

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

JOCELMO CÁSSIO DE ARAUJO LEITE

Efeito de bloqueadores de transportadores ABC e derivados cumarínicos sobre gametas e embriões de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* (Echinodermata: echinoidea) expostos à radiação ultravioleta

JOÃO PESSOA – PB

2015

JOCELMO CÁSSIO DE ARAUJO LEITE

Efeito de bloqueadores de transportadores ABC e derivados cumarínicos sobre gametas e embriões de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* (Echinodermata: echinoidea) expostos à radiação ultravioleta

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Junior

JOÃO PESSOA – PB

2015

L533e Leite, Jocelmo Cássio de Araujo.
Efeito de bloqueadores de transportadores ABC e derivados cumarínicos sobre gametas e embriões de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* (Echinodermata:echinoidea) expostos à radiação ultravioleta / Jocelmo Cássio de Araujo Leite. - João Pessoa, 2015.
199f. : il.
Orientador: Luis Fernando Marques dos Santos
Coorientador: José Pinto de Siqueira Junior
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
1. Farmacologia. 2. Ouriços-do-mar. 3. Desenvolvimento embrionário. 4. Transportadores

JOCELMO CÁSSIO DE ARAUJO LEITE

Efeito de bloqueadores de transportadores ABC e derivados cumarínicos sobre gametas e embriões de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* (Echinodermata: echinoidea) expostos à radiação ultravioleta

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos

Orientador

Profa. Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua

Examinadora externa

Profa. Dra. Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo

Examinadora externa

Profa. Dra. Bagnólia Araújo Da Silva

Examinadora interna

Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante

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.

À todos aqueles que me acolheram e me incentivaram nessa jornada de dez anos em busca da realização de um sonho.

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos pela ciência, paciência, compreensão, 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 oito anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Junior por todo apoio dado, por compartilhar seus conhecimentos sobre radiação ultravioleta e por nos ter aberto as portas de seu laboratório.

Ao Professor Dr. José Maria Barbosa Filho por ter gentilmente cedido substâncias imprescindíveis para a execução desse trabalho.

Aos professores Dr. Isac Almeida de Medeiros, Dra. Bagnólia Araújo da Silva e Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas pelas relevantes contribuições no exame de qualificação.

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

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos em nome dos Professores Dr. Josean Fachine Tavares e Dr. José Maria Barbosa Filho pela competência pela qual coordenam esse Programa.

À Carol, secretária 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.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dessa pesquisa por meio do edital Universal (Número do processo: 471822/2009-4).

À Antônio Bosco, técnico do Laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento (LABID), 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 Elis Torrezan, que foi uma grande parceira no laboratório e uma grande amiga, por todo aprendizado compartilhado, todo companheirismo e por ser um exemplo de alegria e de amor à ciência.

À Suelenn Guedes, Raianna Boni e Tainá Myra por toda contribuição nesse trabalho e pela amizade construída.

Aos colegas e amigos do LABID: Andressa, Leonardo, Thais, Thyago e Raianna, e à todos que fizeram parte desse laboratório, pela boa convivência, gargalhadas e por toda a ajuda e incentivo.

Aos amigos do LABIPI: Cairé, Natan, Fernando, Lucas e à Profa. Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua pela boa convivência no laboratório e pela disponibilidade e prestatividade.

Aos alunos das turmas de farmácia 2012.1 e 2013.1, onde realizei o estágio docência, por toda contribuição na minha carreira profissional.

A todos os colegas e amigos da minha turma de doutorado pela amizade construída ao longo desses 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” e aos irmãos de EJC, que me ajudaram a permanecer firme e confiante nos momentos mais difíceis dessa jornada.

À Janaína Novaes Costa, José Costa Filho e a todos os irmãos da Comunidade Católica Nova Berith, por me ajudarem a enxergar a vida com os olhos

da fé, por me mostrarem que a convivência fraterna ajuda a tornar a caminhada mais fácil e agradável e por me ajudarem a ser sorriso de Deus para o mundo.

À Luiza Gorenstin, por todo amor e carinho, por acreditar em mim, mesmo nos momentos em que nem eu mesmo acredito, por me ensinar a beleza de compartilhar a vida com quem amamos e por tornar a 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, por nunca desistir de mim, e por me ajudar a enxergar a vida com alegria e esperança.

Agradeço de coração!

*Não basta a leitura sem a unção,
não basta a especulação sem a devoção,
não basta a pesquisa sem maravilhar-se,
não basta a circunspecção sem o júbilo,
o trabalho sem a piedade,
a ciência sem a caridade,
a inteligência sem a humildade,
o estudo sem a graça”.*

São Boaventura de Bagnoregio

Resumo

RESUMO

Os níveis ambientais de radiação ultravioleta (UV) têm aumentado significativamente nas últimas décadas e a tendência é que os valores elevados permaneçam até meados deste século. Gametas e embriões de organismos marinhos, cujo desenvolvimento embrionário ocorre no ambiente externo, são particularmente sensíveis às radiações UVA e UVB. A primeira linha de defesa desses organismos contra estresses químicos e físicos é a atividade de efluxo de bombas conhecidas como transportadores ABC. O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito fotoprotetor de transportadores ABC em gametas e embriões do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* expostos à UVA ou UVB, bem como investigar a fotoatividade e a atividade bloqueadora de proteínas ABC da cumarina e de seus derivados em gametas e embriões de *E. lucunter*. Os gametas ou embriões foram expostos à UVA (3,6 a 14,4 kJ m⁻²) ou à UVB (0,112 a 14,4 kJ m⁻²), na presença ou ausência dos bloqueadores de transportadores ABC: reversina205 (bloqueador de ABCB1); e MK571 (bloqueador de ABCC1). O desenvolvimento embrionário foi monitorado em microscopia óptica comum. Os gametas e zigotos de *E. lucunter* foram resistentes à UVA. A resistência das células supracitadas à UVB foi fortemente associada à intensidade da atividade dos transportadores ABC (zigotos > óvulos > espermatozoides). O bloqueio dos transportadores ABCB1 e ABCC1 promoveu inibição no desenvolvimento de embriões derivados de espermatozoides expostos à UVA. O bloqueio do transportador ABCC1 aumentou, em 35,9 ± 5,8%, os danos aos óvulos expostos à UVB enquanto que o bloqueio de ABCB1 intensificou, em 36,1 ± 2,7%, os danos aos zigotos, induzidos pela UVB. Os bloqueadores de transportadores ABC também induziram malformações ao desenvolvimento larval derivado de espermatozoides ou óvulos expostos à UVB. Entretanto, a atividade dos transportadores ABC não foi afetada pela exposição à UVB. Adicionalmente, demonstramos a atividade fotoprotetora da cumarina e seus derivados contra os efeitos deletérios da UVB em gametas e células embrionárias de *E. lucunter*, e a atividade bloqueadora de transportadores ABC da 3-hidroxicumarina. Em conclusão, o presente estudo é o primeiro relato do papel protetor de transportadores ABC contra os efeitos deletérios da UVA ou UVB em gametas e células embrionárias de ouriços-do-mar. Além disso, esse trabalho também relata, de forma inédita, a atividade fotoprotetora da cumarina e da 3-hidroxicumarina contra a UVB em gametas e embriões irradiados. Estudos posteriores serão necessários para a inserção terapêutica desses compostos para o tratamento de diversas enfermidades relacionadas com a exposição excessiva à UVB.

