum dos estágios monitorados e em nenhuma concentração analisada. Em todos os tratamentos, o percentual de inibição do grupo tratado apenas com o VP permaneceu estatisticamente igual ao percentual de inibição do grupo tratado com VP e NG (Gráfico 11).

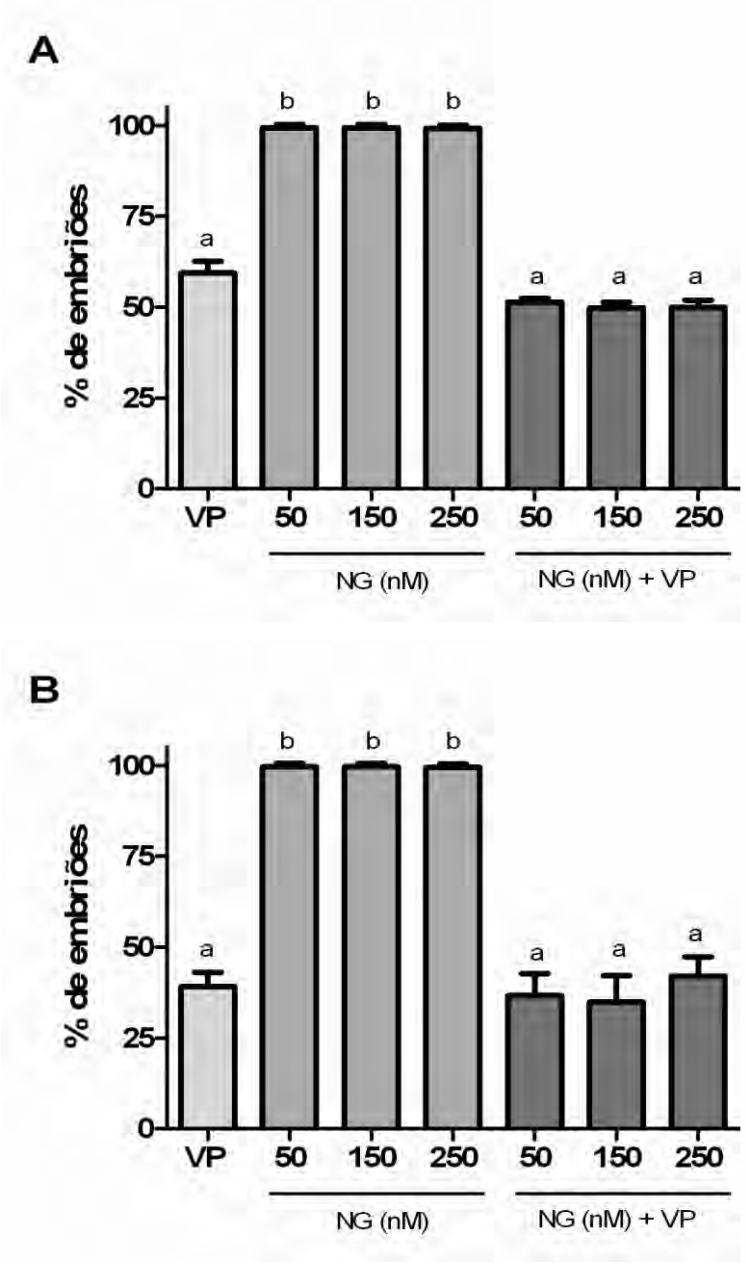

Gráfico 11: Efeito da NG na reversão do efeito inibitório do VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem **(A)** e para o estágio de mórula **(B)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a segunda clivagem **(A)** ou atingiram o estágio de mórula **(B)**. Os dados representam a média ± EPM de 4 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. VP – 113,5 µM. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. [a] $p < 0,001$ em relação ao controle. [b] $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com VP.

Foi realizado, adicionalmente, o protocolo de adição tardia do ionóforo (após o tratamento prévio dos embriões com o bloqueador de Ca_v), sendo o desenvolvimento embrionário monitorado nos estágios de segunda clivagem e de mórula. Nesse ensaio a NG também não foi capaz de reverter o bloqueio do desenvolvimento embrionário provocado pelo VP, tanto na progressão para o estágio de segunda clivagem quanto para o estágio de mórula. O percentual de inibição dos embriões tratados apenas com VP foi estatisticamente o mesmo dos embriões tratados com VP e NG (Gráfico 12).

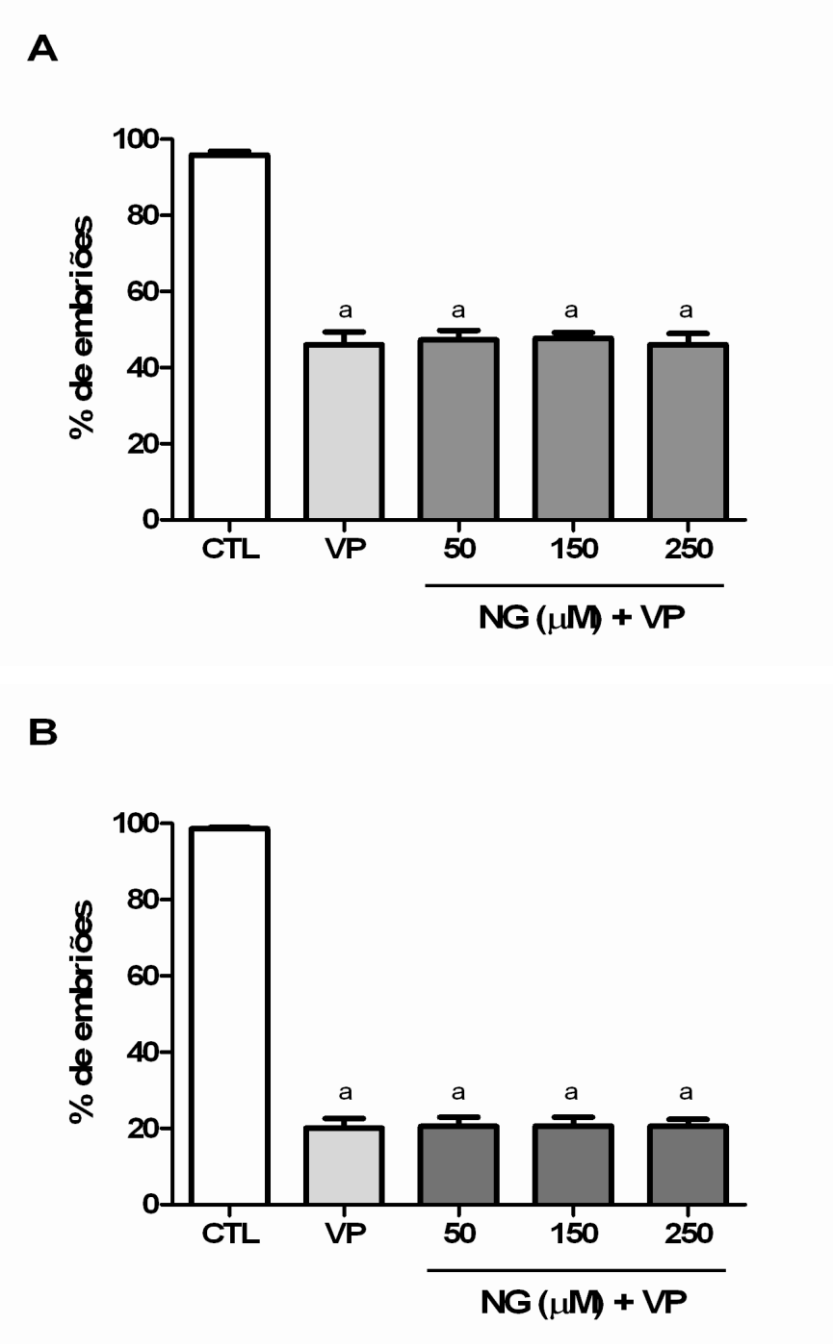

Gráfico 12: Efeito da adição tardia da NG na reversão do efeito inibitório do VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem **(A)** e para o estágio de mórula **(B)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a segunda clivagem **(A)** ou atingiram o estágio de mórula **(B)**. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. CTL – controle; VP – 113,5 µM. [a] $p < 0,001$ em relação ao controle.

4.8 Efeito da Ouabaína na inibição do desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter* induzido pelo Verapamil

Para nos certificarmos de que a mobilização de Ca^{2+} extracelular mediada pelos canais de cálcio operados por voltagem é fundamental para os estágios iniciais do desenvolvimento, utilizamos a ouabaína, um bloqueador da Na^{+}/K^{+} - ATPase. É relatado na literatura que o bloqueio desta proteína ativa, de forma indireta, o modo reverso do trocador Na^{+}/Ca^{2+}, induzindo, dessa forma, um influxo de Ca^{2+} na célula (NAMEKATA et al., 2009). Desta forma, estabelecemos protocolos experimentais que nos permitissem a investigação do efeito do influxo de Ca^{2+} extracelular na reversão do bloqueio do desenvolvimento embrionário induzido pelo VP.

Os embriões foram tratados com diferentes concentrações de OUA e em seguida foram submetidos ao bloqueador de Ca_v (CE_{50} da progressão para a segunda clivagem) e o desenvolvimento embrionário foi monitorado nas fases de segunda clivagem e estágio de mórula. As concentrações de OUA utilizadas no presente trabalho foram obtidas em estudos anteriores no nosso laboratório e não apresentaram nenhum efeito inibitório sobre o desenvolvimento embrionário (dados não mostrados).

A OUA reverteu o efeito inibitório do VP sobre a progressão para a segunda clivagem em todas as concentrações analisadas. O tratamento dos embriões com VP provocou uma inibição de 46,5 $\pm$ 1,7% sobre a segunda divisão celular. O pré-tratamento com OUA diminuiu essa inibição para 8,6 $\pm$ 2,1% (25 µM), 8,4 $\pm$ 2,0% (50 µM) e 6,9 $\pm$ 1,1% (75 µM), porém esses valores são significativamente diferentes em relação controle, onde o percentual de inibição foi 0% (Gráfico 13A).

O efeito bloqueador do VP sobre a progressão para o estágio de mórula também foi revertido pelo pré-tratamento com a OUA em todas as concentrações testadas. O VP *per si* induziu uma inibição de 74,4 $\pm$ 1,1%. Por outro lado, o tratamento prévio com OUA diminuiu esse valor para 20,6 $\pm$ 3,0% (25 µM), 16,2 $\pm$ 2,5% (50 µM) e 16,6 $\pm$ 2,6% (75 µM), sendo este resultado significativamente diferente em relação ao controle (Gráfico 13B).

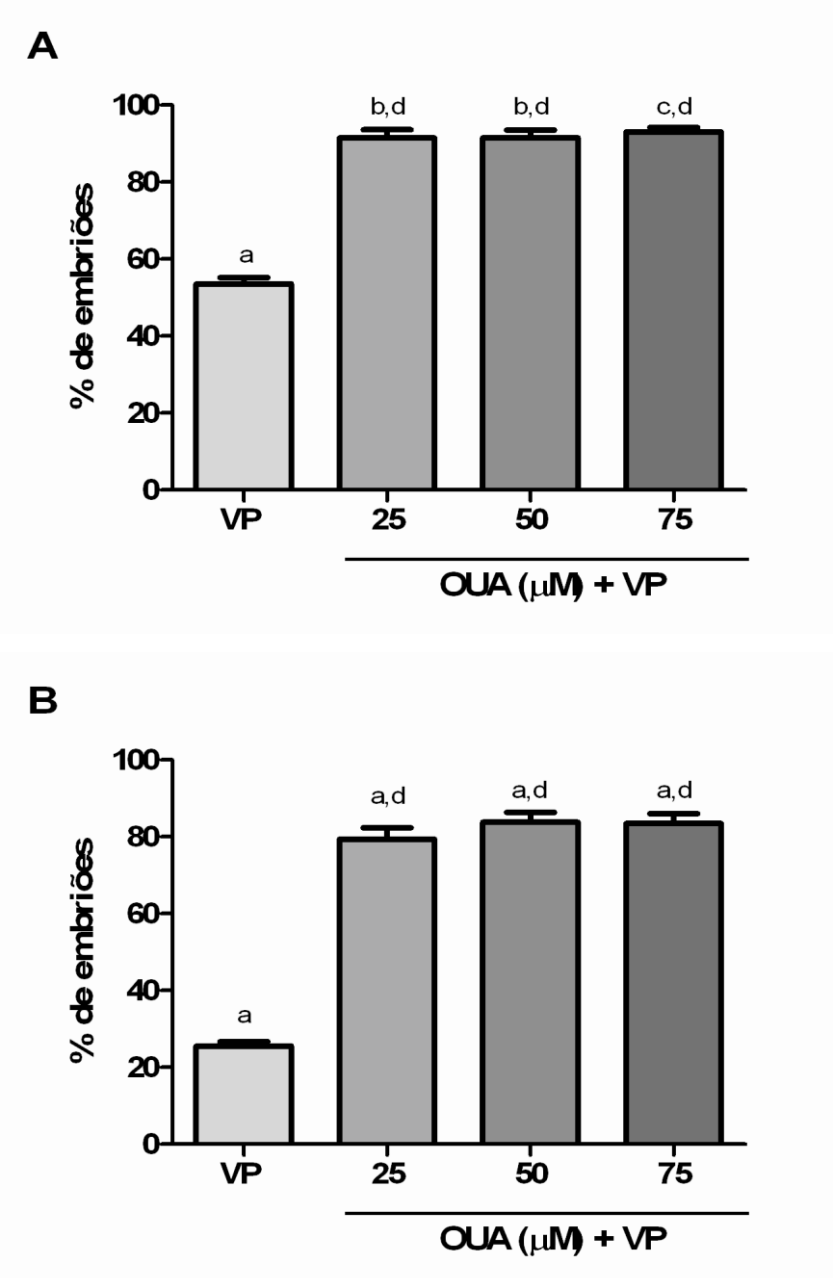

Gráfico 13: Efeito da OUA na reversão do efeito inibitório do VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem **(A)** e para o estágio de mórula **(B)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a segunda clivagem **(A)** ou atingiram o estágio de mórula **(B)**. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. VP – 113,5 µM. [a] $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. [b] $p < 0,01$ em relação ao grupo controle. [c] $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. [d] $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com VP.

Foi realizado, também, o protocolo de adição da OUA posteriormente ao tratamento prévio dos embriões com o bloqueador de Ca_v.

A OUA, da mesma forma que a VL e a NG, não reverteu o bloqueio do desenvolvimento embrionário provocado pelo VP quando adicionada previamente ao bloqueador. Tanto para o estágio de segunda clivagem como o de mórula, o percentual de inibição dos embriões tratados apenas com VP foi estatisticamente o mesmo dos embriões tratados com VP e OUA (Gráfico 14).

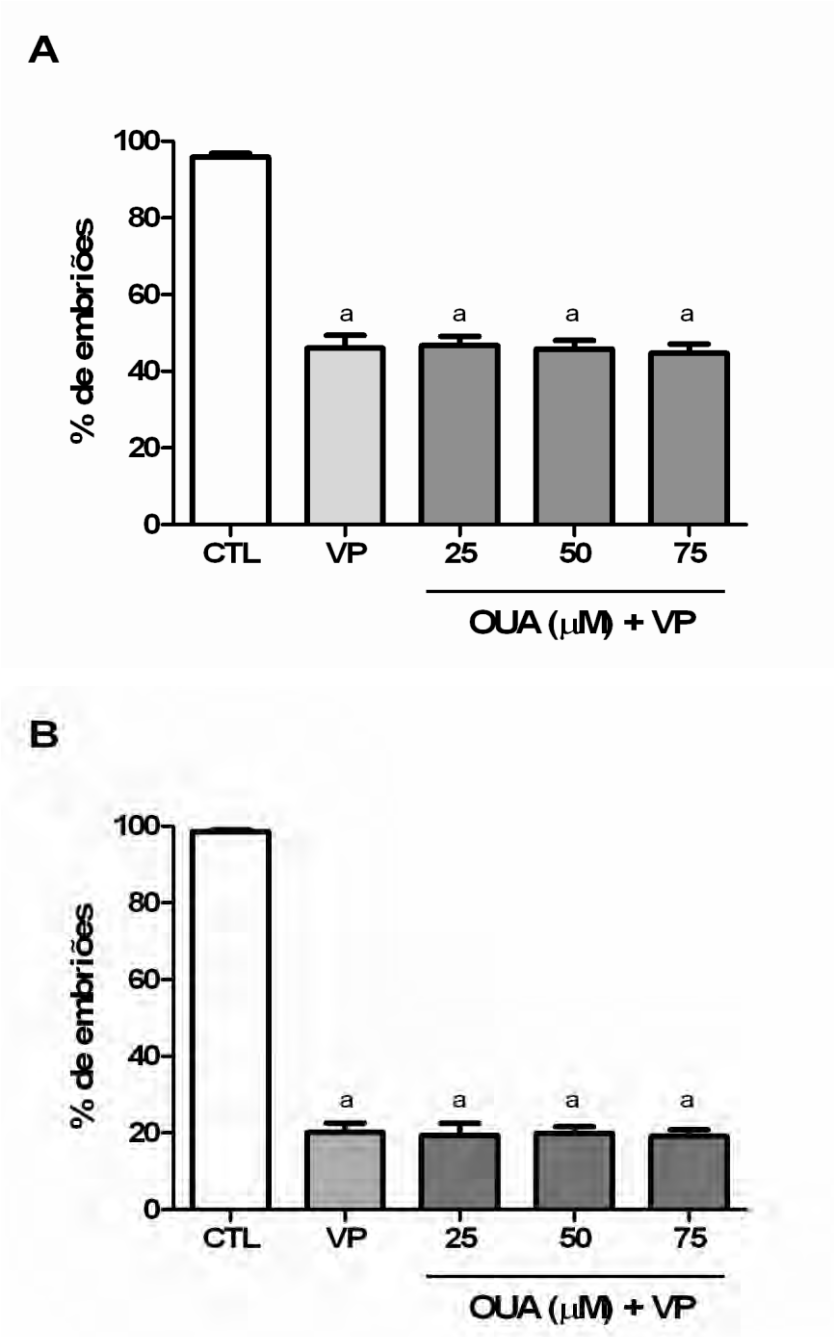

Gráfico 14: Efeito da adição tardia de OUA na reversão do efeito inibitório do VP sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem **(A)** e para o estágio de mórula **(B)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a segunda clivagem **(A)** ou atingiram o estágio de mórula **(B)**. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. VP – 113,5 μM. [a] $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

4.9 Efeito do VP em diferentes intervalos de adição no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Uma vez tendo determinado que o influxo de Ca^{2+} pelos canais operados por voltagem é essencial e indispensável para o desenvolvimento embrionário inicial de *E. lucunter*, foi avaliado se esse processo é determinado temporalmente e em que momento da embriogênese o mesmo ocorre.