Palavras-chave: Ouriços-do-mar; Desenvolvimento embrionário; Transportadores ABC; Cumarinas; Radiação UV.

Abstract

ABSTRACT

Ultraviolet radiation (UV) environmental levels have increased in last years and high values are expected until half of this century. Gametes and embryos of marine organisms, whose embryonic development occurs externally, are particularly sensitive to UVA and UVB radiations. The first line of cellular defense against chemical or physical stress is the activity of ABC transporters. The aim of present work was investigate the involvement of ABC transporters on UVA or UVB effects on gametes or embryos of the sea urchin *Echinometra lucunter*, and investigate the photoactivity and the ABC transporter blocker activity of coumarin and 3-hydroxycoumarin in gametes and embryos of *E. lucunter*. Gametes or embryos were exposed to UVA (3.6 – 14.4 kJ m⁻²) or UVB (0.112 – 14.4 kJ m⁻²), and the embryonic development was monitored by optical microscopy at different developmental stages in the presence or absence of the ABC-transporter blockers reversin205 (ABCB1 blocker) ou MK571 (ABCC1 blocker). *E. lucunter* eggs, spermatozoa and embryos were resistant to UVA exposure. Resistance to the harmful effects of UVB was strongly associated to ABC transporter activity (embryos > eggs > spermatozoa). ABCB1 or ABCC1 blockage promoted injurious effects on spermatozoa exposed to UVA. ABCC1 transporter blockage increased UVB-dependent damage in eggs while ABCB1 transporter inhibition increased harmful effects of UVB in embryonic cells. ABC transporters blockers also induced abnormalities in larval development derived from spermatozoa or eggs irradiated to UVB. However, ABC transporter activity was not affected by UVB exposure. Additionally, we demonstrate the photoprotective activity of coumarin and 3-hydroxycoumarin against the deleterious effects of UVB on *E. lucunter* gametes and embryonic cells, and the ABC transporter blocker activity of the 3-hydroxycoumarin. In conclusion, the present study is the first report of the protective role of ABC transporters against UVA and UVB injurious effects in sea urchins gametes and embryonic cells. Furthermore, our results inserts new alternative for the treatment of various diseases related to UVB excessive exposure and also provides alternatives for clinical reversal of multidrug resistance phenotype.

Keywords: Sea urchin; Embryonic development; ABC transporters; Coumarins; UV radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do espectro de radiação solar.....	02
Figura 2	Representação estrutural esquemática do transportador ABCB1.	08
Figura 3	Representação estrutural esquemática do transportador ABCC1.	08
Figura 4	Painel esquemático da quantidade de genes codificadores de transportadores ABC em humanos, <i>zebrafish</i> , tunicados e ouriços-do-mar e sua distribuição nas subfamílias A-H.....	14
Figura 5	Esquema representativo do padrão de clivagem de ouriços-do-mar.....	18
Figura 6	Ouriços-do-mar da espécie <i>Echinometra lucunter</i> em seu habitat.....	25
Figura 7	Cumarina e seus derivados	27
Figura 8	Identificação do sexo dos animais.....	28
Figura 9	Obtenção dos gametas por meio da injeção de KCl (0,5 M) na cavidade peritoneal de um ouriço-do-mar.....	29
Figura 10	Coleta dos gametas masculinos.....	30
Figura 11	Coleta dos gametas femininos.....	31
Figura 12	Protocolo experimental do ensaio do efeito da UVA ou UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides (A), óvulos (B) ou zigotos (C)	34
Figura 13	Protocolo experimental do ensaio do efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides e óvulos.....	36
Figura 14	Representação esquemática do ensaio da oxidação da diclorofluoresceína H ₂ DCF para avaliar os níveis intracelulares de ROS.....	38
Figura 15	Protocolo experimental do ensaio da oxidação da H ₂ DCF.....	40
Figura 16	Protocolo experimental do ensaio do efeito da UVB sobre o desenvolvimento larval: exposição de gametas, zigotos e embriões no estágio de prisma.....	42

Figura 17	Protocolo experimental do ensaio do efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de espermatozoides (A) ou óvulos (B) .	44
Figura 18	Protocolo experimental do ensaio do efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de zigotos (10 ou 40 minutos após a fertilização).....	45
Figura 19	Protocolo experimental do ensaio do efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento larval: tratamento e exposição de gametas, zigotos e embriões no estágio de prisma.....	47
Figura 20	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 agentes químicos ou físicos sobre os transportadores ABC.....	49
Figura 21	Protocolo experimental do ensaio de acúmulo de C-AM.....	51
Figura 22	Representação esquemática do ensaio da resistência à VL.....	53
Figura 23	Protocolo experimental do ensaio da resistência à VL.....	55
Figura 24	Protocolo experimental do ensaio do efeito da cumarina e seus derivados sobre o desenvolvimento embrionário.....	56
Figura 25	Protocolo experimental do ensaio da fotoatividade da cumarina e seus derivados sobre zigotos expostos à UVB: tratamento pré-irradiação.....	57
Figura 26	Protocolo experimental do ensaio da fotoatividade da cumarina e da 3-hidroxycumarina sobre zigotos expostos à UVB: tratamento pós-irradiação.....	58
Figura 27	Protocolo experimental do ensaio da fotoatividade da cumarina e da 3-hidroxycumarina sobre gametas expostos à UVB: tratamento pré-irradiação (A-B) e tratamento pós-irradiação (C-D).....	60
Figura 28	Protocolo experimental do ensaio de acúmulo intracelular de C-AM para investigar o efeito da cumarina e da 3-hidroxycumarina na modulação de transportadores ABC.....	62
Figura 29	Protocolo experimental do ensaio de resistência à VB para investigar o efeito da cumarina e da 3-hidroxycumarina na modulação de transportadores ABC.....	64
Figura 30	Fotomicrografias de larvas plúteos derivadas de gametas,	

	zigotos, ou embriões no estágio de prisma, expostos à UVB.....	94
Figura 31	Fotomicrografias de larvas plúteos derivadas de gametas, zigotos e embriões no estágio de prisma, tratados com bloqueadores de proteína ABC e posteriormente expostos à UVB.....	109
Figura 32	Fotomicrografias de embriões derivados de óvulos ou embriões expostos à UVB e incubados com C-AM.....	112
Figura 33	Fotomicrografias de embriões de 2-4 células tratados com VP, cumarina ou 3-cumarinol e incubados com C-AM.....	128

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Efeito da UVA sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides (A), óvulos (B) ou embriões (C) na ausência de luz branca.....	68
Gráfico 2	Efeito da UVA na concentração intracelular de ROS em espermatozoides irradiados.....	70
Gráfico 3	Efeito da UVA na concentração intracelular de ROS em óvulos (A) ou embriões (B) irradiados.....	71
Gráfico 4	Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de espermatozoides na ausência de luz branca.....	73
Gráfico 5	Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de óvulos na ausência de luz branca.....	75
Gráfico 6	Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de óvulos e espermatozoides na ausência de luz branca.....	77
Gráfico 7	Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de zigotos (10 minutos após a fertilização) na ausência de luz branca.....	79
Gráfico 8	Efeito da UVB na concentração intracelular de ROS em espermatozoides irradiados.....	82
Gráfico 9	Efeito da UVB na concentração intracelular de ROS em óvulos (A) ou embriões irradiados.....	83
Gráfico 10	Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de espermatozoides na presença de luz branca.....	85
Gráfico 11	Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de óvulos na presença de luz branca.....	88
Gráfico 12	Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de zigotos (10 minutos após a fertilização) na presença de luz branca.....	91
Gráfico 13	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC <i>per si</i> sobre o desenvolvimento embrionário.....	96

Gráfico 14	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o estágio de primeira clivagem e o estágio de segunda clivagem: tratamento e exposição de espermatozoides à UVA (A-B) ou à UVB (C-D).....	98
Gráfico 15	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o estágio de primeira clivagem (A) e o estágio de segunda clivagem (B): tratamento e exposição de óvulos à UVA (A-B) ou à UVB (C-D).....	100
Gráfico 16	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o estágio de primeira clivagem e o estágio de segunda clivagem: tratamento e exposição de zigotos (10 minutos após a fertilização) à UVA (A-B) ou à UVB (C-D).....	102
Gráfico 17	Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de zigotos (40 minutos após a fertilização) à UVB.....	104
Gráfico 18	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o estágio de primeira clivagem (A) e no estágio de segunda clivagem (B): tratamento e exposição de zigotos (40 minutos após a fertilização).....	106
Gráfico 19	Efeito da exposição à UVB sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio de acúmulo da C-AM.....	111
Gráfico 20	Efeito da exposição à UVB sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio da resistência à vimblastina, mediada por transportadores ABC.....	114
Gráfico 21	Efeito da cumarina e seus derivados sobre a progressão para o estágio de primeira clivagem (A), de segunda clivagem (B) e para o estágio de mórula (C).....	116
Gráfico 22	Efeito fotoprotetor da cumarina e seus derivados sobre zigotos expostos à UVB: tratamento prévio à irradiação.....	119
Gráfico 23	Efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxycumarina sobre zigotos expostos à UVB: tratamento posterior à irradiação.....	121
Gráfico 24	Efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxycumarina sobre gametas expostos à UVB: tratamento prévio à irradiação.....	123
Gráfico 25	Efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxycumarina sobre gametas expostos à UVB: tratamento após a irradiação.....	125
Gráfico 26	Efeito da cumarina e da 3-hidroxycumarina sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio de acúmulo da C-AM.....	127

Gráfico 27	Efeito da cumarina e do 3-hidroxycumarina sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio de resistência à vimblastina.....	130
-------------------	---	-----

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1:	Eventos iniciais e tardios da fertilização e do desenvolvimento embrionário de Ouriços-do-mar.....	16
Quadro 2:	Comparação entre a sensibilidade à radiação UV em diversas espécies de ouriços-do-mar.....	138
Tabela 1:	Valores da DE_{50} para o efeito inibitório da UVB sobre o desenvolvimento embrionário derivado de espermatozoides, óvulos ou zigotos irradiados.....	80
Tabela 2:	Valores da DE_{50} para o efeito inibitório da UVB sobre o desenvolvimento embrionário derivado de espermatozoides irradiados na presença ou ausência de luz branca.....	86
Tabela 3:	Valores da DE_{50} para o efeito inibitório da UVB sobre o desenvolvimento embrionário derivado de óvulos irradiados na presença ou ausência de luz branca.....	89
Tabela 4:	Valores da DE_{50} para o efeito inibitório da UVB sobre o desenvolvimento embrionário derivado de zigotos irradiados na presença ou ausência de luz branca.....	92
Tabela 5:	Valores da CE_{50} para o tratamento da cumarina e seus derivados sobre o desenvolvimento embrionário	117