O VP foi utilizado como protótipo dos bloqueadores de Ca_v e a concentração (113,5 µM) utilizada foi aquela referente a CE_{50} para o estágio de segunda clivagem. O bloqueador foi adicionado aos embriões em diferentes intervalos de tempo após a fertilização - desde 0,5 a 80 minutos - e o desenvolvimento embrionário foi monitorado nos estágios de primeira clivagem, segunda clivagem e mórula.

O VP inibiu a primeira divisão celular quando adicionado aos embriões de 0,5 a 2,5 minutos após a fertilização. Nesses tratamentos a percentagem de embriões que atingiram o estágio de primeira clivagem foi de 73,0 $\pm$ 3,8% (0,5 minutos), 82,0 $\pm$ 3,1% (1 minuto), 90,5 $\pm$ 1,2% (2,5 minutos), em relação ao controle, representando uma inibição aproximada de 27, 18, e 9,5%, respectivamente (Gráfico 15A). É importante salientar que a concentração de VP utilizada (113,5 µM) não apresentou nenhum efeito inibitório sobre a primeira clivagem nos ensaios preliminares (Gráfico 6).

O VP bloqueou a progressão para a segunda clivagem de forma bastante acentuada e dependente de tempo. As percentagens de embriões que realizaram a segunda divisão celular foram de 8,0 $\pm$ 0,9% (0,5 minutos), 17,0 $\pm$ 0,9% (1 minuto), 23,3 $\pm$ 1,4% (2,5 minutos), 32,5 $\pm$ 2,0% (5 minutos), 45,2 $\pm$ 1,8% (10 minutos), 43,2 $\pm$ 0,6% (20 minutos) e 74,4 $\pm$ 3,4 (30 minutos), em relação ao controle, o que equivale a uma inibição de cerca de 90, 83, 76,7, 67,5, 54,8, 56,8 e 25,2%, respectivamente. O VP não apresentou efeito inibitório sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem quando adicionado aos embriões 40 minutos após a fertilização (Gráfico 15B).

O bloqueio da progressão para o estágio de mórula também foi inibido de forma dependente do tempo, porém de maneira ainda mais acentuada. As percentagens de inibição induzidas por esse composto foram aproximadamente 100% (0,5 minutos), 97,7% (1 minuto), 95,9% (2,5 minutos), 94,3% (5 minutos),

90,9% (10 minutos), 85,3% (20 minutos), 82,2 (30 minutos) e 70,4% (40 minutos). O VP não apresentou efeito inibitório sobre a progressão para o estágio de mórula quando foi adicionado aos embriões 50 minutos após a fertilização (Gráfico 15C).

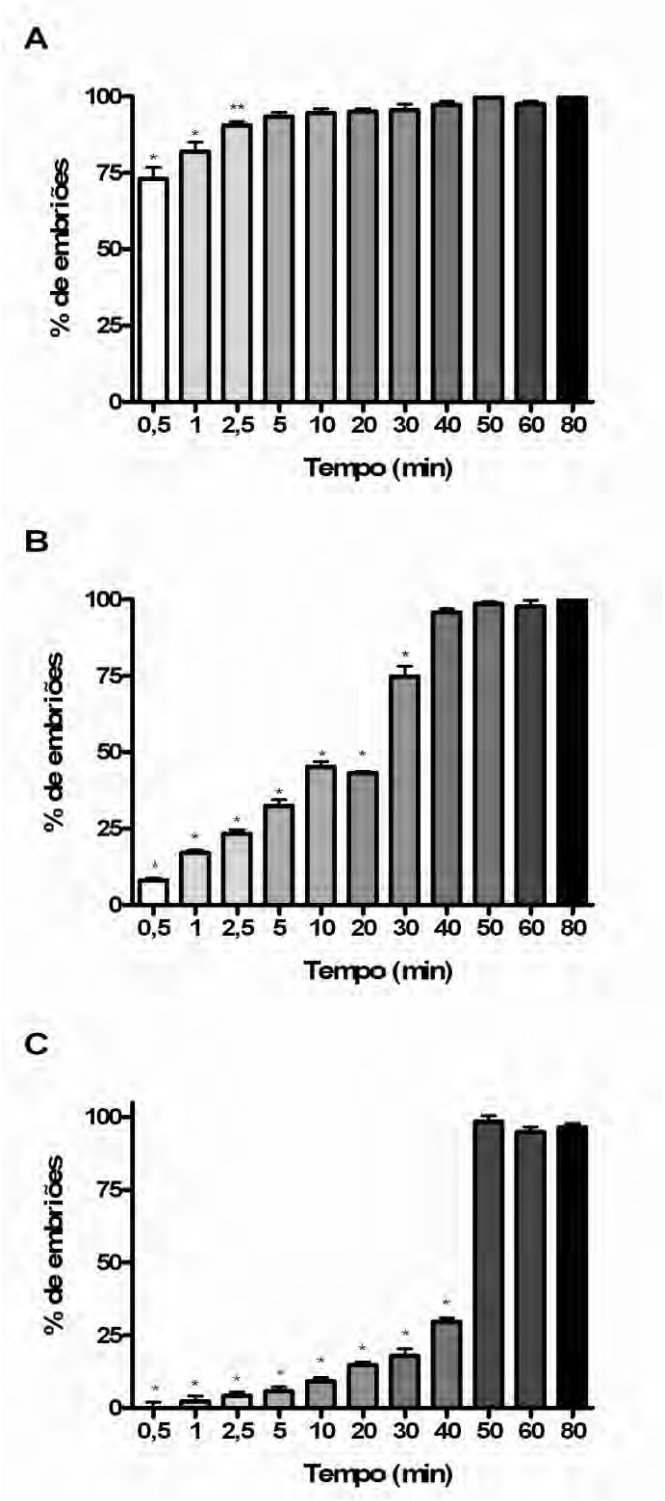

Gráfico 15: Efeito tempo-dependente do bloqueio da progressão para o estágio de primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** e mórula **(C)** induzido pelo VP. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** ou atingiram o estágio de mórula **(C)**. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. VP – 113,5 µM. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. ** $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.10 Efeito da Reversina 205 (REV) em associação com o VP no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Tendo em vista que a atividade funcional máxima de proteínas da família ABC em embriões de ouriços-do-mar é atingida somente 25 minutos após a fertilização (DE SOUZA et al., 2010), e uma vez que o VP é um substrato de proteínas desta família, foi realizado um ensaio para investigar se o efeito do VP nos primeiros minutos após a fertilização foi devido à ausência da atividade dessas proteínas no zigoto recém formado.

Esse ensaio consistiu no tratamento associando VP e REV, um conhecido bloqueador da proteína ABCB1, nos tempos onde o VP não foi suficientemente efetivo em inibir a embriogênese de *E. lucunter*.

Os embriões foram tratados previamente com REV e posteriormente com VP em tempos específicos. Embriões tratados apenas com VP foram utilizados como controle e o desenvolvimento foi acompanhado no estágio de segunda clivagem.

A REV (5 µM) não apresentou efeito inibitório sobre o desenvolvimento embrionário. O tratamento prévio dos embriões com esse bloqueador de proteínas ABC não alterou significativamente o perfil inibitório provocado pelo VP (Gráfico 16).

O VP, quando adicionado 20 minutos após a fertilização, induziu uma inibição de 54,7% na progressão para a segunda clivagem. Em embriões previamente tratados com REV, a inibição provocada pelo bloqueador de Ca_v foi de 56,2%. Da mesma forma, quando o VP foi adicionado 30 minutos após a fertilização, a inibição foi de 38%, a qual foi estatisticamente semelhante ao 35,8% de bloqueio induzido nos embriões tratados previamente com o bloqueador de ABCB1.

Quando adicionado nos tempos de 40 a 80 minutos, o VP não inibiu, de forma significativa, a segunda divisão celular. O mesmo efeito foi observado nos embriões previamente tratados com REV e submetidos às mesmas condições.

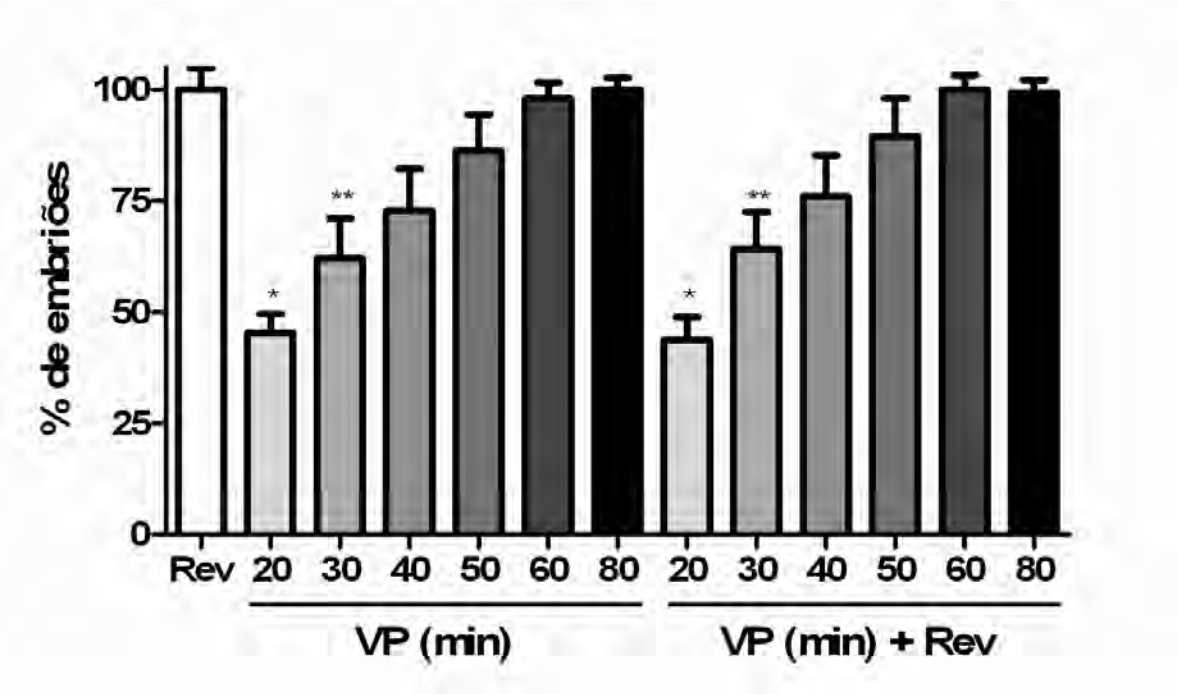

Gráfico 16: Efeito da associação entre REV e VP na progressão para o estágio de segunda clivagem. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que atingiram o estágio de segunda clivagem. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. VP - 113,5 µM; REV - 5 µM. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. ** $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.11 Efeito do EGTA em diferentes intervalos de adição no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Para investigar a dependência do Ca^{2+} extracelular nos primeiros momentos após a fertilização, os embriões recém fertilizados foram submetidos ao tratamento com um quelante de Ca^{2+} (EGTA), adicionado em diferentes intervalos de tempo. A concentração do EGTA utilizada corresponde à CE_{50} referente à inibição da progressão para a primeira clivagem (341,9 µM). O desenvolvimento embrionário foi monitorado durante a primeira e segunda clivagem.

O EGTA foi bastante efetivo no bloqueio da primeira divisão celular, principalmente quando adicionado nos primeiros minutos após a fertilização. Nesses tratamentos, a percentagem de embriões que realizaram a primeira clivagem foi de 0,0 $\pm$ 0,0% (0,5 minutos), 0,0 $\pm$ 0,0% (1 minuto), 3,4 $\pm$ 0,8% (2,5 minutos), 16,7 $\pm$ 3,0% (5 minutos), 52,2 $\pm$ 1,3% (10 minutos), 64,7 $\pm$ 2,1% (20 minutos), 70,0 $\pm$ 1,5 (30 minutos) e 82,7 $\pm$ 1,0% (40 minutos), em relação ao controle, representando uma inibição aproximada de 100, 100, 96,6, 83,3, 47,8, 35,3, 30,0 e 17,3%, respectivamente (Gráfico 17A). Esse resultado repetiu o padrão de inibição tempo-dependente induzido pelo VP, porém de forma mais intensa que o bloqueador de Ca_v.

Na progressão para a segunda clivagem, o EGTA também inibiu a segunda divisão celular quando adicionado nos tempos de 0,5 a 40 minutos, exibindo um percentual de inibição de aproximadamente 99,6% (0,5 minutos), 99,8% (1 minuto), 94,9% (2,5 minutos), 82,2% (5 minutos), 50,2% (10 minutos), 32,8% (20 minutos), 26,3 (30 minutos) e 13,8% (40 minutos) (Gráfico 17B).

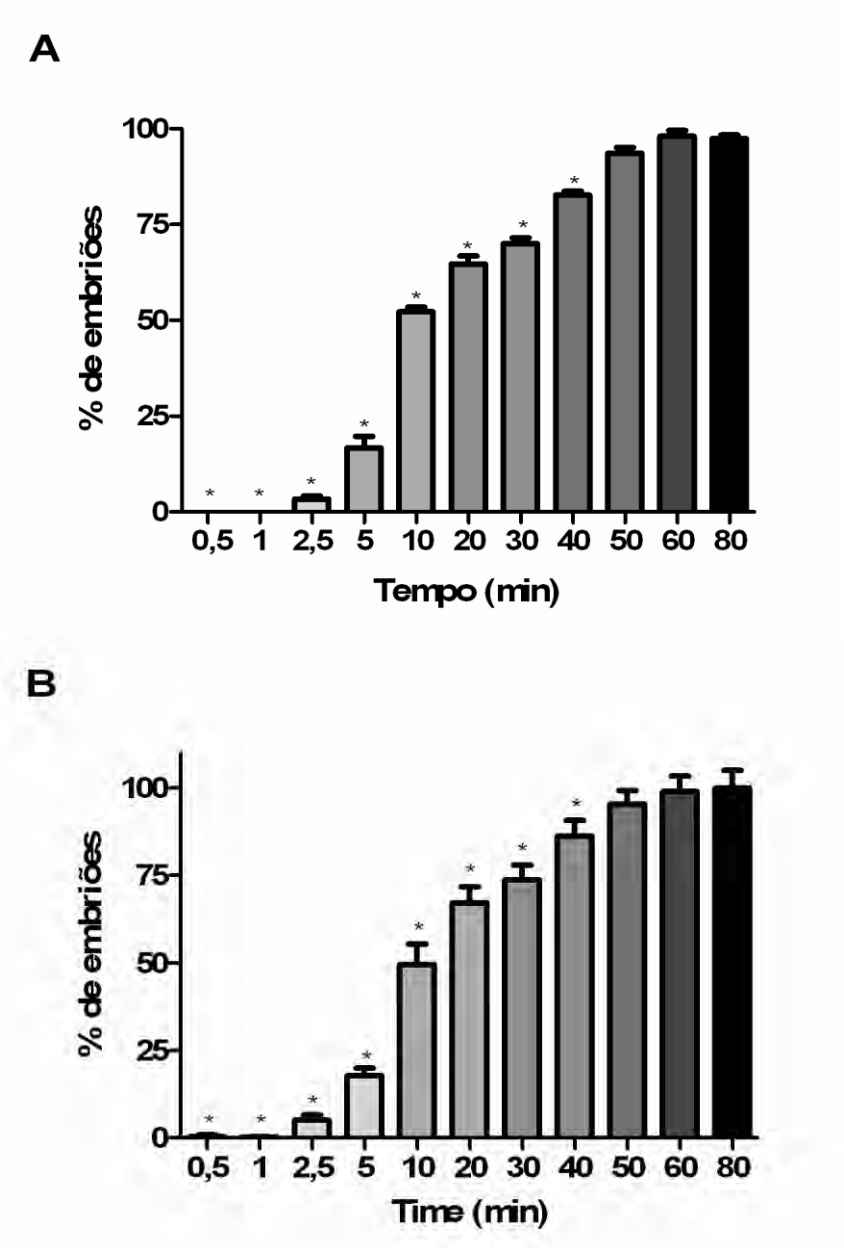

Gráfico 17: Efeito do EGTA na progressão para o estágio de primeira clivagem **(A)** e segunda clivagem **(B)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a primeira **(A)** ou segunda clivagem **(B)**. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. EGTA - 342,4 µM. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

4.12 Efeito do BAPTA-AM no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

A utilização de um quelante intracelular de Ca^{2+} teve por objetivo investigar o envolvimento deste íon como segundo mensageiro intracelular durante os estágios iniciais da embriogênese do *E. lucunter*.