LISTA DE ABREVIATURAS

C-AM	Calceína-AM
CFC	Clorofluorcarbono
CIE	Comissão Internacional de Iluminação (do francês, <i>Commission International de l'Eclairage</i>)
CE₅₀	Concentração de uma substância que induz 50% de efeito máximo
DE₅₀	Dose de radiação ultravioleta que induz 50% do efeito máximo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPM	Erro padrão da média
FAD	Dinucleotídio de flavina e adenina
FSW	Água do mar filtrada (do inglês, <i>Filtered Sea Water</i>)
H₂DCF-DA	2',7' diclorofluoresceína diacetato
ICMbio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IF	Infravermelho
IUV	Índice ultravioleta
MDR	Resistência à múltiplas drogas (do inglês, <i>multidrug resistance</i>)
mFSW	Água do mar filtrada em filtros <i>millipore</i> (do inglês, <i>millipore Filtered Sea Water</i>)
MIF	Média da intensidade de fluorescência
MRP	Proteína associada a resistência à múltiplas drogas (do inglês, <i>multidrug resistance protein</i>)
NDB	Domínio de ligação ao nucleotídeo (do inglês, <i>nucleotide binding domain</i>)
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa (do inglês, <i>Photosynthetically active radiation</i>)
P-gP	Glicoproteína-P
REV	Reversina205
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SOD	Superóxido dismutase
TMD	Domínio transmembrana (do inglês, <i>transmembrane domain</i>)
u.a.	Unidades arbitrárias de fluorescência
UV	Ultravioleta

UVA	Ultravioleta do tipo A
UVB	Ultravioleta do tipo B
UVC	Ultravioleta do tipo C
VL	Vimblastina
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	Radiação ultravioleta	02
1.2	Transportadores ABC	05
1.3	Ouriços-do-mar como modelo experimental	11
1.4	Aspectos morfológicos e moleculares da fertilização e desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar	14
1.5	O desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar como modelo experimental para prospecção de compostos fotoativos ou com atividade bloqueadora de transportadores ABC	19
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	Substâncias utilizadas.....	26
3.1.3	Soluções estoques.....	26
3.1.4	Água do mar filtrada em filtros <i>millipore</i>	27
3.2	MÉTODOS.....	28
3.2.1	Identificação do sexo dos animais.....	28
3.2.2	Obtenção dos gametas.....	28
3.2.3	Fertilização <i>in vitro</i>	31
3.2.4	Irradiação UVA e UVB	31
3.2.5	Protocolos experimentais	32
3.2.5.1	Efeito da UVA ou UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides, óvulos ou zigotos	32
3.2.5.2	Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides e óvulos.....	35
3.2.5.3	Efeito da UVA ou UVB na concentração intracelular de ROS em	

	espermatozoides, óvulos ou zigotos irradiados.....	37
3.2.5.4	Efeito da UVB sobre o desenvolvimento larval: exposição de gametas, zigotos e embriões no estágio de prisma.....	41
3.2.5.5	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de espermatozoides ou óvulos.....	43
3.2.5.6	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de zigotos (10 ou 40 minutos após a fertilização).....	45
3.2.5.7	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento larval: tratamento e exposição de gametas, zigotos e embriões no estágio de prisma.....	46
3.2.5.8	Efeito da UVB sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio de acúmulo intracelular de C-AM	48
3.2.5.9	Efeito da UVB sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio da resistência à vimblastina.....	52
3.2.5.10	Efeito da cumarina e seus derivados sobre o desenvolvimento embrionário inicial.....	56
3.2.5.11	Fotoatividade da cumarina seus derivados sobre zigotos expostos à UVB: tratamento pré-irradiação.....	57
3.2.5.12	Fotoatividade da cumarina e da 3-hidroxycumarina sobre zigotos expostos à UVB: tratamento pós-irradiação.....	58
3.2.5.13	Fotoatividade da cumarina seus derivados sobre gametas expostos à UVB: tratamento pré-irradiação.....	59
3.2.5.14	Efeito da cumarina e do 3-cumarinol na atividade de transportadores ABC – Ensaio de acúmulo intracelular da C-AM	61
3.2.5.15	Efeito da cumarina e do 3-cumarinol na atividade de transportadores ABC – Ensaio de resistência à vimblastina.....	63
3.2.6	Análise estatística.....	65
4	RESULTADOS.....	66
4.1	Efeito da UVA sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides, óvulos ou embriões na ausência de luz branca.....	67
4.2	Efeito da UVA na concentração intracelular de ROS em espermatozoides, óvulos ou zigotos irradiados.....	69
4.3	Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides na ausência de luz branca.....	72

4.4	Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de óvulos na ausência de luz branca.....	74
4.5	Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides e óvulos na ausência de luz branca.....	76
4.6	Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de zigotos (10 minutos após a fertilização) na ausência de luz branca.....	78
4.7	Comparação da sensibilidade de espermatozoides, óvulos e zigotos à irradiação com UVB	80
4.8	Efeito da UVB na concentração intracelular de ROS em espermatozoides, óvulos ou zigotos irradiados.....	81
4.9	Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides na presença de luz branca.....	84
4.10	Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de óvulos na presença de luz branca.....	87
4.11	Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de zigotos (10 minutos após a fertilização) na presença de luz branca.....	90
4.12	Efeito da UVB sobre o desenvolvimento larval: exposição de espermatozoides, óvulos, zigotos e embriões no estágio de prisma.....	93
4.13	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de espermatozoides.....	95
4.14	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de óvulos..	99
4.15	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de zigotos (10 minutos após a fertilização).....	101
4.16	Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de zigotos (40 minutos após a fertilização).....	103
4.17	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de zigotos (40 minutos após a fertilização).....	105
4.18	Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de	

	gametas, zigotos e embriões no estágio de prisma.....	107
4.19	Efeito da UVB sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio de acúmulo intracelular de C-AM.....	110
4.20	Efeito da UVB sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio da resistência à vimblastina.....	113
4.21	Efeito da cumarina e seus derivados sobre o desenvolvimento embrionário inicial.....	115
4.22	Efeito fotoprotetor da cumarina e seus derivados sobre zigotos expostos à UVB: Tratamento prévio à irradiação.....	118
4.23	Efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxicumarina sobre zigotos expostos à UVB: Tratamento após a irradiação.....	120
4.24	Efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxicumarina sobre gametas expostos à UVB: Tratamento prévio a irradiação.....	122
4.25	Efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxicumarina sobre gametas expostos à UVB: Tratamento após a irradiação.....	124
4.26	Efeito da cumarina e da 3-hidroxicumarina na atividade de transportadores ABC – Ensaio de acúmulo da C-AM.....	126
4.27	Efeito da cumarina e da 3-hidroxicumarina na atividade de transportadores ABC – Ensaio de resistência à vimblastina.....	129
5	DISCUSSÃO.....	131
6	CONCLUSÃO.....	149
	REFERÊNCIAS.....	151

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Radiação ultravioleta

A radiação solar é a principal fonte de energia na maioria dos ecossistemas naturais. De acordo com o comprimento de onda, a mesma é dividida em três segmentos principais: o infravermelho (IF) (> 800 nm), a radiação fotossinteticamente ativa (PAR), também chamada de luz visível ou luz branca (400 – 800 nm), e a radiação ultravioleta (UV) (100 - 400 nm) (figura 1) (HOLLOSY, 2002).

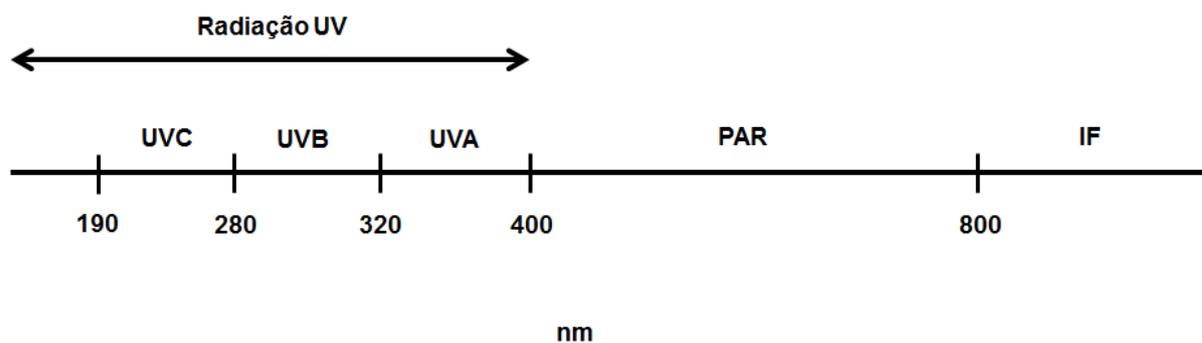


Figura 1: Representação esquemática do espectro de radiação solar.

A luz UV compreende ondas eletromagnéticas mais energéticas. De acordo com a comissão internacional de iluminação (CIE), a radiação UV é classificada em três tipos: UVA (320 – 400 nm), UVB (280 – 320 nm) e UVC (190 – 280 nm) (DIFFEY, 2002).

Os trabalhos que possibilitaram a descoberta e a elucidação das propriedades da radiação UV datam desde o século XVII. No entanto, apenas no início do século XX, com a observação de que o contato com essa radiação pode provocar problemas à saúde, inúmeros cientistas foram motivados a investigar mais detalhadamente os efeitos da luz UV nos organismos vivos, especialmente nos seres humanos (HOCKBERGER, 2002). O interesse nessa área aumentou

significativamente no final do século XX com a descoberta da depleção do ozônio da estratosfera terrestre devido às atividades antropogênicas (MCKENZIE et al., 2003).

O ozônio compõe a atmosfera em quantidades mínimas, concentrando-se principalmente entre 15 e 40 km acima da superfície terrestre. Essa região é responsável pela absorção de parte da radiação UV solar incidente (WMO, 2011). Os primeiros registros referentes à diminuição da camada de ozônio foram realizados na Antártida, na primavera dos anos 80 (FARMAN et al., 1985; STOLARSKI, 1988; SMITH et al., 1992). Weatherhead e Andersen (2006) documentaram uma redução significativa desta camada até meados dos anos 90. A partir dessa década, a depleção do ozônio alcançou níveis incomuns, atingindo não só o continente antártico, mas também o continente americano até a latitude de 38° Sul (Chile e Argentina) (BIANCIOTTO et al., 2003; DIAZ et al., 2006). No ano de 2000, a extensão do buraco da camada de ozônio chegou a 30 km² e estudos estimam que os níveis de ozônio estratosféricos permaneçam baixos até metade do século XXI (MCKENZIE et al., 2003).

O ciclo natural do ozônio pode ser perturbado pela interação com compostos antropogênicos, comumente chamados de clorofluorcarbonos (CFCs) (MOLINA et al., 1987). Outros estudos têm demonstrado que a redução na camada de ozônio parece também depender de uma série de processos químicos iniciados com a formação de nuvens polares estratosféricas ricas em ácido nítrico. Esse óxido nítrico é derivado da emissão direta pela ação microbiana no solo ou derivado de fatores antropogênicos. As nuvens ricas em óxido nítrico atuam como catalisadores para a liberação de moléculas de clorina e bromina, que na estratosfera podem reagir com as moléculas de ozônio causando a sua degradação (DIAZ et al., 2006).

A eficiência da capacidade absorptiva da camada de ozônio depende do comprimento de onda da radiação UV. A incidência da UVA não é atenuada pela camada de ozônio e, por isso, apresenta o maior nível de alcance na superfície terrestre (90 – 95% de toda radiação UV solar) (XU;SULLIVAN, 2010). Por outro lado, a incidência da radiação UVB é fortemente afetada pela presença da camada de ozônio, sendo que a mesma pode aumentar em até três vezes como decorrência da redução dos níveis de ozônio estratosférico (CALDWELL et al., 1989). Uma diminuição de 10% na camada de ozônio pode causar um aumento de 5% na incidência da radiação UVB, no comprimento de onda de 320 nm. No entanto, essa mesma diminuição poderia aumentar em 100% a incidência de UVB na faixa de 300

nm (FREDERICK et al., 1989). A radiação UVC, contudo, apesar de ser altamente energética e apresentar uma natureza mutagênica e ser extremamente prejudicial aos sistemas biológicos, é completamente absorvida pelo ozônio e pelas moléculas de oxigênio da atmosfera antes de atingir a superfície da terra (KIM;SANCAR, 1993; NICHOLS;KATİYAR, 2010; XU;SULLIVAN, 2010).