Para a realização desse ensaio foi utilizado o quelante intracelular de Ca^{2+}, BAPTA-AM, que é uma forma permeável à membrana do 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético (BAPTA). A concentração de BAPTA-AM empregada para esse experimento foi de 10 µM, que é a concentração comumente utilizada em diversos tipos celulares. A adição do quelante foi realizada 50 minutos após a fertilização.

O BAPTA-AM foi bastante eficaz no bloqueio da progressão para a primeira clivagem. Enquanto o percentual de desenvolvimento do grupo controle foi 91,2 $\pm$ 1,2%, a percentagem de embriões tratados com o quelante de Ca^{2+} que realizou a primeira clivagem foi de 22,6 $\pm$ 3,0% (Gráfico 18A).

O efeito do BAPTA-AM foi mais acentuado sobre a progressão para a segunda clivagem. A percentagem de embriões que passaram por esse estágio foi de 81,4 $\pm$ 2,7% para o controle e 9,7 $\pm$ 1,6 para o tratamento com o BAPTA-AM, representando uma inibição aproximada de 71,7% (Gráfico 18B).

Esse composto também foi eficaz no bloqueio da progressão para o estágio de mórula, onde induziu uma inibição de aproximadamente 89,4% em relação ao controle (Gráfico 18C).

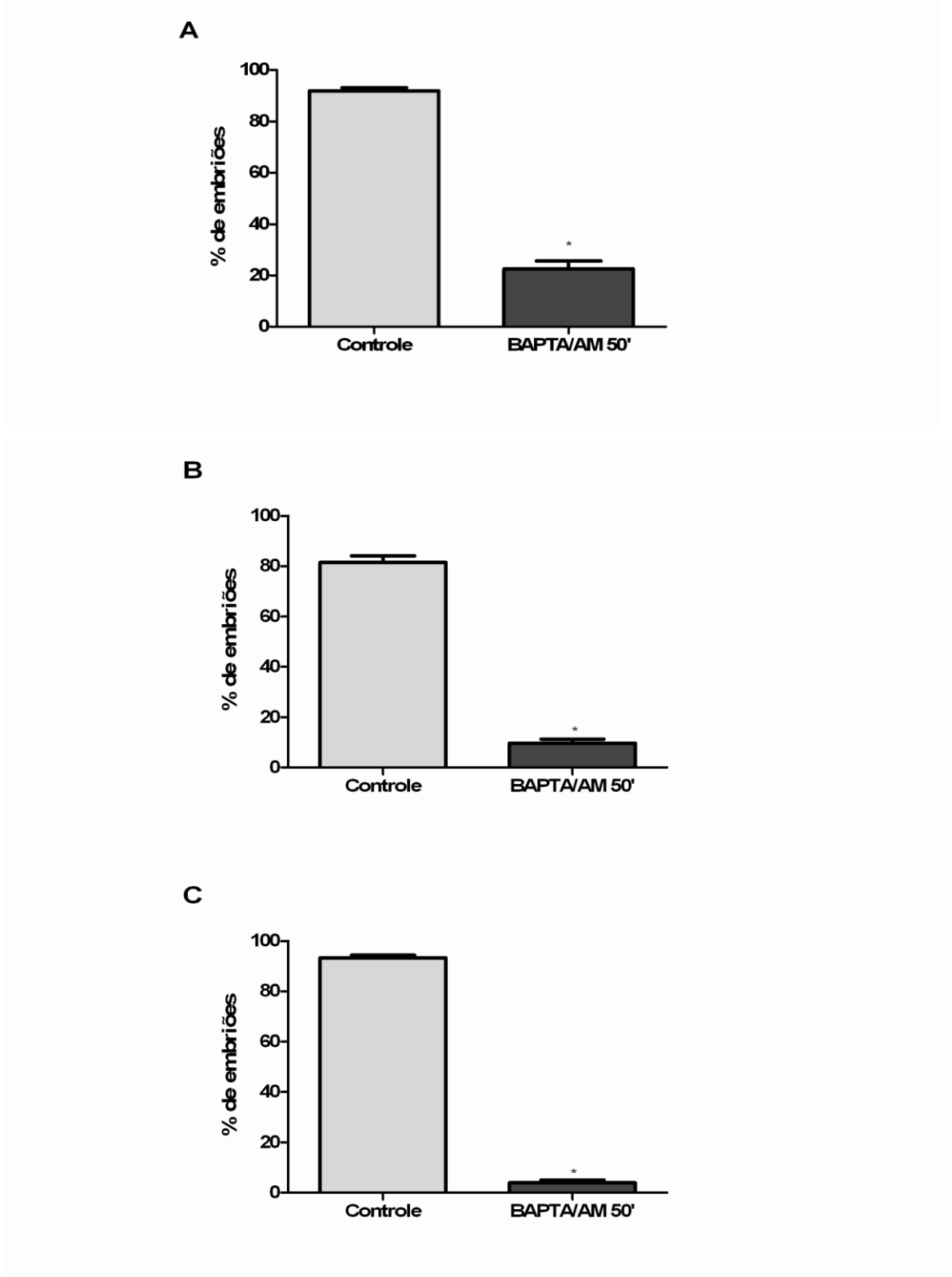

Gráfico 18: Efeito do BAPTA-AM na progressão para o estágio de primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** e mórula **(C)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** ou atingiram o estágio de mórula **(C)**. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 4 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. BAPTA-AM - 10 µM * $p < 0,001$ em relação ao controle.

4.13 Efeito de bloqueadores do complexo Ca^{2+}- Calmodulina no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Dois bloqueadores do complexo Ca^{2+}-Calmodulina, da classe das fenotiazinas, a trifluoperazina (TFP) e a clorpromazina (CPZ), também foram utilizados para investigar a participação do Ca^{2+} intracelular na embriogênese inicial de *E. lucunter*.

As concentrações utilizadas nesses ensaios correspondem à CE_{50} referente ao bloqueio da progressão para o estágio de segunda clivagem (TFP - 70 µM; CPZ - 35 µM) obtidos em estudos anteriores no nosso laboratório (dados não mostrados). Os bloqueadores do complexo Ca^{2+}-Clamodulina foram adicionados à cultura de embriões 50 minutos após a fertilização.

Ambos compostos foram eficazes no bloqueio da progressão para a primeira clivagem. A percentagem de embriões que realizaram a primeira clivagem foi de 42,4 $\pm$ 4,1% para o tratamento com a TFP e 53,4 $\pm$ 3,1% para a CPZ, representando uma inibição de cerca de 57,6% e 46,6%, respectivamente (Gráfico 19A).

O efeito dos bloqueadores do complexo Ca^{2+}-Calmodulina foi ainda mais acentuado sobre a progressão para a segunda clivagem. A percentagem de embriões que passaram por esse estágio foi de 22,2 $\pm$ 2,0% para a TFP e 30,7 $\pm$ 1,4% para a CPZ, em relação ao controle, o que equivale a uma inibição aproximada de 77,8% e 69,3%, respectivamente (Gráfico 19B).

Esses compostos também foram eficazes no bloqueio da progressão para o estágio de mórula, onde induziram uma inibição de aproximadamente de 79,9% (TFP) e 72,3% (CPZ) (Gráfico 19C).

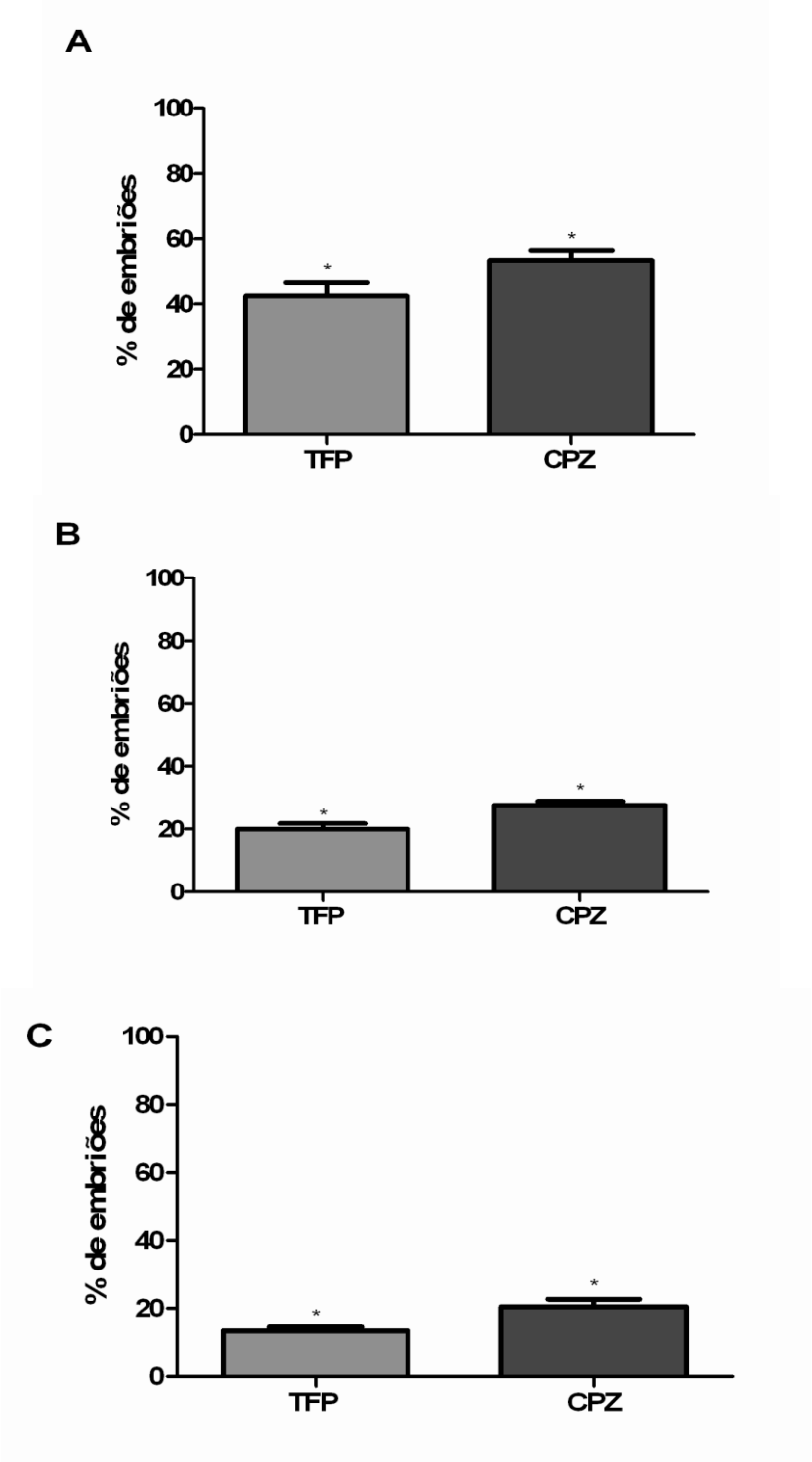

Gráfico 19: Efeito da TFP e da CPZ na progressão para os estágios de primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** e mórula **(C)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** ou atingiram o estágio de mórula **(C)**. Os dados representam a média ± EPM de 4 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. TFP - 70 µM; CPZ -35 µM. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. * $p < 0{,}001$ em relação ao grupo controle.

4.14 Efeito da Ionomicina na ativação de óvulos de *Echinometra lucunter*

Para investigar se o Ca^{2+} armazenado nos estoques intracelulares dos óvulos de *E. lucunter* é suficiente para induzir a ativação dos mesmos, os gametas femininos foram tratados com diversas concentrações de IONO, um ionóforo seletivo para o Ca^{2+}, na presença (ASW) ou ausência de Ca^{2+} extracelular (ASW Ca^{2+} *free*).

A elevação do envelope de fertilização, a principal feição morfológica de um óvulo ativado, foi monitorada por microscopia óptica comum. Os resultados desse ensaio estão apresentados na tabela 7:

Tabela 7: Efeito da IONO na ativação dos óvulos de *E. lucunter* na presença (ASW) ou ausência de Ca^{2+} extracelular (ASW Ca^{2+} *free*). Os dados representam uma avaliação qualitativa de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Os resultados correspondem à observação de mais de 50% de óvulos em cada tratamento. ✓- Elevação do envelope de fertilização. ✗ - Sem elevação do envelope de fertilização. Ø - Morte celular.

IONO	ASW		ASW Ca^{2+} *free*	
	1 minuto	5 minutos	1 minuto	5 minutos
Controle	✗	✗	✗	✗
0,05 µM	✗	✗	✗	✗
0,1 µM	✗	✗	✗	✗
1 µM	✓	✓	✗	✗
5 µM	✓	Ø	✓	✓
10 µM	✓	Ø	✓	✓
25 µM	✓	Ø	✓	Ø

A IONO foi induziu a elevação do envelope de fertilização, na presença ou na ausência de Ca^{2+} extracelular. Na presença de Ca^{2+} extracelular, a IONO promoveu a ativação dos óvulos em concentrações superiores a 1 µM, nos dois momentos analisados. Concentrações acima de 5 µM induziram morte celular no período de 5 minutos de tratamento. Já em meio ausente de Ca^{2+}, a elevação do envelope de fertilização só foi observada em concentrações 5 vezes maiores. A morte celular, nesse meio, também só foi observada em concentrações 5 vezes maiores e 5 minutos após a exposição ao ionóforo. Concentrações de IONO acima de 25 µM induziram morte celular em todos os meios e períodos analisados.

4.15 Análise comparativa entre o espaço perivitelínico de duas espécies de Ouriços-do-mar

Foi realizada uma análise morfológica comparativa entre o espaço perivitelínico de *Strongilocentrotus purpuratus*, uma espécie de ouriço-do-mar onde o influxo de Ca^{2+} não é determinante para a fertilização e o desenvolvimento embrionário, e a de *Echinometra lucunter.* As fotomicrografias utilizadas para essa comparação são mostradas na figura 25.

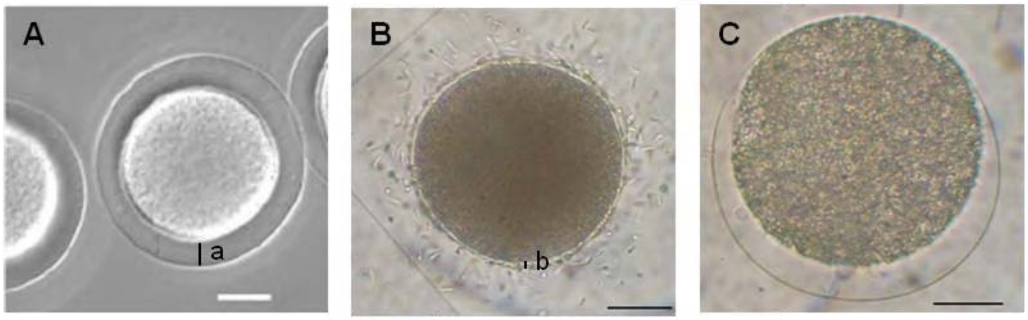

Figura 25: Análise comparativa entre o espaço perivitelínico de óvulos fertilizados de *Strongilocentrotus purpuratus* (A) (VOGEL et al., 1999) e óvulos de *Echinometra lucunter* fertilizados (B) ou tratados com IONO em ASW (C). As barras horizontais representam uma escala de 30 µm. a e b representam a distância entre a membrana plasmática do zigoto e o envelope de fertilização (espaço perivitelínico). B e C – imagem de óvulos representativos de *E. lucunter*. *a* = 12,3 µM; *b* = 3,5 µM. IONO - 10 µM.

O espaço perivitelínico dos óvulos de *S. purpuratus* fertilizados, e observado no trabalho de Vogel e colaboradores (1999), mostrou-se bem maior que o espaço perivitelínico de óvulos fertilizados de *E. lucunter*. Enquanto que em *S. purpuratus* a distância entre a membrana plasmática do zigoto e o envelope de fertilização (espaço perivitelínico) tem um tamanho de aproximadamente 12,5 µM (Figura 25 A – traço a), em *E. lucunter* a distância entre estas estruturas é cerca de 3,5 µM (Figura 25 B – traço b). Óvulos de *E. lucunter* tratados com IONO (10 µM) na presença de Ca^{2+} extracelular apresentaram um maior espaço perivitelínico quando comparado com o espaço perivitelínico produzido pelo contato com os espermatozóides.

4.16 Efeito da Rotundifolona no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*

Os resultados do presente trabalho apontam para um papel fundamental e imprescindível do influxo de Ca^{2+} pelos canais operados por voltagem no desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*. Assim, propomos o desenvolvimento embrionário inicial de *E. lucunter* como um modelo experimental para prospecção de compostos que interferem na homeostase do Ca^{2+}. Desta forma, foi avaliado o efeito de um produto de origem natural, com atividade vaso-relaxante, na embriogênese inicial desse animal a fim de corroborar o presente modelo experimental como um modelo prospectivo para a descoberta de novos fármacos.

Para a realização deste ensaio foi selecionado o monoterpeno Rotundifolona (ROT), um constituinte da *Mentha x villosa*, que apresentou atividade vaso relaxante em anéis aórticos isolados de rato. Esse efeito tem sido atribuído ao bloqueio do influxo de Ca^{2+} pelos Ca_v (GUEDES et al., 2004).

A ROT bloqueou a progressão para o estágio de primeira clivagem somente nas concentrações mais elevadas. Nesses tratamentos, a percentagem de embriões que realizaram a primeira clivagem foi de 85,6 $\pm$ 1,9% (4 mM) e 75,5 $\pm$ 1,8% (5 mM) em comparação ao controle, representando uma inibição de aproximadamente 14,4 e 24,5% (Gráfico 20A).

O efeito da ROT foi mais evidente no bloqueio da segunda divisão celular, e nas concentrações de 3 mM, 4 mM e 5 mM, apresentando percentual de inibição aproximado de 17,1, 26,8 e 58,7%, respectivamente (Gráfico 20B).

A ROT apresentou sua maior eficácia no bloqueio da progressão para o estágio de mórula, inibindo esse estágio de forma bastante acentuada a partir da concentração de 1 mM. Nesses tratamentos, a percentagem de embriões que estavam nessa fase foi de 59,7 $\pm$ 2,0% (1 mM), 39,6 $\pm$ 1,1% (2 mM), 26,8 $\pm$ 1,2% (3 mM), 2,2 $\pm$ 0,7 (4 mM) e 0,0 $\pm$ 0,0 (5 mM), em relação ao controle, o que equivale a uma inibição de cerca de 40,3, 60,4, 73,2, 97,8 e 100%, respectivamente (Gráfico 20C).

O Cremofor (veículo) não apresentou efeito inibitório sobre o desenvolvimento embrionário em nenhum dos estágios monitorados.

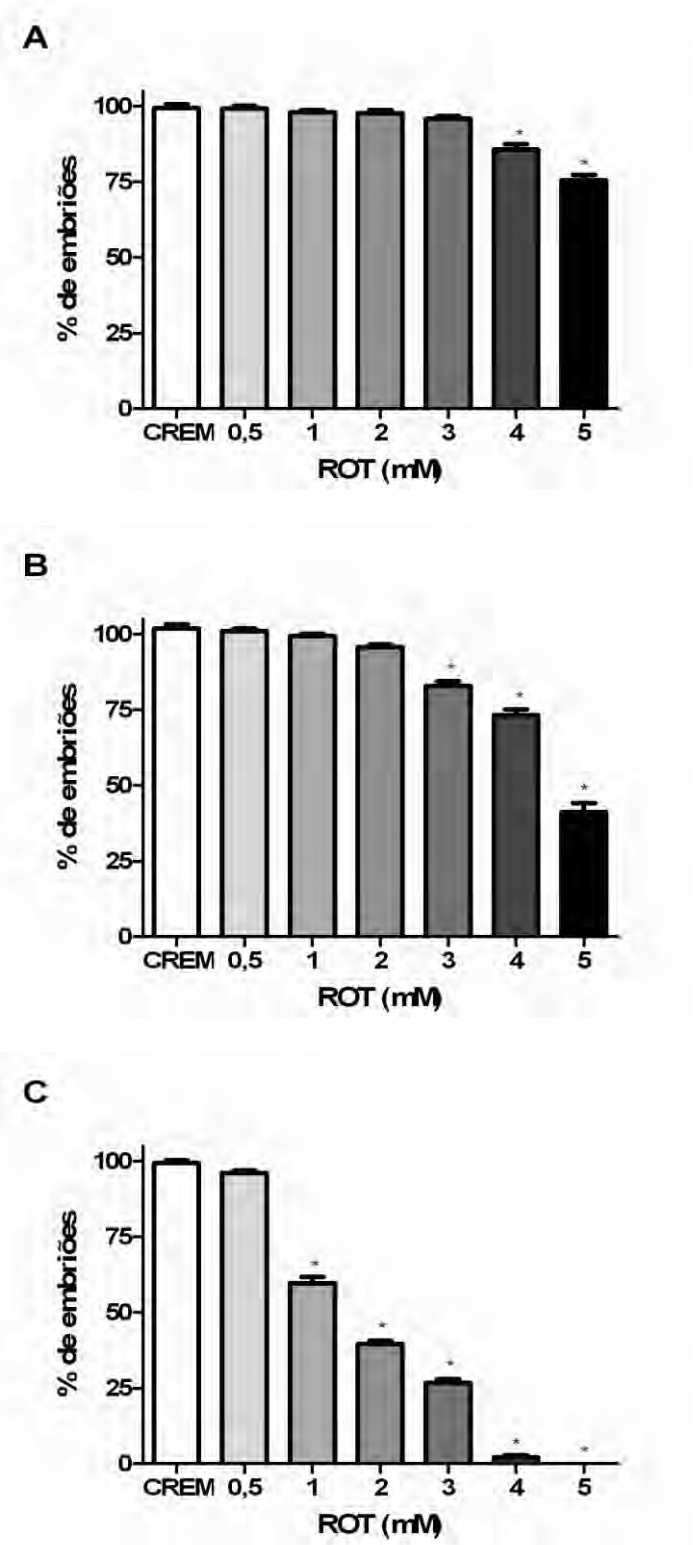

Gráfico 20: Efeito da ROT na progressão para o estágio de primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** e mórula **(C)**. O percentual de embriões corresponde à população de embriões que realizaram a primeira clivagem **(A)**, segunda clivagem **(B)** ou atingiram o estágio de mórula **(C)**. Os dados representam a média ± EPM de 4 experimentos realizados em Triplicata de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. CREM – Cremofor.

Discussão

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho são apresentadas evidências farmacológicas que sugerem fortemente a dependência do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v para a fertilização e para o desenvolvimento embrionário inicial de *Echinometra lucunter*, um ouriço-do-mar de ampla distribuição e ocorrência na costa brasileira.

Inicialmente, foi avaliado o envolvimento do Ca^{2+} extracelular para a fertilização de *E. lucunter* através da incubação dos óvulos e espermatozóides em um meio nominalmente sem Ca^{2+} (Gráfico 1). Esses experimentos demonstraram que o Ca^{2+} extracelular foi um fator determinante para a fertilização dessa espécie de ouriço-do-mar, uma vez que menos de 5 % dos óvulos foram fertilizados na nominal ausência de Ca^{2+} extracelular. Quando os gametas foram incubados em um meio com 100 μM de Ca^{2+} extracelular, aproximadamente 40% dos óvulos foram fertilizados, demonstrando que uma pequena concentração de Ca^{2+} é suficiente para promover os eventos da fertilização. Esse resultado é corroborado por Takahashi e Sugiyama (2002) ao estudar cinco espécies de ouriços-do-mar: *Pseudocentrotus depressus*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Toxopneustes pileolus*, *Tripneustes gratilla* e *Echinometra mathaei*. Esse pesquisador sugeriu que o bloqueio da fertilização sob essas condições pode ser explicado pela inibição da reação acrossômica, o que impede a entrada do espermatozóide no óvulo. O conjunto desses resultados mostra que a dependência do Ca^{2+} extracelular para a fertilização é um fenômeno comum a todas as espécies de ouriços-do-mar até então estudadas.

Adicionalmente, foi avaliada também a participação dos canais sensíveis à voltagem na fertilização de ouriços-do-mar, utilizando como ferramenta farmacológica bloqueadores de Ca_v de diferentes classes químicas, os quais são comumente empregados em estudos conduzidos nos mais diversos tipos celulares (JONES, 1987). No presente estudo foi utilizado um bloqueador seletivo para os Ca_v1, como a NF, e bloqueadores inespecíficos para Ca_v, como o VP e o DT.

Todos os bloqueadores de Ca_v foram efetivos na inibição da fertilização de *E. lucunter* (Gráfico 2), com destaque para o VP e o DT, com valores de EC_{50} significativamente semelhantes (Tabela 4). A NF apresentou-se menos efetiva, inibindo esse processo de forma bastante discreta. Esses resultados sugerem que os canais sensíveis à voltagem são essenciais para a fertilização de *E. lucunter* e

estão de acordo com os resultados obtidos por Kazazoglou e colaboradores (1985), que demonstraram um bloqueio na fertilização de *S. purpuratus* induzida pelos mesmos bloqueadores de Ca_v. Esses autores creditaram esse efeito à inibição da reação acrossômica, uma vez que foi comprovada uma ligação extremamente específica do [^{3}H]Verapamil à membrana isolada dos espermatozóides nas mesmas concentrações que inibiram a reação acrossômica. Kirkman-Brown e colaboradores (2004) também demonstraram que a NF foi incapaz de inibir o aumento da $[Ca^{2+}]_c$ em espermatozóides humanos em resposta à progesterona. Portanto, a menor atividade da NF na inibição da fertilização de *E. lucunter* pode estar associada a uma baixa expressão dos Ca_v1 na membrana plasmática do gameta masculino dessa espécie de ouriço-do-mar.

Em seguida, foi avaliado o envolvimento do Ca^{2+} extracelular na embriogênese de *E. lucunter* através da utilização de agentes quelantes de Ca^{2+}. Esses compostos têm a propriedade de formar complexos estáveis com o Ca^{2+} extracelular, diminuindo a concentração de Ca^{2+} livre no meio, e tornando-o indisponível para a célula. Por esta razão, estes compostos são utilizados como ferramentas farmacológicas na identificação de eventos celulares dependentes do influxo de Ca^{2+}. Os quelantes utilizados nesses ensaios foram o EDTA e o EGTA, que são amplamente empregados em estudos científicos realizados em diversos tipos celulares, tais como células procariontes, células nervosas, células musculares, células vegetais, células germinativas e células embrionárias (WEINBERG; MAIER, 2007; HUBBARD et al., 1968; LEGATO; LANGER, 1969; PERDUE et al., 1988; CLAPPER et al., 1985 MATSUKAWA et al., 2002).

O tratamento dos embriões de *E. lucunter* com EDTA ou EGTA bloqueou, de forma significante, o desenvolvimento embrionário nos estágios de primeira e segunda clivagem (Gráficos 3 e 4). O EGTA foi aproximadamente 1,89 vezes mais efetivo que o EDTA no bloqueio da progressão para a primeira clivagem e 1,76 vezes mais efetivo no bloqueio da progressão para a segunda clivagem. Este resultado deve-se ao fato de que o EDTA atua como um quelante inespecífico de cátions bivalentes, tais como Mg^{2+}, Mn^{2+} e Ca^{2+}, enquanto que o EGTA é um quelante específico para o Ca^{2+}, sequestrando preferencialmente esse íon em detrimento de outros íons divalentes (DETONI et al., 2008). Resultados similares foram obtidos por Young e Nelson (1974), que demonstraram que o EGTA inibiu mais eficientemente a motilidade dos espermatozóides de ouriços-do-mar da

espécie *Arbacia punctulata* em comparação com concentrações equimolares de EDTA.

A inibição do desenvolvimento embrionário induzida pelos quelantes sugere que o Ca^{2+} extracelular seja vital para os eventos celulares que ocorrem nos estágios de primeira e segunda clivagem de *E. lucunter*. Esses dados divergem dos resultados obtidos por Schmidt e colaboradores (1982) nos estudos sobre o papel do Ca^{2+} extracelular no desenvolvimento embrionário inicial dos ouriços-do-mar *Strongilocentrotus purpuratus* e *Lytechinus pictus*. A incubação dos embriões em um meio contendo 1 mM de EGTA, não inibiu o desenvolvimento embrionário dessas espécies até o estágio de blástula, levando-os a sugerir que a embriogênese desses animais é um processo independente do Ca^{2+} extracelular.

Em *Echinometra lucunter*, o tratamento dos embriões com 600 µM de EGTA inibiu em 100% a progressão para os estágios de primeira e segunda clivagem. Um possível efeito tóxico do quelante foi descartado pelo fato dos embriões observados em microscopia óptica comum apresentarem um aspecto regular, uniforme e sem perda da integridade da membrana. Uma vez que óvulos e embriões de ouriços-do-mar possuem cerca de 15.000 vesículas em sua região cortical (grânulos corticais), a perda da integridade de membrana pode ser facilmente detectada morfologicamente, sob microscopia óptica comum, por meio do extravasamento dos grânulos. Além disso, concentrações mais elevadas de EDTA e EGTA foram utilizadas em óvulos e embriões de outras espécies de ouriços-do-mar sem causar danos à fertilização ou ao desenvolvimento embrionário (BROWNE et al., 1996; CROSSLEY et al., 1988).

Uma vez que os resultados obtidos nos ensaios com os quelantes sugerem que o Ca^{2+} extracelular seja crucial para o desenvolvimento embrionário inicial de *E. lucunter*, decidiu-se investigar o envolvimento dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem no influxo de Ca^{2+} durante a embriogênese inicial dessa espécie de ouriço-do-mar, utilizando como ferramenta farmacológica a NF, o VP e o DT.

Todos os bloqueadores de Ca_v estudados também foram eficazes na inibição do desenvolvimento embrionário, sugerindo o envolvimento dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem na embriogênese inicial de *E. lucunter* (Gráficos 5, 6 e 7). A NF foi o composto mais eficaz no bloqueio da progressão para o estágio de primeira clivagem (CE_{50} de 255,2 µM). A CE_{50} do VP e do DT referente a esse estágio de desenvolvimento não pôde ser calculada, pois todas as concentrações analisadas

apresentaram um percentual de inibição inferior a 50%. Esses dados sugerem que os Ca_v1 são os canais majoritários nessa fase do desenvolvimento embrionário, uma vez que estes são os alvos farmacológicos da NF. Entretanto, a NF mostrou uma menor eficácia na inibição da progressão para a segunda clivagem e para o estágio de mórula quando comparada ao VP e ao DT, sugerindo uma regulação negativa dos Ca_v1 na medida em que o desenvolvimento embrionário progride. Gonzalez-Gutierre e colaboradores (2007) demonstraram, em ovócitos de *Xenopus leaves*, um mecanismo de regulação negativa dos $Ca_v1.2$, induzido pela subunidade β do canal, que promove a endocitose e a consequente internalização e inativação desse complexo protéico. Um mecanismo semelhante pode estar presente no desenvolvimento embrionário inicial de *E. lucunter*. Recentemente foi demonstrado que o processo de endocitose em embriões de ouriços-do-mar é iniciado logo após a exocitose dos grânulos corticais, como uma forma de compensar o excesso de membrana vesicular inserida na membrana plasmática. Esse processo persiste durante as três primeiras clivagens e promove alterações profundas na constituição protéica da superfície das células embrionárias (COVIAN-NARES et al., 2008). Hamdoun e colaboradores (2004) sugerem que as alterações na constituição protéica da membrana do zigoto, mediadas pela exocitose/endocitose, seja responsável pela superexpressão de proteínas ABC na membrana da célula embrionária após a fertilização. Esse mecanismo pode ser uma possível explicação para a baixa efetividade da NF, em comparação ao VP e ao DT, na progressão para a segunda clivagem e para o estágio de mórula. De fato, o efeito da NF sobre essas fases do desenvolvimento foi um reflexo da sua inibição sobre a progressão para a primeira clivagem, uma vez que não houve diferença significativa entre os valores da CE_{50} desse composto para os estágios analisados (Tabela 6).