Para manifestar seus efeitos nas células, a energia eletromagnética inerente à radiação UV deve ser absorvida pelos cromóforos celulares e convertida em energia química. O DNA, as porfirinas, o ácido urônico e os aminoácidos aromáticos são alguns exemplos de cromóforos celulares (XU;FISHER, 2005).

Os danos celulares provocados pela radiação UV podem ocorrer por reações fotoquímicas (efeitos diretos) ou por reações fotodinâmicas (efeitos indiretos). Nos efeitos diretos da radiação UV, moléculas que absorvem nessa região do espectro, como proteínas e ácidos nucleicos, são fotoquimicamente transformadas ou degradadas, resultando numa perda parcial ou total de suas funções biológicas. Nos efeitos indiretos, a radiação UV pode ser absorvida por componentes celulares, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como oxigênio singlete (1O_2), ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Tais espécies reagem com lipídios, proteínas e DNA, inativando suas funções biológicas (LESSER, 2010). As ROS também podem atuar como mensageiros químicos, modulando a expressão de determinados genes pela ativação de vias de transdução de sinal. Dessa forma, a exposição à radiação UV pode afetar uma variedade de eventos de sinalização celular, causando modificações no perfil da expressão gênica (AFAQ et al., 2005).

A despeito de seus efeitos maléficos, alguns processos fisiológicos necessitam de uma exposição à luz UV, como é o caso da conversão do 7-deidrocolesterol em pré-vitamina D3, a qual sofre uma isomerização espontânea para formar a vitamina D3. Esse secoesteroide é responsável por mediar vários efeitos biológicos, como a manutenção do metabolismo ósseo, o crescimento e a diferenciação celular, além de participar nas funções cardíacas e imunológicas (AMANO et al., 2009; BIGGS et al., 2010). No entanto, a exposição excessiva à radiação UV pode induzir graves efeitos patológicos, tais como: câncer de pele (SETLOW et al., 1993), imunossupressão (HALLIDAY et al., 1998), e cegueira (VERHOEFF, 1916), entre outros danos. Em níveis ecossistêmicos, a radiação UV

pode reduzir a biomassa e mudar a composição de espécies em determinada região (BISCHOF et al., 2006; HADER et al., 2007)

Um dos ambientes mais susceptíveis à radiação UV, principalmente à UVB, é o marinho. Os efeitos deletérios da UVB em ecossistemas aquáticos têm sido relatados desde 1925. A UVB pode penetrar até uma profundidade de 20 m, dependendo das propriedades ópticas da coluna de água, prejudicando, assim, as formas de vida bentônica e planctônica (SMITH et al., 1992; ADAMS;SHICK, 2001). Diversos estudos demonstraram que os níveis ambientais de UVB promovem efeitos deletérios em fitoplanctons, cianobactérias, algas, zooplanktons e corais (HE et al., 2002; JOHANSSON;SNOEIJIS, 2002; LEVY et al., 2003; SHELLY et al., 2003; LEECH et al., 2005). Além disso, animais de fertilização e desenvolvimento embrionário externo também são particularmente sensíveis à UVB, pois os gametas, os embriões e as larvas desses organismos ficam dispersos na coluna de água (HADER et al., 2007). Diversos estudos apontam os ouriços-do-mar como um dos animais mais susceptíveis à radiação, uma vez que os embriões e larvas são de tamanho reduzido, apresentam uma rápida taxa de replicação e morfogênese, e não contam com um tecido especializado na proteção contra a radiação UV (BONAVENTURA et al., 2005).

1.2 Transportadores ABC

Gametas e embriões de organismos marinhos apresentam como primeira linha de defesa celular contra estresses químicos, físicos e biológicos a ativação de proteínas de resposta ao estresse (BONAVENTURA et al., 2005; BONAVENTURA et al., 2006; RUSSO et al., 2010; RUSSO et al., 2014), assim como a atividade de efluxo mediada por ATPases de membrana, conhecidas como transportadores ABC (DEAN et al., 2001).

Os transportadores ABC (do inglês *ATP binding cassette*) constituem a maior família de proteínas transmembrana já descrita na literatura, e estão envolvidos no transporte de diversos íons e substâncias, incluindo hormônios, esteroides, lipídeos, oligopeptídeos, nucleotídeos, metais pesados, e xenobióticos (GOTTESMAN;PASTAN, 1993). Os transportadores ABC são encontrados tanto na membrana plasmática (ABCB1/P-gp, ABCC7/CFRT, ABCC1/MRP, ABCC8/SUR),

quanto no sistema de endomembranas, tais como: na membrana do retículo endoplasmático (ABCB2/TAP1, ABCB3/TAP2), na membrana de vacúolos digestivos (PGH1), nas membranas de peroxissomos (ABCD2/ALDP, ABCD3/PMP70), na membrana mitocondrial (MTABC) e no envelope nuclear (ABCB1). Além disso, são também encontrados na membrana plasmática de procariotos (Nor-A, Sav1866 e MsbA) (HIGGINS, 1992; CHILDS;LING, 1994; GIBBONS et al., 2003; BABAKHANIAN et al., 2007; BURKE;ARDEHALI, 2007).

A família de proteínas ABC está diretamente associada ao fenótipo de resistência à múltiplas drogas (MDR, do inglês *multidrug resistance*) (JAEGER, 2009). O fenótipo MDR é conhecido desde os trabalhos pioneiros de Biedler e Riehm (1970) e é caracterizado pela resistência de uma determinada célula à ação citotóxica de drogas não correlacionadas química ou farmacologicamente. A MDR é considerada um grave problema de saúde pública, pois está associada à falência terapêutica no tratamento de diversas patologias, como em alguns tipos de cânceres, parasitoses, e infecções bacterianas (CHILDS;LING, 1994; LAGE, 2003).