De modo contrário, o VP e o DT apresentaram uma maior efetividade na inibição da progressão para os estágios de segunda clivagem e de mórula. É possível que nos estágios de segunda clivagem e mórula o número total de Ca_v que interagem com esses compostos diminua, através de uma provável regulação negativa por endocitose, intensificando assim o efeito dos bloqueadores. Estudos adicionais utilizando bloqueadores específicos para $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$, $Ca_v2.3$ e Ca_v3 podem permitir um maior entendimento da participação de outros tipos de canais sensíveis à voltagem para o desenvolvimento embrionário, bem como contribuir para

a elucidação do mecanismo inibitório induzido pelo VP e pelo DT sobre a progressão para a segunda clivagem e para o estágio de mórula.

Esse conjunto de resultados está em desacordo com os dados obtidos por outros pesquisadores ao estudaram o efeito de bloqueadores de Ca_v no desenvolvimento embrionário inicial de diferentes espécies de ouriços-do-mar. Shen e Buck (1993) demonstraram, em óvulos de *L. pictus* previamente marcados com a sonda fluorescente para Ca^{2+} fluo-3, que o tratamento com NF inibiu discretamente o aumento da fluorescência intracelular promovida pelo influxo de Ca^{2+}. No entanto, a NF não afetou, negativamente, a formação da onda de Ca^{2+}, levando-os a sugerir que esse processo não depende do Ca^{2+} extracelular. De modo semelhante, Vogel e colaboradores (1999) verificaram que o tratamento de embriões de *S. purpuratus* com o cádmio (um bloqueador inespecífico de todos os tipos de Ca_v) e com a ω-conotoxina (um peptídio bloqueador dos canais $Ca_v2.1$ e $Ca_v2.2$), inibiu o mecanismo de endocitose que restitui a superfície da célula após a exocitose dos grânulos corticais, porém esse bloqueio não inibiu a fertilização, uma vez que a elevação do envelope de fertilização foi observada em praticamente 100% dos óvulos. Entretanto, é importante salientar que esses autores só observaram a formação da onda de Ca^{2+} ou a elevação do envelope de fertilização, não se preocupando em acompanhar o desenvolvimento embrionário inicial dessas espécies de ouriços-do-mar.

As análises das tabelas 4 e 6 demonstram que os valores da CE_{50} dos bloqueadores de Ca_v, tanto para o bloqueio do desenvolvimento embrionário quanto para o bloqueio da fertilização, são mais elevados do que os observados para os efeitos de tais compostos em outros tipos celulares, como, por exemplo, nos cardiomiócitos (BERGSON, et al., 2010; MATSUYAMA, et al., 2010; ZHU, et al., 2009). Dados semelhantes foram obtidos por Montenegro e colaboradores (2004) estudando a atividade de quimioterápicos em células embrionárias de *L. pictus*. Comumente, os valores de CE_{50}, para os mais diversos compostos, obtidos em ensaios realizados em gametas ou células embrionárias de ouriços-do-mar são mais elevados do que valores encontrados em outros tipos celulares de animais não-marinhos. Esse fato pode estar correlacionado à intensa atividade de proteínas da superfamília ABC em gametas e células embrionárias desses animais. Essas proteínas são associadas ao fenótipo MDR e medeiam o transporte de vários compostos, tais como: hormônios, lipídios, peptídeos, metais pesados, xenobióticos

e até mesmo íons (JAEGER, 2009; LOO; CLARKE, 2008). Mengerink e Vacquier (2002) foram os primeiros a descreverem a expressão de uma proteína da superfamília ABC em gametas animais, ao identificarem uma glicoproteína, homóloga à glicoproteína humana ABCA3, na membrana plasmática de espermatozóides de ouriços-do-mar. Hamdoun e colaboradores (2004) demonstraram a atividade de proteínas das subfamílias ABCB e ABCC durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário de *S. purpuratus*. Recentemente, estudos realizados pelo nosso grupo caracterizaram a atividade funcional de proteínas ABCB1 e ABCC1 em gametas e células embrionárias de ouriço-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* (DE SOUZA et al., 2010), demonstrando que a atividade funcional destas proteínas parece ser um fenômeno geral no desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar.

Desde o trabalho de Tsuro e colaboradores (1981), que identificaram o VP como um inibidor do transporte mediado por proteínas da superfamília ABC, os estudos utilizando bloqueadores de Ca_v passaram a levar em consideração a influência desses compostos sobre a atividade funcional dessas proteínas, assim como a influência da atividade destas proteínas sobre o efeito farmacológico destes compostos nos Ca_v. Desse modo, foi investigado se o efeito inibitório dos bloqueadores de Ca_v sobre o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter* poderia ser atribuído à modulação da atividade das proteínas ABC.

O VP foi o composto mais eficaz na modulação da atividade de proteínas ABC em embriões de *E. lucunter*, seguido pelo DT e pela NF, respectivamente (Gráfico 8). Resultados semelhantes foram obtidos por Takara e colaboradores (2002) cujo trabalho demonstrou que o VP foi o bloqueador de Ca_v com a maior eficácia na inibição do transporte de [^{3}H] digotoxina, um substrato não-fluorescente de proteínas ABC, em linhagens celulares de carcinoma cervical humano. Os autores mostraram, ainda, que o DT foi moderadamente eficaz na modulação desse transporte e que a NF não apresentou um efeito relevante, sendo capaz de inibir o transporte do substrato apenas em concentrações acima de 400 µM. Apesar de ter sido o composto de menor eficácia na modulação da atividade de proteínas ABC em embriões de *E. lucunter*, a NF (25 µM e 50 µM) induziu um aumento significativo na IMF, caracterizando uma atividade moduladora sobre proteínas ABC, de forma diferente dos resultados obtidos por Takara e colaboradores (2002), o que pode ser

devido a alterações pontuais no sítio de modulação das proteínas ABC expressas em *E. lucunter*.

As concentrações dos bloqueadores de Ca_v que induziram a modulação máxima das proteínas ABC não apresentaram efeito inibitório sobre o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*, sugerindo que o transporte mediado por essas proteínas não é determinante para a embriogênese normal dessa espécie de ouriços-do-mar, pelo menos nas condições de cultura *in vitro* e na ausência de estressores químicos. Além disto, resultados de nosso grupo demonstram que moduladores específicos das proteínas ABCB1 (Rerversina 205) e ABCC1 (MK-571) não apresentam efeito inibitório sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* de *E. lucunter*. Esse conjunto de dados sugere que o efeito inibitório dos bloqueadores de Ca_v sobre o desenvolvimento embrionário está diretamente relacionado ao bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos canais sensíveis à voltagem, resultados, estes, corroborados pelo bloqueio do desenvolvimento embrionário promovido pelos quelantes de Ca^{2+}.

Ensaios subsequentes foram realizados com o propósito de confirmar o envolvimento dos Ca_v no desenvolvimento embrionário inicial do *E. lucunter*. Nesses estudos, o VP foi utilizado como protótipo dos bloqueadores de Ca_v, tendo em vista que esta substância é o bloqueador de Ca_v mais comumente empregado em estudos de biologia do desenvolvimento (SCHMIDT et al., 1982; KAZAZOGLOU et al., 1985).

Inicialmente, foi investigada ação da VL na inibição do desenvolvimento embrionário induzida pelo VP. A VL é um ionóforo seletivo para K^+, que em condições fisiológicas é capaz de transportar esse íon para o meio extracelular, alterando, assim, o potencial da membrana plasmática e influenciando, indiretamente, alguns tipos de canais iônicos sensíveis à voltagem. Devido a esse efeito, a VL tem sido empregada como ferramenta farmacológica para promover a entrada de Ca^{2+} em diversos tipos celulares (BOITANO; OMOTO, 1991; COLDEN-STANFIELD; SCANLON, 2000). Quando os embriões foram previamente tratados com a VL, a inibição do desenvolvimento embrionário induzida pelo VP foi revertida em todos os estágios monitorados (Gráfico 9). Resultados semelhantes foram obtidos por Krasznai e colaboradores (1999), cujo trabalho demonstrou que o tratamento de espermatozóides do peixe *Cyprinus carpio* com VL promove uma hiperpolarização da membrana plasmática, a qual é seguida por um influxo de Ca^{2+}.

Os autores verificaram, ainda, que o tratamento com o ionóforo foi capaz de reverter a inibição da motilidade dos espermatozóides induzida pelo VP. Esses dados sugerem que o efeito reversor provocado pela exposição prévia ao ionóforo de K^+ pode ser devido à abertura de alguns tipos de canais de Ca^{2+} subsequente à hiperpolarização da membrana plasmática induzida pelo ionóforo. Deste modo, a entrada de Ca^{2+} por esses canais, nos momentos iniciais do desenvolvimento embrionário, se sobrepõe ao bloqueio posterior dos Ca_v induzido pelo VP. Essa hipótese é corroborada pelo trabalho de Nazarenko e colaboradores (2003), que sugeriram que o influxo de Ca^{2+} provocado pelo tratamento com VL na cianobactéria *Synechocystis sp* foi mediado pelos canais sensíveis a voltagem. Da mesma forma, Gruzman-Grenfell e Gonzalez-Martinez (2004) demonstraram, em espermatozóides humanos, que a hiperpolarização induzida por VL estimula a abertura dos Ca_v, retirando-os do estado parcialmente inativado, característico do potencial de repouso. No entanto, até o presente momento, nenhum trabalho identificou o tipo de Ca_v envolvido na resposta à hiperpolarização provocada pelo ionóforo de K^+.

Não se pode descartar, contudo, que uma hiperpolarização induzida pela VL possa influenciar negativamente a regulação farmacológica de alguns canais de Ca^{2+}. A ação de vários bloqueadores de Ca_v é dependente do potencial de membrana da célula (UEHARA; HUME, 1985; SANGUINETTI; KASS, 1984), fato, este, que também explica a reversão do bloqueio do desenvolvimento induzido pelo VP quando a VL foi previamente adicionada à cultura. Estudos sobre o efeito de bloqueadores de Ca_v na liberação de catecolaminas de glândulas adrenais de felinos demonstraram que o bloqueio dos Ca_v induzido pelo VP foi dependente de voltagem, uma vez que o VP apresentou efeito bloqueador sobre Ca_v apenas em potenciais de membrana mais positivos, não apresentando atividade inibitória em glândulas hiperpolarizadas (LOPEZ et al., 1989).

Para investigarmos se o efeito reversor da VL, sobre o bloqueio do desenvolvimento induzido pelo VP, foi devido a uma possível entrada de Ca^{2+} estimulada pelo ionóforo de K^+, e em que momento do desenvolvimento esse influxo de Ca^{2+} é capaz de reverter o bloqueio imposto pelo VP, os embriões foram tratados inicialmente com o bloqueador de Ca_v e posteriormente com a VL (Gráfico 10). Sob esse desenho experimental, o bloqueio do desenvolvimento embrionário induzido pelo VP não foi revertido pelo ionóforo de K^+, sugerindo que um provável aumento na $[Ca^{2+}]_c$, induzido pela VL, seja ineficaz quando a mesma é adicionada

posteriormente ao bloqueador de Ca_v. Tal fato pode estar correlacionado com a necessidade de influxo de Ca^{2+} nos momentos iniciais do desenvolvimento, conforme discutiremos posteriormente. Adicionalmente, alguns trabalhos demonstraram que os bloqueadores de canais sensíveis à voltagem podem impedir o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular estimulada por ionóforo de K^+. Granados-Gonzalez e colaboradores (2005) demonstraram que o tratamento com NF bloqueou o aumento na $[Ca^{2+}]_c$ em espermatozóides de *L. pictus* até mesmo com a posterior adição do ionóforo de K^+.

Uma vez que a VL, além de alterar o potencial da membrana plasmática, promove uma alteração na concentração intracelular de K^+, passamos a investigar se alterações na concentração deste íon poderiam interferir no efeito inibitório do bloqueador de Ca_v sobre o desenvolvimento embrionário. Assim, foi avaliada a ação da NG no efeito inibitório do VP sobre o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*. A NG é um ionóforo que promove a troca eletroneutra entre K^+ e H^+ através das biomembranas, promovendo o efluxo de K^+ sem alterar o potencial de membrana (DANIELE et al., 1978).

A NG apresentou uma citotoxicidade bastante relevante, inibindo o desenvolvimento embrionário em concentrações maiores que 250 nM (dados não mostrados). Resultados semelhantes foram obtidos por Rotin e colaboradores (1987) que sugeriram que esse efeito foi causado pelo acúmulo de H^+ no citosol e consequente diminuição do pH_i, o que afeta, negativamente, uma ampla variedade de processos celulares. Desta forma, em nossos estudos, a NG foi utilizada em concentrações menores que 250 nM e que não apresentaram efeito inibitório sobre o desenvolvimento embrionário.

O tratamento prévio dos embriões recém fertilizados com NG não foi capaz, em nenhuma concentração testada, de reverter o efeito inibitório do bloqueador de Ca_v sobre a progressão para o estágio de segunda clivagem ou mórula. O mesmo perfil foi observado quando o bloqueador de Ca_v foi adicionado previamente à NG (Gráficos 11 e 12). Esses dados sugerem que o efluxo do K^+ e alteração na concentração intracelular deste íon não estão relacionados com a reversão da inibição do desenvolvimento embrionário induzida pelo bloqueador de Ca_v. Tais dados reforçam a hipótese de que a hiperpolarização do potencial de membrana e a consequente entrada de Ca^{2+} nos momentos iniciais do desenvolvimento, induzida pela VL, seja responsável pela reversão do efeito inibitório promovido pelo VP.

Para investigar se a mobilização de Ca^{2+} extracelular, por mecanismos independentes dos canais sensíveis à voltagem, seria capaz de reverter o efeito inibitório do desenvolvimento embrionário promovido pelos bloqueadores de Ca_v, foi estabelecido um protocolo de duplo tratamento, utilizando a OUA, um heterosídio cardioativo e inibidor clássico da Na^+/K^+ ATPse e o VP (BONTING; BECKER, 1964). É relatado na literatura que o bloqueio da atividade da Na^+/K^+ ATPse leva à ativação, de forma indireta, do modo reverso do trocador Na^+/Ca^{2+}, promovendo, assim, um influxo de Ca^{2+} na célula (NAMEKATA et al., 2009).

O tratamento prévio dos embriões com OUA, em todas as concentrações testadas, resultou na reversão do efeito inibitório do bloqueador de Ca_v sobre o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*, sendo esse efeito semelhante ao observado com a VL sob o mesmo protocolo de tratamento (Gráfico 13). Resultados similares foram apresentados por Ashida e colaboradores 1991, ao demonstrarem que o tratamento com OUA reverteu a inibição da contração da musculatura lisa vascular isolada de ratos induzida pelo VP. Os autores atribuíram esse efeito ao aumento da $[Ca^{2+}]_c$ associada com a atividade reversa do trocador Na^+/Ca^{2+}, sendo esta uma possível explicação para o efeito da OUA na reversão do efeito inibitório do VP sobre o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*. No entanto, a OUA não foi capaz de produzir a mesma amplitude de reversão obtida no tratamento com ionóforo de K^+. Esse dado sugere que o provável influxo de Ca^{2+} provocado pela hiperpolarização do potencial de membrana é mais eficaz na reversão do efeito inibitório do VP em comparação com o influxo de Ca^{2+} mediado pelo modo reverso do trocador Na^+/Ca^{2+}. O que se justifica pela maior velocidade de transporte mediado por um canal iônico em comparação a de um trocador (CARONI et al., 1980; CLAPHAM, 2007). No entanto, é preciso levar em consideração, também, os efeitos inibitórios da hiperpolarização sobre a atividade farmacológica dos bloqueadores de Ca_v.

Da mesma forma que nos ensaios com a VL, a adição de OUA posterior ao tratamento com VP não foi capaz de reverter a inibição do desenvolvimento embrionário induzido pelo bloqueador de Ca_v (Gráfico 14). Esse resultado reforça a sugestão anterior de que o bloqueio do desenvolvimento induzido pelo VP não pode ser revertida por um posterior aumento na $[Ca^{2+}]_c$. Entretanto, somente com a utilização de técnicas de monitoramento, em tempo real, da $[Ca^{2+}]_c$ será possível elucidar esse mecanismo.

O conjunto desses resultados demonstra que um provável aumento na $[Ca^{2+}]_c$, mediado tanto pela hiperpolarização do potencial de membrana quanto pela ativação do modo reverso do trocador Na^+/Ca^{2+}, reverte, eficientemente, o efeito inibitório provocado pelo VP sobre o desenvolvimento embrionário. Tais dados sugerem que o efeito inibitório dos bloqueadores de Ca_v sobre o desenvolvimento embrionário foi realmente causado pelo impedimento do influxo de Ca^{2+} através dos canais sensíveis à voltagem, sendo esse processo essencial e indispensável para a embriogênese normal de *E. lucunter*.

Com base nos resultados obtidos com a VL e a OUA, que sugerem que a entrada Ca^{2+} é importante nos momentos iniciais do desenvolvimento, passamos a investigar uma possível relação temporal no efeito inibitório dos bloqueadores de Ca_v. Nossos dados revelaram que a inibição induzida pelo VP foi mais acentuada quando os embriões foram tratados com o bloqueador de Ca_v nos primeiros minutos do desenvolvimento embrionário. O efeito sobre a progressão para a segunda clivagem demonstra claramente um padrão dependente de tempo no bloqueio do desenvolvimento induzido pelo VP, onde a inibição induzida pelo composto foi mais eficiente nos primeiros momentos do desenvolvimento (Gráfico 15B). De forma interessante, o bloqueador de Ca_v não apresentou efeito inibitório sobre o desenvolvimento quando adicionado 40 minutos após a fertilização. Este mesmo perfil foi observado na progressão para o estágio de mórula, onde o VP não inibiu o desenvolvimento quando os embriões foram tratados 50 minutos após a fertilização. O perfil dependente de tempo do efeito inibitório sugere que o influxo de Ca^{2+} seja crucial para o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter* somente durante os primeiros momentos da embriogênese, não sendo essencial 50 minutos após a fertilização.

Tendo em vista que o VP é um substrato de proteínas da superfamília ABC (TSURUO et al., 1981) e sabendo que a atividade funcional máxima dessas proteínas, em embriões de ouriços-do-mar, só é atingida 20 minutos após a fertilização (DE SOUZA et al., 2010), foi investigada se a diminuição gradativa do efeito inibitório do VP, e a própria ausência de atividade nos minutos tardios da embriogênese inicial (50 minutos), poderia ser devida a um aumento da atividade de proteínas ABC nas células embrionária. O co-tratamento dos embriões com REV, um modulador de proteína ABCB1, no entanto, não alterou o perfil dependente de tempo do efeito inibitório do VP sobre o desenvolvimento embrionário (Gráfico 16).

Esses dados sugerem que a ausência do efeito do bloqueador de Ca_v, 50 minutos após a fertilização, não está correlacionada à atividade de proteínas ABC, mas sim com uma alteração gradual na dependência de influxo de Ca^{2+} durante o curso da embriogênese inicial. Estudos adicionais são necessários para verificar se este fato está relacionado a uma regulação negativa na expressão dos Ca_v e se os estoques intracelulares de Ca^{2+} passam a ter um papel proeminente a partir de determinado momento do desenvolvimento.

Para confirmar a dependência temporal do Ca^{2+} extracelular durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*, os embriões foram incubados com o quelante de Ca^{2+} EGTA em diferentes intervalos de tempos. O tratamento com o quelante de Ca^{2+} também apresentou um perfil inibitório dependente de tempo para todos os estágios monitorados (Gráfico 17). Esse efeito foi semelhante ao observado no tratamento com o bloqueador de Ca_v, porém a intensidade do bloqueio induzido pelo quelante de Ca^{2+} foi maior do que a induzida pelo VP, o que pode ser explicado pelo fato do EGTA, ao seqüestrar o cálcio do meio, diminuir a sua disponibilidade para entrar na célula, independente do mecanismo de influxo.

Nossos dados sugerem que o influxo de Ca^{2+} nos primeiros minutos após a fertilização é um fator determinante para a embriogênese do *E. lucunter*. Resultados semelhantes foram obtidos por Créton e Jaffe (1995), que demonstraram que o tratamento com lantânio, um íon inorgânico que bloqueia inespecificamente todos os tipos de Ca_v, e com o BAPTA, um quelante de Ca^{2+} de estrutura química análoga ao EGTA, inibiram o desenvolvimento embrionário de *L. variegatus* de forma dependente de tempo quando adicionados entre 5 e 20 segundos após a fertilização. No entanto, os autores verificaram que o influxo de Ca^{2+} ocorre através dos canais de Ca^{2+} expressos na membrana plasmática do gameta masculino, o que não é observado em *E. lucunter*, uma vez que o bloqueio do influxo persiste até 50 minutos após a fertilização. Esses resultados mostram que o influxo de Ca^{2+} tem uma importância fundamental no desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar e que o perfil desta dependência é específico para cada espécie.

Uma possível explicação para a dependência temporal do Ca^{2+} extracelular para o desenvolvimento embrionário de *E.* lucunter pode está nos resultados obtidos Shen e Buck (1993). Esses pesquisadores, com o auxílio de microscopia confocal, visualizaram as alterações na $[Ca^{2+}]_c$ durante a resposta à fertilização em óvulos de

L. pictus microinjetados com o Fluo-3, uma sonda fluorescente sensível ao Ca^{2+}. Através dessa metodologia, os autores identificaram que o pico máximo de fluorescência intracelular foi observado 36 segundos após a entrada do espermatozóide, caindo lentamente até atingir um nível constante no intervalo de 5 minutos após a indução da fertilização. A partir desse momento sucessivas elevações, de baixa amplitude e curta duração, na $[Ca^{2+}]_c$ foram visualizadas e relacionadas com a indução de eventos essenciais à embriogênese, como a fusão dos pró-núcleos e entrada na mitose. Esses resultados sugerem que a interrupção do influxo de Ca^{2+} em embriões de *E. lucunter* entre 0,5 e 5 minutos após a fertilização, influenciou negativamente o primeiro pico de elevação da $[Ca^{2+}]_c$ resultando em um acentuado e progressivo bloqueio no desenvolvimento embrionário. Essa inibição pode está relacionada com interrupção dos eventos tardios da fertilização, tais como: ativação da NAD^+ cinase, consumo de O_2, alcalinização do pH_i e ativação da síntese protéica (tabela 1), os quais são processos dependentes da elevação da $[Ca^{2+}]_c$ após a fertilização (WHITAKER, 2008; FRIIS; JOHANSEN, 1996; GRAINGER et al., 1979).

Estudos adicionais, utilizando micromanipuladores que permitam a introdução de sondas fluorescentes de Ca^{2+} diretamente no meio intracelular, podem permitir um mapeamento mais preciso da relação temporal e da dinâmica da $[Ca^{2+}]_c$ nas células embrionárias de *E. lucunter*. A utilização de sondas fluorescentes vitais de Ca^{2+}, como o Fluo-3/AM, não permitiu a análise das variações da $[Ca^{2+}]_c$, uma vez que este corante é transportado ativamente por proteínas ABC, e mesmo na presença de inibidores específicos dessas proteínas (REV e MK571), não foi capaz de penetrar, de forma efetiva, no interior das células (dados não mostrados). Resultados semelhantes foram obtidos por Schäfer e colaboradores (2009), que relataram uma fraca marcação com a sonda de Ca^{2+} Fura-2/AM em óvulos do ouriço-do-mar *Psammechinus miliaris* devido à baixa concentração intracelular do fluorocromo, bem como ao grande tamanho das células germinativas e embrionárias.

Uma vez demonstrado que o Ca^{2+} extracelular não é determinante para o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter* a partir dos 50 minutos após a fertilização, passamos a investigar a participação do Ca^{2+} como mensageiro intracelular no desenvolvimento embrionário após esse intervalo de tempo. O tratamento dos embriões com o quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM bloqueou

de forma eficaz a progressão para os estágios de primeira clivagem, segunda clivagem e mórula (Gráfico 18), sugerindo que esse íon continua desempenhando um importante papel na regulação de eventos fundamentais para a embriogênese de *E. lucunter*. Resultados semelhantes foram obtidos por Carroll e colaboradores (2000) que verificaram que a microinjeção do BAPTA inibiu completamente a síntese do material genético em óvulos de três espécies de ouriços-do-mar (*S. purpuratus*, *L. variegatus* e *L. pictus*). Além disso, diversos grupos independentes demonstraram que a microinjeção desse quelante em embriões de outras espécies de ouriços-do-mar e de *Xenopus leaves*, inibiu eficientemente alguns eventos que ocorrem durante a mitose, tais como a desorganização do envoltório nuclear, a descondensação da cromatina e a citocinese (TWIGG et al., 1988; STEINHARDT; ALDERTON, 1988; MILLER, et al., 1993).

Segundo Oberdorf e colaboradores (1988), o retículo endoplasmático é o maior estoque intracelular de Ca^{2+} em óvulos e embriões de ouriços-do-mar. Shen e Buck (1993) verificaram que os principais mensageiros intracelulares envolvidos na mobilização de Ca^{2+} intracelular são o IP_3 e o $_cADPr$. Assim, nossos resultados sugerem que, cerca de 50 minutos após a fertilização, a mobilização de Ca^{2+} a partir de estoques intracelulares assume o papel na regulação da $[Ca^{2+}]_c$ e dos eventos celulares mediados por este íon, uma vez que o influxo de Ca^{2+} não é mais determinante para o desenvolvimento embrionário.

Para confirmar a participação do Ca^{2+} como mensageiro intracelular no desenvolvimento embrionário de *E. lucunter* após os 50 minutos iniciais da embriogênese, os embriões foram tratados com dois bloqueadores do complexo Ca^{2+}-Calmodulina, a TFP e a CPZ. Ambos compostos bloquearam o desenvolvimento embrionário em todos os estágios monitorados (Gráficos 19). Esses resultados reforçam as observações anteriores, demonstrando que o Ca^{2+} intracelular é indispensável para o desenvolvimento embrionário, e que a sua interação com a calmodulina é determinante para a embriogênese.

Tendo em vista o envolvimento do Ca^{2+} intracelular nos estágios mais tardios do desenvolvimento embrionário inicial do *E. lucunter*, foi investigado se a mobilização dos estoques intracelulares de Ca^{2+} é suficiente para promover a ativação dos óvulos. Assim, gametas femininos foram tratados com a IONO, um ionóforo seletivo de Ca^{2+}, na presença ou na ausência nominal de Ca^{2+} extracelular (Tabela 7). Na presença de Ca^{2+} extracelular, o aumento artificial da $[Ca^{2+}]_c$ induzida

pela ação do ionóforo foi suficiente para promover a ativação dos óvulos em concentrações acima de 1 µM, evidenciada a partir da elevação do envelope de fertilização. O aumento sustentado da $[Ca^{2+}]_c$ por um período de 5 minutos, ou concentrações de IONO acima de 25 µM, induziram a morte celular por necrose, uma vez que foi observado extravasamento dos grânulos corticais, caracterizando a perda da integridade da membrana. Na ausência de Ca^{2+} extracelular, a elevação do envelope de fertilização só foi observada em concentrações de IONO 5 vezes maiores do que as utilizadas na presença de Ca^{2+} extracelular. Esses dados sugerem que o Ca^{2+} armazenado nos estoques intracelulares de *E. lucunter* é suficiente para induzir a ativação dos óvulos. Resultados semelhantes foram obtidos por Steinhardt e Epel (1974), que demonstram a ativação de óvulos de *L. pictus* e *S. purpuratus* induzidas pelo ionóforo de Ca^{2+} A23187 em meio sem Ca^{2+}. Esses dados levaram os autores a sugerir que o Ca^{2+} extracelular não é importante para a fertilização e a consequente ativação de óvulos de ouriços-do-mar, bem como o seu desenvolvimento embrionário. Entretanto, este não é o mecanismo fisiológico observado no desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*, uma vez que a redução da disponibilidade de Ca^{2+} extracelular livre (ensaios com EGTA e EDTA) ou o bloqueio dos Ca_v (NF, VP ou DT), inibiram, sobremaneira, a embriogênese.

Sabendo-se que a elevação do envelope de fertilização e a formação do espaço perivitelínico são diretamente proporcionais ao aumento da $[Ca^{2+}]_c$, mecanismo, este, responsável pela maciça exocitose dos grânulos corticais, foram realizadas análises comparativas da distância entre a membrana plasmática do zigoto e o envelope de fertilização (espaço perivitelínico) de uma espécie de ouriços-do-mar cujo desenvolvimento embrionário inicial é dependente da mobilização de Ca^{2+} intracelular, com o espaço perivitelínico de *E. lucunter* (Figura 25). Os embriões de *S. purpuratus*, uma espécie cuja fertilização e desenvolvimento embrionário são dependentes da mobilização de Ca^{2+} intracelular (SCHMIDT et al., 1982), apresentam um espaço perivitelínico de aproximadamente 12,3 µm, enquanto que essa região, em embriões de *E. lucunter*, possui um tamanho de apenas 3,5 µm, ou seja, cerca de 3,5 vezes menor. A razão para a formação de um maior espaço perivitelínico em embriões de *S. purpuratus* pode estar no fato da mobilização intracelular de Ca^{2+} aumentar a $[Ca^{2+}]_c$ de forma mais intensa e por um maior período de duração em relação à abertura dos canais sensíveis à voltagem (KASS; ORRENIUS, 1999; BERRIDGE et al., 2003). O tratamento dos gametas femininos de

E. lucunter com o ionóforo de Ca^{2+} IONO é capaz de aumentar o espaço perivitelínico para níveis semelhantes aos observados em *S. purpuratus*, demonstrando a potencialidade da exocitose de *E. lucunter*, e correlacionando este mecanismo de exocitose com a elevação abrupta da $[Ca^{2+}]_c$. Acreditamos, assim, que a reduzida dimensão do espaço perivitelínico em embriões de *E. lucunter*, sob condições fisiológicas, seja consequência da dependência majoritária da abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem para a elevação da $[Ca^{2+}]_c$.

O presente trabalho reúne evidências farmacológicas e morfológicas que sugerem fortemente um papel crucial dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem no desenvolvimento embrionário do ouriço-do-mar da espécie *Echinometra lucunter*. Esses resultados inserem essa espécie de animal deuterostômio como uma exceção à hipótese proposta por Lionel Jaffe (JAFFE, 1983), tendo em vista que sua fertilização e o desenvolvimento embrionário são promovidos pelo influxo de Ca^{2+} extracelular. Dessa forma, descrevemos de forma inédita a primeira exceção à hipótese proposta por Lionel Jaffe dentro do grupo dos equinóides. Espécies cuja indução da fertilização e do desenvolvimento embrionário não estão de acordo com a proposta do Jaffe foram identificadas em praticamente todo o reino animal (STRICKER, 1999), tendo o molusco bivalve *Mytilus edulis* (DEGUCHI et al., 1996), o crustáceo *Sicyonia ingentis* (LINDSAY; CLARK, 1994), e o nemertino *Cerebratulus lacteus* (STRICKER, 1996) como exemplos dentro do grupo dos protostômios e a ascídia *Phallusia mammillata* (GOUDEAU; GOUDEAU, 1993) como a exceção do grupo dos deuterostômios.

Esse trabalho, adicionalmente, apresenta uma relevância sob o ponto de vista farmacológico, pois abre a possibilidade da espécie de ouriço-do-mar em questão ser empregada como um modelo alternativo para a prospecção de produtos naturais ou sintéticos bioativos que interfiram na fisiologia celular do Ca^{2+}. Com o objetivo de certificar o presente modelo experimental como um modelo prospectivo para novos fármacos, foi avaliado o efeito de um produto de origem natural, com atividade vaso-relaxante, na embriogênese inicial de *E. lucunter*. O composto selecionado para esses ensaios foi a ROT, um monoterpeno oxigenado, extraído e isolado de folhas do vegetal *Mentha x villosa*, que apresentou atividade vasorrelaxante em musculatura lisa vascular de ratos, sendo esse efeito atribuído ao bloqueio dos Ca_V (GUEDES et al., 2004).

A ROT mostrou-se eficaz no bloqueio do desenvolvimento embrionário, de forma bastante sutil durante a primeira e segunda clivagem, porém de modo relevante na progressão para o estágio de mórula, mostrando um perfil dependente de concentração (Gráfico 20). A média da EC_{50} obtida para a inibição deste estágio do desenvolvimento foi de 1,44 mM, a qual é muito próxima da EC_{50} encontrada nos estudos realizados em musculatura lisa vascular, cujo valor da EC_{50} foi de 1,11 mM (GUEDES et al., 2004). Este resultado legitima o desenvolvimento embrionário do *E. lucunter* como um excelente modelo farmacológico para a prospecção de produtos naturais e sintéticos bioativos que interferem na dinâmica celular do Ca^{2+}.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos sobre o envolvimento do Ca^{2+} extracelular na fertilização e no desenvolvimento embrionário de *Echinometra lucunter*, pode-se concluir que:

- O Ca^{2+} extracelular é essencial e necessário tanto para a fertilização quanto para o desenvolvimento embrionário inicial de *E. lucunter*.
- Os bloqueadores de Ca_v (nifedipina, diltiazem e verapamil) apresentaram um efeito inibitório relevante sobre a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial de *E. lucunter*.
- O efeito inibitório dos bloqueadores de Ca_v não se dá pela sua propriedade moduladora sobre proteínas da superfamília ABC.
- A VL e OUA reverteram o efeito inibitório induzido pelo VP sobre o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*.
- A NG não reverteu o efeito inibitório induzido pelo VP sobre o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*.
- O influxo de Ca^{2+} nos primeiros minutos após a fertilização é determinante para o desenvolvimento embrionário inicial de *E. lucunter*, não sendo essencial 50 minutos após o início da embriogênese.
- O Ca^{2+} citosólico é fundamental para o desenvolvimento embrionário inicial.
- O complexo Ca^{2+}- calmodulina está envolvida nos eventos que regulam o desenvolvimento embrionário inicial de *E. lucunter.*
- O Ca^{2+} armazenado nos estoques intracelulares de *E. lucunter* é suficiente para induzir, artificialmente, *a ativação* dos óvulos.
- A rotundifolona inibiu o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter* com valor de EC_{50} próximo ao obtido nos estudos com musculatura lisa vascular.