Inicialmente descritos em linhagens tumorais de mamíferos, os transportadores ABC vêm sendo observados, também, em diversos outros organismos, onde podemos destacar: bactérias, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; fungos, como *Aspergillus nidulans* e *Candida albicans*; protozoários, como *Leishmania* e *Tripanossoma* e invertebrados marinhos, como o *Asterina miniata* (estrela-do-mar) e *Strongylocentrotus purpuratus* (ouriço-do-mar) (HIGGINS, 1992; WOLFGER et al., 2001; MENGERINK;VACQUIER, 2002; PEREZ-VICTORIA et al., 2002; GIBBONS et al., 2003; ROEPKE et al., 2006).

Os transportadores ABC são glicoproteínas integrais caracterizadas, estruturalmente, pela presença de quatro domínios: dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBDs), que são altamente conservados e responsáveis pela hidrólise de ATP que direciona o transporte ativo, e dois domínios transmembranares (TMDs). Os NBDs contêm em sua sequência os motivos Walker A e Walker B (WALKER et al., 1982) que são comuns a todas as proteínas que interagem com o ATP. Os domínios TMDs são compostos por α -hélices múltiplas (geralmente seis), que formam a estrutura pela qual os compostos atravessam a membrana (LOO;CLARKE, 2008). Os TMDs apresentam um sítio de ligação a moléculas hidrofóbicas que é capaz de se ligar a duas ou três moléculas simultaneamente (ORLOWSKI et al., 1996; DEY et al., 1997)

A superfamília de proteínas ABC está dividida em oito subfamílias (A-H), que se diferenciam quanto à homologia, número e arranjo dos NDBs e TMDs, localização celular e função. Os membros das subfamílias B, C e G estão intimamente relacionados com o transporte de substâncias, transportando-as para fora da célula, em um processo dependente de energia (HIGGINS, 2007).

O primeiro membro da superfamília ABC descoberto foi a ABCB1, que foi nomeada inicialmente de glicoproteína P (Pg-P – figura 2). A Pg-P foi isolada pela primeira vez, por Juliano e Ling (1976), em células de hamster chinês resistentes à colchicina. Uma década mais tarde, Fojo e colaboradores (1986) mapearam o gene codificador da ABCB1 na região cromossômica 7q21.12. O transportador ABCB1 é conhecido por atuar principalmente no metabolismo de esteroides e na proteção contra compostos tóxicos (KUO, 2009). Sua expressão é frequentemente observada em diferentes cânceres humanos e é fisiologicamente expressa nos rins, no trato gastrointestinal, nas células do sistema imunológico, na glândula adrenal, e nas barreiras hematoencefálica, hematoplacentária e hematotesticular (MARZOLINI et al., 2004).

O transportador ABCC1 foi descrito por Cole e colaboradores (1992) a partir de modelos *in vitro*. Essa proteína foi primeiramente conhecida por Proteína Associada a Resistência à Múltiplas Drogas (MRP – figura 3) e está relacionada com a extrusão de xenobióticos (BORST et al., 2000). Fisiologicamente estão envolvidos no transporte de leucotrienos (LEIER et al., 1994), bilirrubina livre (RIGATO et al., 2004) e conjugada (JEDLITSCHKY et al., 1997) e glutatona oxidada (LEIER et al., 1996). Sua expressão também é relatada em diversos tipos de câncer (KUSS et al., 1994; THOMAS et al., 1994; NIES et al., 2001).

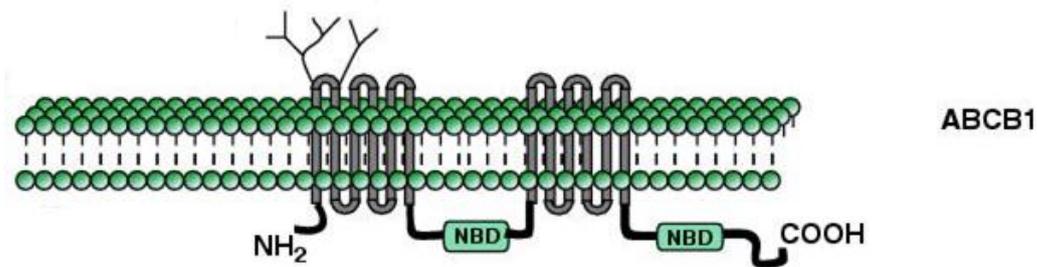


Figura 2: Representação estrutural esquemática do transportador ABCB1. Modificado de VAUTIER et al. (2006).

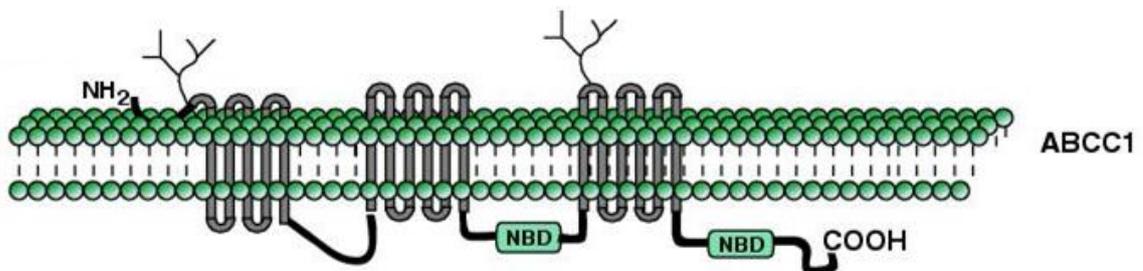


Figura 3: Representação estrutural esquemática do transportador ABCC1. Modificado de VAUTIER et al. (2006).

A compreensão do papel biológico dos transportadores ABC, bem como a sua identificação em diferentes tipos celulares, foi auxiliada pela utilização de substâncias com atividades bloqueadoras sobre estas proteínas. A descoberta dessas substâncias motivou estudos clínicos com o intuito de aumentar a concentração intracelular de quimioterápicos e assim reverter o fenótipo MDR (ROBERT;JARRY, 2003).