Referências

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. N.; HIRUMA, C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M. Analgesic effect of rotundifolone in rodents. **Fitoterapia**, v. 67, p. 334-338, 1996.

ANDERSON, P. A. V.; GREENBERG, R. M.; JEZIORSKI, M. C. The molecular biology of invertebrate votage-gated Ca^{2+} channels. **The Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 841–856, 2000.

ASHIDA, T.; KAWANA, Y.; YOSHIMI, H.; AKABANE, S.; KURAMOCHI, M.; OMAE, T. Effects of ouabain and verapamil on endothelin-1-induced contraction of mesenteric artery in young spontaneously hypertensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 17, n. 7, p. S174-S176, 1991.

BERGSON, P.; LIPKIND, G.; LEE, S. P.; DUBAN, M.; HANCK, D. A. Verapamil Block of T-type Calcium Channels. **Mol. Pharmacol.**, DOI: 10.1124/mol.110.069492, 2010.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signaling: Dynamics, homeostasis and remodeling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, n. 7, p. 517-529, 2003.

BOITANO, S.; OMOTO, C. K.; Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH. **Journal of Cell Science**, v. 98, n. 3, p. 343-349, 1991.

BONTING, S. L.; BECKER, B.; XIV. Inhibition of enzyme activity and aqueous humor flow in the rabbit eye after intravitreal injection of ouabain. **Invest Ophthalmol.**, v. 3, p. 523-533, 1964.

BORSOTTO, M.; BARHANIN, J.; FOSSET, M.; LAZDUNSKI, M. The 1,4-Dihydropyridine Receptor Associated with the Skeletal Muscle Voltage-dependent Ca^{2+} Channel. **The J. of Biol. Chem.**, v. 260, n. 26, p. 14255-14263, 1985.

BRIGGS, E.; WESSEL, G. M. In the beginning…Animal fertilization and sea urchin development. **Developmental. Biology,** v. 300, p. 15-26, 2006.

BRINI, M.; CARAFOLI, E.; Calcium Pumps in Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 89, p. 1341–1378, 2009.

BROWNE, C. L. CRETON, R. KARPLUS, E. MOHLER, P. J. PALAZZO, R. E. MILLER, A. L. Analysis of the calcium transient at NEB during the first cell cycle in dividing sea urchin eggs. **Biol. Bull.**, v. 191, p. 5-16, 1996.

CARAFOLI, E. The unusual history and unique properties of the calcium signal. In KREBS, J. & MICHALAK, M. **Calcium: A metter of life or death.** 41ª ed., Paris: Elsevier, 2007, cap. 1.

CARNEIRO, L. S.; CERQUEIRA, W. R. P. Informações sobre o ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) (Echinodermata: Echinoidea) para o litoral de salvador e adjacências. **Sitientibus série ciências biológicas**, v. 8, n. 2, p. 168-171, 2008.

CARONI, P.; REINLIB, L.; CARAFOLI, E. Charge movements during the Na^{+}-Ca^{2+} exchange in heart sarcolemmal vesicles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 77, n. 11, p. 6354-6358, 1980.

CARROLL, D. J.; ALBAY, D. T. HOANG, K. M.; O'NEILL, F. J.; KUMANO, M.; FOLTZ, K. R. The relationship between calcium, MAP Kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization. **Developmental Biology**, v. 217, p. 179–191, 2000.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International union of pharmacology XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57 n. 4, p. 411-425, 2005.

CLAPPER, D. L; DAVIS, J. A.; LAMOTHE, P. J.;* PATTON, C.; EPEL, D. Involvement of Zinc in the Regulation of pHi, Motility, and Acrosome Reactions in Sea Urchin Sperm. **J Cell Biol.**, v. 100, n. 6, p. 1817–1824, 1985.

CLAPHAM, D. E. Calcium Signaling. **Cell**, v. 131, p. 1047-1058, 2007.

COLDEN-STANFIELD, M.; SCANLON, M. VCAM-1-induced inwardly rectifying K^{+} current enhances Ca^{2+} entry in human THP-1 monocytes. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 279, p. C488–C494, 2000.

COVIAN-NARES, J. F.; SMITH, R. M.; VOGEL, S. S. Two independent forms of endocytosis maintain embryonic cell surface homeostasis during early development. **Developmental Biology**, v. 316, n. 1, p. 135–148, 2008.

COLWIN A. L., COLWIN, L. H. Role of the gamete membranes in fertilization in Saccoglossus kowalevskii (Enteropneustra). I. The acrosomal region and its changes in early stages of fertilization. **The Journal of Cell Biology**, v.19, p. 477–500, 1963.

CRÉTON, R.; JAFFE, L. F. Role of calcium influx during the latent period in sea urchin fertilization. **Develop. Growth Differ.**, v. 37, p. 703-709, 1995.

CROSSLEY, I.; SWANN, K.; CHAMBERS, E.; WHITAKER, M. Activation of sea urchin by inositol phosphates is independent of external calcium. **Biochem. J.**, v. 252, p. 257-262, 1988.

DAN, J. C. Studies on the acrosome. I. Reaction to egg-water and other stimuli. **Biol. Bull.**, v. 103, p. 54-66, 1952.

DANIELE, R. P.; HOLIAN, S. K.; NOWELL, P. C. A Potassium ionophore (Nigericin) inhibits stimulation of human lymphocytes by mitogens. **The Journal of experimental medicine**, v. 147, p. 571-581,1978.

DAN-SOHKAWA, M.; FUJISAWA, H. Cell dynamics of the blastulation process in the starfish, Asterina pectinifera. **Developmental Biology**, v. 77, n. 2, p. 328-339, 1980.

DARGIE, H.; ROWLAND, E.; KRIKLER D. Role of calcium antagonists in cardiovascular therapy. **British Heart Foundation**, v. 46, p. 8-16, 1981.

DAVID, C.; HALLIWELL, J.;WHITAKER, M.; Some properties of the membrane currents underlying the fertilization potential in sea urchin eggs. **Journal of Physiology**, v. 402, p. 139-154, 1988.

DE FARIA, M. T.; DA SILVA, J. R. M. C. Innate immune response in the sea urchin *Echinometra lucunter* (Echinodermata). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 58–62, 2008.

DE SOUZA, M. Q.; BARROS, T. V.; TORREZAN, E.; CAVALCANTI A. L.; FIGUEIREDO, R. C.; MARQUES-SANTOS, L. F. Characterization of functional

activity of ABCB1 and ABCC1 proteins in eggs and embryonic cells of the sea urchin Echinometra lucunter. **Biosci. Rep.**, v. 30, p.257-265, 2010.

DEGUCHI, R.; OSANAI, K.; MORISAWA, M. Extracellular Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release from inositol 1,4,5-trisphosphatesensitive stores function at fertilization in oocytes of the marine bivalve *Mytilus edulis*. **Development**, v. 122, p. 3651-3660, 1996.

DETONI, M. L.; SOARES, G. L. G.; RUST, N. M.; PINTO, P. F.; ISAIAS, R. S.; VASCONCELOS, E. G.; Análise de proteínas e da atividade fosfohidrolítica em galha entomógena de uma espécie de leguminosae. **Principia**, v. 20, p. 1-7, 2008.

DOBREV, D.; MILDE, A. S.; ANDREAS, K.; RAVENS, U.; The effects of verapamil and diltiazem on N-, P- and Q-type calcium channels mediating dopamine release in rat striatum. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 576-582, 1999.

DOERING, C.; ZAMPONI, G. Calcium channels. In: ZHENG, et al. **Voltage-gated ion channels as drug targets.** 29ª ed., Weinheim: Willey-VCH, 2006, cap 5.

DOLPHIN, A. C.; A short history of voltage-gated calcium channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 56 – 62, 2006.

DUMAN, J. G.; CHEN, L.; HILLE, B. Calcium Transport Mechanisms of PC12 Cells. **J. Gen. Physiol.**, v. 131, n. 4, p. 307–323, 2008.

ECKBERG, W. R.; MILLER, A. L.; SHORT, L. G.; Calcium pulses during the activation of a protostome egg. **Biol. Bull.,** v. 185, p. 289-290, 1993.

EPEL, D.; PATTON C.; WALLACE R. W.; CHEUNG W. Y.; Calmodulin activates NAD kinase of sea urchin eggs: An early response. **Cell**, v. 23, p. 543–549, 1981.

ERNST, S. G. A century of sea urchin development. **Amer. Zool.,** v. 37, p. 250-259, 1997.

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T. P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R. W.; CETTERAL, W. A. Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. **Neuron**, v. 25, p. 533–535, 2000.

EVANS, T.; ROSENTHAL, E. T.; YOUNGBLOM A. J.; DISTEL, A. D.; HUNT, T. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. **Cell**, v. 33, n. 2, p. 389-396, 1983.

FATT, P; KATZ, B; The effect of inhibitory nerve impulses on a crustacean muscle fibre. **J. Physiol.**, v. 121, p. 374-389, 1953.

FREEZE, B. S.; MCNULTY, M. M.; HANCK, D. A. State-Dependent Verapamil Block of the Cloned Human Cav3.1 T-Type Ca^{2+} Channel. **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 2, p. 718-726, 2006.

FRIIS, U. G.; JOHANSEN, T. Dual regulation of the Na +/H +-exchange in rat peritoneal mast cells: role of protein kinase C and calcium on pHi regulation and histamine release. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 1327-1334, 1996.

GERHART, J. C.; WU, M.; KIRSCHNER, M. Cell dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in Xenopus laevis oocytes and eggs. **The Journal of Cell Biology**, v. 98, p.1247–1255, 1984.

GILBERT, S. F. Fertilization: Beginning a new organism. **In: Developmental Biology**, 6ª ed, Sunderland: Sinauer Associates, 2000, Cap 7.

GILKEY, J. C.; JAFFE, L. F.; RIDWAY, E. B.; REYNOLDS, G. T. A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, *Oryzias latipes*. **The Journal of Cell Biology,** v. 76, p. 448-466, 1978.

GILLOT, I.; GROlGNO, L.; PATEL, R.; WHITAKER, M. S. Calcium signals associated with migration and fusion of pronuclei in sea urchin eggs. **Biology of the Cell**, v. 90, p. 109-130, 1998.

GILLOT, I.; PAYAN, P.; GIRARD, J.; SARDET, C. Calcium in sea urchin egg during fertilization. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 34, p. 117-125, 1990.

GLABE, C. G., LENNARZ, W. J. Species-specific sperm adhesion in sea urchins: A quantitative investigation of bindin-mediated egg agglutination. **The Journal of Cell Biology**, v. 83, p.595–604, 1979.

GLABE C. G.; VACQUIER V. D. Egg surface glycoprotein receptor for sea urchin sperm bindin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 75, p. 881–885, 1978.

GONZALEZ-GUTIERREZ, G.; MIRANDA-LAFERTE, E.; NEELY, A.; HIDALGO, P. The Src homology 3 domain of the β-subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 4, p. 2156–2162, 2007.

GOTOH, T.; SHIGEMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Cyclin E2 is required for embryogenesis in *Xenopus laevis*. **Developmental Biology**, v. 310, n. 2, p. 341-347, 2007.

GOUDEAU, M.; GOUDEAU, H. In the egg of the ascidian *Phallusia mammillata*, removal of external Ca^{2+} modifies the fertilization potential, induces polyspermy, and blocks the resumption of meiosis. **Developmental Biology**, v. 160, n.1, p. 165-77, 1993.

GRAINGER, J. L.; WINKLER, M. M.; SHEN, S. S.; STEINHARDT, R. A. Intracellular pH controls protein synthesis rate in the sea urchin egg and early embryo. **Developmental Biology,** v. 68, p. 396-406, 1979.

GRANADOS-GONZALEZ, G.; MENDONZA-LUJABIO, I.; RODRIGUEZ, E.; GALINDO, B. E.; BELTRAN, C.; DARSZON, A. Identification of voltage-dependent Ca^{2+} channels in sea urchin sperm. **FEBS letters**, v. 579, p 6667-6672, 2005.

GRIFFIN, D. H. Effect of Electrolytes on Differentiation in Achlya sp. **Plant Physiol.**, v. 41, p. 1254-1256, 1966.

GUEDES, D. N.; SILVA, D. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, I. A. Calcium antagonism and the vasorelaxation of the rat aorta induced by rotundifolone. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 37, p. 1881-1887, 2004.

GUZMAN-GRENFELL, A. M.; GONZALEZ-MARTINEZ, M. T. Lack of Voltage-Dependent Calcium Channel Opening During the Calcium Influx Induced by Progesterone in Human Sperm. Effect of Calcium Channel Deactivation and Inactivation. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 117-122, 2004.

HAMDOUN A. M.; CHERRB, G. N.; ROEPKEC, T. A.; EPEL, D. Activation of multidrug efflux transporter activity at fertilization in sea urchin embryos *(Strongylocentrotus purpuratus)*. **Developmental Biology**, v. 276, p. 452–462, 2004.

HE, M.; BODI, I.; MIKALA, G.; SCHWARTZ, A.; Motif IIIS5 of L-type calcium channels is involved in the dihydropyridine binding site. **The Journal of biological chemistry**. V. 272, n. 5, p. 2629–2633, 1997.

HEILBRUNN, L. V. The action of calcium on muscle protoplasm. **Physiol. Zool.**, v. 13, p.88-94, 1940.

HERING, S.; ACZEL, S.; GRANBER, M.; DORING, F.; BERJUKOW, S.; MITTERDORFER, J.; SINNEGGER, M. J.; STRIESSNIG, J.; DEGTIAR, V. E.; WANG, Z.; GLOSSMANN, H. Transfer of high sensitivity for benzothiazepines from L-type to class A (BI) calcium channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 40, p. 24471–24475, 1996.

HINEGARDNER, R. T. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. **Biol. Bull.**, v. 137, p. 465-475, 1969.

HOCKERMAN, G. H.; JOHNSON, B. D.; ABBOTT, M. R.; SCHEUER, T.; CATTERALL, A. W. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIS6 and the pore region of the a1 subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, n. 30, p. 18759–18765, 1997.

HUBBARD, J. I.; JONES, S. F.; LANDAU, E. M. On the mechanism by which calcium and magnesium affect the spontaneous of transmitter from mammalian motor nerve terminals. **J. Physiol.**, v. 194, p. 355-380, 1968.

IINO, M. Spatiotemporal dynamics of Ca^{2+} signaling and its physiological roles. **Proc. Jpn. Acad., Ser. B,** v. 86, p. 244-256, 2010.

JAEGER W. Classical resistance mechanisms. **Int J Clin Pharmacol Ther.**, v. 47, p. 46-48, 2009.

JAFFE, L. A. Fast block to polyspermy in sea urchin eggs is electrically mediated. **Nature,** v. 261, p. 68-71, 1976.

JAFFE, L. F. Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. **Developmantal Biology**, v. 99, p. 265-276, 1983.

JONES, R. M. Calcium, its agonists and antagonists: past, present and future. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 80, p. 136-137, 1987.

KADOKAWA, Y.; DAN-SOHKAWA, M.; EGUCHI, M. G. Studies on the mechanism of blastula formation in starfish embryos denuded of fertilization membrane. **Cell Differentiation**, v. 19, n. 2, p. 79-88, 1986.

KAISER, N.; EDELMAN, I. S.; Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA,** v. 74, n. 2, p. 638-642, 1977.

KASS, G. E. N.; ORRENIUS, S.; Calcium Signaling and Cytotoxicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 1, p. 25-35, 1999.

KAZAZOGLOU, T.; SCHACKMANN, R. W.; FOSSET, M.; SHAPIRO, B. M. Calcium channel antagonists inhibit the acrosome reaction and bind to plasm membranes of sea urchin sperm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 1460-1464, 1985.

KHOSRAVANI, H.; ZAMPONI, G. W. Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 941–966, 2006.

KIRICHOK, Y.; KRAPIVINSKY, G.; CLAPHAM, D. E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. **Nature**, v. 427, p. 360-364, 2004.

KIRKMAN-BROWN, J. C.; BARRATT, C. L. R.; PUBLICOVER, S. J.; Slow calcium oscillations in human spermatozoa. **Biochem. J.**, v. 378, p. 827–832, 2004.

KOMOTO, C.; NAKAMURA, T.; YAMAMORI, M.; OHMOTO, N.; KOBAYASHI, H.; KUWAHARA, A.; NISHIGUCHI, K.; TAKARA, K.; TANIGAWARA, Y.; OKAMURA, N.; OKUMURA, K.; SAKAEDA, T.; Reversal effects of Ca^{2+} antagonists on multidrug resistance via down-regulation of MDR1 mRNA. **Kobe J. Med. Sci.**, v. 53, n. 6, p. 355-363, 2007.

KRASZNAI, Z.; MARIAN, T.; IZUMI, H.; DAMJANOVICH, S.; BALKAY, L.; TRON, L.; MORISAWA, M. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca^{2+} channels, leading to Ca^{2+} influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. **PNAS.**, v. 97, n. 5, p. 2052-2057, 1999.

LANDOWNE, D.; RITCHIE, J. M. On the control of glycogenolysis in mammalian nervous tissue by calcium. **J. Phymiol.**, v. 212, p. 503-517, 1971.

LEGATO, M. J.; LANGER, G. A. The subcellular localization of calcium ion in mammalian myocardium. **J. Cell. Biol.**, v. 41, n.2, p. 401–423, 1969.

LEHMANN-HORN, F.; JURKAT-ROTT, K. Voltage-Gated Ion Channels and Hereditary Disease. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p.1317-1355, 1999.

LIMA, E. J. B.; GOMES, P. B.; SOUZA, J. R. B. Reproductive biology of *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) in a northeast Brazilian sandstone reef. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 1, p. 51-59, 2009.

LINDSAY, L. L.; CLARK W. H. J.; Signal transduction during shrimp oocyte activation by extracellular Mg^{2+}: roles of inositol 1,4,5-trisphosphate, tyrosine kinases and G-proteins. **Development**, v. 120, p. 3463-3472, 1994.

LOEB, J. Reversible activation and incomplete membrane formation of the unfertilized eggs of the sea urchin. **Biol. Bull**, v. 29, p. 103-110, 1913.

LOO, T. W.; CLARKE, D. M. Mutational Analysis of ABC Proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 25, p. 51-64, 2008.

LOPEZ, M. G.; MORO, M. A.; CASTILLO, C. F.; ARTALEJO, C. R.; GARCIA, A. G. Variable, voltage-dependent, blocking effects of nitrendipine, verapamil, diltiazem, cinnarizine and cadmium on adrenomedullary secretion. **Br. J. Pharmacol.**, v. 96, p. 725-731, 1989.

MARIANTE, F. L. F.; LEMOS, G.; EUTRÓPIO, F. J.; GOMES, L. C. Biologia reprodutiva de Echinometra lucunter (Echinodermata: Echinoidea) na Praia da Costa, Vila Velha, Espírito Santo. **Zoologia**, v.26, n.4, p. 641–646, 2009.

MATSUYAMA, H.; UNNO, T.; KOMORI, S.; TAKEWAKI, T. Nitrergic Inhibition of Tachykininergic Neuro-Muscular Transmission via Cyclic GMP in the Hamster Ileum. **Journal of Veterinary Medical Science**, DOI: 10.1292/jvms.10-0425, 2010.

MATSUKAWA, T.; IKEDA, S.; IMAI, H.; YAMADA, M. Alleviation of the two-cell block of ICR mouse embryos by polyaminocarboxylate metal chelators. **Reproduction**, v. 124, p. 65–71, 2002.

MAZIA, D.; CLARK, J. M. Free Calcium in the action of stimulating agents on elodea cells. **Biol. Bull.**, v. 71, n. 2, p. 306-323, 1936.

MAZIA, D. The release of calcium in Arbacia eggs on fertilization. **Journal of Cellular and Comparative Physiology,** v.10, n. 3, p. 291-304, 1937.

MCCULLOH, D. H.; CHAMBERS, E. L.; Fusion of membranes during fertilization. **J. Gen. Physiol.**, v. 99, p.137–175, 1999.

MENGERINK, K. J.; VACQUIER, V. D. An ATP-binding cassette transporter is a major glycoprotein of sea urchin sperm membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 40729-40734, 2002.

MILITÃO, G. C. G.; PINHEIRO, S. M.; DANTAS, I. N. F.; PESSOA, C.; MORAIS, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Bioassay-guided fractionation of pterocarpans from roots of *Harpalyce brasiliana* Benth. **Bioorg. Med. Chem.,** v. 15, p. 6687–6691, 2007.

MILLER, A. L.; FLUCK, R. A.; MCLAUGHLIN, J. A.; JAFFE, L. F. Calcium buffer injections inhibit cytokinesis in *Xenopus* eggs. **Journal of Cell Science**, v. 106, p. 523-534, 1993.

MIYAKE, K.; MCNEIL, P. L.; A little shell to live in: evidence that the fertilization envelope can prevent mechanically induced damage of the developing sea urchin embryo. **Biol. Bull.**, v. 195, p. 214-215, 1998.

MIYAZAKI, S.; SHIRAKAWA, H.; NAKADA, K.; HONDA, Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. **Development Biology**, v. 158, n.1, p 62-78, 1993.

MIYAZAKI, S. Thirty years of calcium signals at fertilization. **Seminars in Cell & Developmental Biology,** v. 17, p.233-243, 2006.

MONROY, A. A centennial debt of developmental biology to the sea urchin. **Biol. Bull.,** v. 171, p. 509-519, 1986.

MONTENEGRO, R. C.; JIMENEZ, P. C.; FARIAS, R. A. F.; ANDRADE-NETO, M.; BEZERRA, F. S.; A. MORAES, M. E. A.; DE MORAIS, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic activity of pisosterol, a triterpene isolated from *Pisolithustinctorius* (Mich.: Pers.) Coker & Couch, 1928. **Z. Naturforsch. C**, v. 59, p. 519-522, 2004.

MONTERO, M.; BRINI, M.; MARSAULT, R.; ALVAREZ J.; SITIA R.; POZZAN, T.; RIZZUTO, R. Monitoring dynamic changes in free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. **The EMBO Journal**, v.14, n.22, p.5467-5475, 1995.

NAMEKATA, I.; TSUNEOKA, Y.; TAKAHARA, A.; SHIMADA, H.; SUGIMOTO, T.; TAKEDA, K.; NAGAHARU, M.; SHIGENOBU, K.; KAWANISHI, T.; TANAKA, H. Involvement of the Na+/Ca2+ Exchanger in the Automaticity of Guinea-Pig Pulmonary Vein Myocardium as Revealed by SEA0400. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 110, p. 111–116, 2009.

NAZARENKO, L. V.; ANDREEV, I. M.; LYUKEVICH, A. A.; PISAREVA, T. V.; LOS, D. A. Calcium release from Synechocystis cells induced by depolarization of the plasma membrane: MscL as an outward Ca2+ channel. **Microbiology**, v. 149, p. 1147–1153, 2003.

OBERDORF, J. A.; LEBECHE, D.; HEAD, J. F.; KAMINER, B. Identification of a Calsequestrin-like Protein from Sea Urchin Eggs. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 6806-6809, 1988.

PATEL, S.; DOCAMPO, R.; Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca^{2+} signaling. **Trends Cell Biol.**, v. 20, n. 11, p. 277-286, 2010.

PERDUE, D. O.; LAFAVRE, A. K.; LEOPOLD, A. C. Calcium in the Regulation of Gravitropism by Light. **Plant Physiol.**, v. 86, p. 1276-1280, 1988.

RINGER, S. A further contribution regarding the influence of the different constituints of the blood on the contraction of the heart. **J. Physiol.**, v. 4, p. 29-43, 1883.

RODRIGUEZ-TARDUCHY, G.; COLLINS, M.; LOPEZ-RIVAS, A. Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores. **The EMBO Journal**, v. 9, n. 9, p. 2997 - 3002, 1990.

ROTIN, D.; WAN, P.; GRINSTEIN, S.; TANNOCK, I. Cytotoxicity of compounds that interfere with the regulation of intracellular pH: A potential new class of anticancer drugs. **Cancer Research**, v. 47, p. 1497-1504, 1987.

SANGUINETTI, M. C.; KASS, R. S. Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. **Circ. Res.**, v. 55, p. 336-348, 1984.

SCHAFER, S.; BICKMEYER, U.; KOEHLER, A. Measuring Ca^{2+}-signaling at fertilization in the sea urchin *Psammechius miliaris*: Alterations of this Ca^{2+}-signal by cooper and 2,4,6-tribromophenol. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 150, p. 261-269, 2009.

SCHMIDT, T.; PATTON, C.; EPEL, D. Is there a role for Ca^{2+} influx during fertilization of the sea urchin egg? **Developmental Biology**, v. 90, p. 284-290, 1982.

SCHNEIDER, F. H.; SMITH, A. D.; WINKLER H.; Secretion from the adrenal medulla: Biochemical evidence for exocytosis. **Br. J. Pharmac. Chemother.**, v. 31, p. 94-104, 1967.

SCHROEDER, J. E.; MCCLESKEY, E. W.; Inhibition of Ca^{2+} currents by a P-opioid in a defined subset of rat sensory neurons. **The Journal of Neuroscience,** v.13, n. 2, p. 867-873, 1993.

SCHUSTER, A.; LACINOVA, L.; KLUGBAUER, N.; ITOL, H.; BIRNBAUMER, L.; HOFMANNL, F.; The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. **The EMBO Journal**, v.15, n.10, p.2365-2370, 1996.

SEMENOVA, M. N.; KISELYOV, A.; SEMENOV, V. V. Sea urchin embryo as a model organism for the rapid functional screening of tubulin modulators. **Biotechniques**, v. 40, p. 765-774, 2006.

SHEN, S. S.; BUCK, W. R. Sources of calcium in sea urchin eggs during the fertilization response. **Developmental Biology**, v. 157., p. 157-169, 1993.

SHUTTLEWORTH, T. Intracellular Ca^{2+} signaling in secretory cells. **The Journal of Experimental Biology**, v. 200, p. 303–314, 1997.

SINGH, B. N. The mechanism of action of calcium antagonists relative to their clinical applications. **Br. J. clin. Pharmac.**, v. 21, p. 109-121, 1986.

SMITH, M. J.; ARNDT, A.; GORSKI, S.; FAJBER, E. The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. **J Mol Evol**, v. 36, p. 545-554, 1993.

STEINHARDT, R. A.; ALDERTON, J. Intracellular free calcium rise triggers nuclear envelope breakdown in the sea urchin embryo. **Nature**, v. 332, p. 364-366, 1988.

STEINHARDT, R. A.; EPEL, D. Activation of sea urchin eggs by a calcium ionophore. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 5, p. 1915-1919, 1974.

STEPHANO, J. L.; GOULD M. C.; The intracellular calcium increase at fertilization in Urechis caupo oocytes: activation without waves. **Developmental Biology**, v. 191, p. 53-68, 1997.

STEPHENS, T. M. Characterization of pigment cell specific genes in the sea urchin embryo (*Strongilocentrotus purpuratus*). 2004. **Dissertação (Mestrado)**. Department of Biology, College of Sciences, University of Central Florida.

STRICKER, S. A. Repetitive calcium waves induced by fertilization in the nemertean worm *Cerebratulus lacteus.* **Developmental Biology**, v. 176, n. 2, p. 243-263, 1996.

STRICKER, S. A. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. **Developmental Biology**, v. 211, p. 157-176, 1999.

STRIESSNIG, J.; MURPHY, B. J.; CATTERALL, W. A.; Dihydropyridine receptor of L-type Ca^{2+} channels: Identification of binding domains for [^{3}H](+)-PN200-11O and

[^{3}H]azidopine within the al subunit. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, V. 88, P. 10769-10773, 1991.

TAKARA, K.; SAKAEDA, T.; TANIGAWARA, Y.; NISHIGUCHI, K.; OHMOTO, N.; HORINOUCHI, M.; KOMADA, F.; OHNISHI, N.; YOKOYAMA, T.; OKUMURA, K. Effects of 12 Ca antagonists on multidrug resistance, MDR1-mediated transport and MDR1 mRNA expression. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.16, p. 159–165, 2002.

TILNEY, L. G.; KIEHART, D. P.; SARDET C.; TILNEY, M. Polymerization of actin. IV. Role of Ca2+ and H+ in the assembly of actin and in membrane fusion in the acrosomal reaction of echinoderm sperm. **The Journal of Cell Biology**, v. 77, p. 536–560, 1978.

TSURUO, T.; LIDA, H.; TSUKAGOSHI, S.; SAKARAI, Y.; Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. **Cancer Res**., v. 41, p. 1967–1972, 1981.

TWIGG, J.; PATEL, R.; WHITAKER, M. J. Translational control of InsP3-induced chromatin condensation during the early cell cycles of sea urchin embryos. **Nature**, v. 332, p. 366-369, 1988.

UEHARA, A.; HUME, J. R. Interactions of organic calcium channels antagonists with calcium channels in single frog atrial cells. **J. Gen. Physiol.**, v. 85, p. 621-647, 1985.

VOGEL, S. S.; SMITH, R. M.; BAIBAKOV, B.; IKEBUCHI, Y.; LAMBERT, N. A.; Calcium influx is required for endocytotic membrane retrieval. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 96, p. 5019-5024, 1999.

WADA, H.; SATOH, N. phylogenetic relationships among extant classes of echinoderms, as inferred from sequences of 18S rDNA, coincide with elationships deduced from the fossil record. **J Mol Evol**, v. 38 p. 41-49, 1994.

WEINBERG, M. V.; MAIER, R. J. Peptide Transport in *Helicobacter pylori*: Roles of Dpp and Opp Systems and Evidence for Additional Peptide Transporters. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 9, p. 3392-3402, 2007.

WELLING, A.; KWAN, Y. W.; BOSSE, E.; FLOCKERZI, V.; F. HOFMANN, F.; KASS, R. S. Subunit-Dependent Modulation of Recombinant L-Type Calcium Channels. **Circulation Research**, v. 73, n. 5, p. 974-980, 1993.

WHITAKER, M. Calcium at fertilization and in early development. **Physiol. Rev.,** v. 86, p. 25-88, 2006.

WHITAKER, M. Calcium signaling in early embryos. **Phil. Trans. Soc. B**, v. 363, p. 1401-1418, 2008.

WHITAKER, M. SMITH, J. Introduction. Calcium signals and developmental patterning. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 363, p. 1307-1310, 2008.

WILT, F. H. Determination and morphogenesis in the sea urchin embryo. **Development**, v. 100, p. 559-575, 1987.

WINKLER, M. A.; DEWITT, L. M.; CHEUNG W. Y. Calmodulin and Calcium Channel Blockers. **Hypertension,** v. 9, n. 3, p. 217-223, 1987.

YANG, S.; BERGGREN, P. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic β-cell physiology and pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v. 27, n.6, p. 621–676, 2006.

YOUNG, L. G.; NELSON, L. The effect of heavy metal ions on the motility of sea urchin spermatozoa. **Bio. Bull.**, v. 147, p. 236-246, 1974.

ZHU, W.; SANTANA, L. F.; LAFLAMME, M. A. Local control of excitation-contraction coupling in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. **Plos One**, v. 4, n. 4, p. 1-11, 2009.

ZUCKER, R. S.; STEINHARDT, R. A.; Prevention of the cortical reaction in fertilized sea urchin eggs by injection of calcium-chelating ligands. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 541, n. 4, p. 459-466, 1978.

Anexos

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 11545-3	Data da Emissão: 08/10/2009 09:19

SISBIO

Dados do titular

Nome: Luis Fernando Marques dos Santos	CPF: 984.341.017-34
Título do Projeto: Estudo do Papel Biológico de Proteínas da Superfamília ABC no Desenvolvimento Embrionário de Ouriço-do-mar.	
Nome da Instituição : UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	CNPJ: 24.098.477/0001-10

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Estudo da Dinâmica do Desenvolvimento Embrionário	11/2007	02/2008
2	Estudo do papel de proteínas ABC na ferlização de gametas de Echinometra lucunter	03/2008	12/2008
3	Estudo do papel de proteínas ABC do desenvolvimento embrionário de Echinometra lucunter	12/2008	06/2009
4	Estudo do papel biológico de proteínas ABCB1 e ABCC1 em Larva plúteus de E. lucunter	07/2009	12/2011
5	Estudo do papel biológico do cálcio no desenvolvimento embrionário de Echinometra lucunter	10/2009	12/2011

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Jocelmo Cássio de Araujo Leite	Estudante de Mestrado	052.828.554-88	2896986 SSP-PB	Brasileira
2	Christiane Bezerra de Araujo	Estudante de Iniciação Científica	047.144.624-66	2651603 SSP-PB	Brasileira
3	Elis Torrezan Gonçalves Ramalho Nitão	Estudante de Iniciação Científica	057.364.894-81	3085888 SSP-PB	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PB	João Pessoa	Fora de UC

1	Atividades	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Echinometra lucunter (*Qtde: 160)

SISBIO

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 73954772