O primeiro fármaco descrito com atividade moduladora do transportador ABCB1 foi o verapamil (VP) (TSURUO et al., 1981). Desde então se iniciou uma intensa busca visando a reversão farmacológica do fenótipo MDR, o que resultou no desenvolvimento de três gerações de fármacos com atividade bloqueadora de transportadores ABC. A primeira geração consistiu de fármacos que já eram utilizados em outros tratamentos clínicos e que também eram eficazes no bloqueio dos transportadores ABC. Como exemplo dos bloqueadores de primeira geração

podemos citar o verapamil, a ciclosporina A, a indometacina, entre outros (VARMA et al., 2003).

No entanto, a associação dos agentes bloqueadores com os quimioterápicos, apresentou uma elevada toxicidade, atribuída tanto ao efeito inibitório dos bloqueadores sobre os transportadores ABC de expressão fisiológica, quanto à ação em alvos moleculares secundários. A segunda geração de bloqueadores de transportadores ABC, como o R-verapamil e PSC-833, foi desenvolvida com derivados sintéticos dos fármacos de primeira geração, com o objetivo de diminuir os efeitos tóxicos desses compostos. Apesar dos bloqueadores de segunda geração apresentarem uma menor toxicidade em relação aos bloqueadores de primeira geração, seus efeitos secundários ainda eram observados (PONTE-SUCRE, 2007).

Para solucionar essa problemática foram sintetizados os bloqueadores de terceira geração, como o MK571 e a reversina 205. Esses compostos são inibidores altamente seletivos, mas também apresentaram efeitos tóxicos secundários (DANTZIG et al., 2003).

Atualmente, bloqueadores de transportadores ABC de quarta geração estão em desenvolvimento para aumentar a especificidade da ligação do composto com a proteína, bem como contornar os problemas de toxicidade associados ao tratamento com os bloqueadores (SINGH;PRASAD;CHUFAN; et al., 2014). Esses estudos estão sendo realizados a partir da elucidação estrutural, por cristalografia, do transportador ABCB1 de murinos para garantir uma maior especificidade da relação estrutura-atividade (LI et al., 2014). Como exemplos de bloqueadores de quarta geração temos o QZ59Se-SSS, o QZ59Se-RRR (ALLER et al., 2009), e os análogos tiazóis derivados da (S)-valina (SINGH;PRASAD;KAPOOR; et al., 2014).

A maioria dos estudos acerca da expressão e da atividade funcional de transportadores ABC tem sido focada em células somáticas. O conhecimento sobre o papel biológico dessas proteínas em gametas e células embrionárias ainda permanece incipiente. Mengerink e Vacquier (2002) foram os primeiros a descrever a expressão de um transportador ABC (homólogo ao transportador ABCA3 de humanos) em espermatozoides de ouriços-do-mar. Outros pesquisadores caracterizaram a atividade funcional de transportadores ABC durante o desenvolvimento embrionário inicial e tardio de ouriços-do-mar e estrelas-do-mar (HAMDOUN, A. M. et al., 2004; ROEPKE et al., 2006; SHIPP;HAMDOUN, 2012).

Recentemente, estudos realizados por nosso grupo caracterizaram a atividade funcional dos transportadores ABCB1 e ABCC1 em gametas, embriões e larvas de *Echinometra lucunter*, uma espécie de ouriço-do-mar amplamente encontrada nas águas tropicais e temperadas do Oceano Atlântico. Os nossos dados sugerem que os transportadores ABC atuam como uma barreira bioquímica que confere um papel fisiológico protetor contra estresses químicos ou biológicos (DE SOUZA et al., 2010; SILVA-NETA et al., 2012; TORREZAN et al., 2012).

Nos últimos anos, diversos trabalhos sugeriram um papel protetor dos transportadores ABC contra estresses físicos, a partir do relato de que linhagens celulares com superexpressão de transportadores ABC se tornaram mais resistentes à radiação UV em comparação com as linhagens parentais. Chalmers e colaboradores (1976) demonstraram uma resistência à radiação UV em algumas linhagens celulares de melanoma humano. Hill e colaboradores (1995) mostraram que uma linhagem celular de melanoma foi resistente à UVC, mas permaneceu sensível à UVA ou a UVB. Resultados semelhantes foram obtidos por Moredock e colaboradores (2003) que relataram uma sobrevivência aos efeitos letais da UVB em linhagens celulares de melanoma do peixe *Xiphophorus*. Chao e Sun (1993) relataram uma hipersensibilidade à UVC de uma linhagem celular com fenótipo MDR. Trindade e colaboradores (1999) demonstraram que a linhagem leucêmica K562-Lucena 1, com fenótipo MDR e elevada expressão do transportador ABCB1, é mais resistente à UVA que a linhagem parental.

Estudos recentes tem apontado uma relação direta entre os transportadores ABC e a radiação UV. Os transportadores ABC estão envolvidos na fotoproteção em plantas por modular a concentração epidérmica de metabólitos secundários com propriedades de absorção na faixa da UVB, como os flavonoides, por exemplo (LI et al., 1993). Hu e colaboradores (2000) demonstraram que o transportador ABCB1 é regulado positivamente pela radiação UV nas linhagens KB-3-1 (carcinoma epidérmico). Em contraste, Dumitriu e colaboradores (2004) relataram que a UVB inibe fortemente a atividade dos transportadores ABC em células mononucleares sanguíneas periféricas. Marko e colaboradores (2012) mostraram que o mRNA dos transportadores ABCA1, ACBA12, ABCC1 e ABCG1 foram regulados negativamente pelo tratamento de queratinócitos epidérmicos humanos.

Os trabalhos supracitados, em linhagens de células tumorais, conduzidos no intuito de esclarecer a relação entre transportadores ABC e radiação UV,

apresentaram resultados divergentes e contraditórios. Esse fato encoraja o desenvolvimento de estudos em outros modelos biológicos para elucidar o papel dos transportadores ABC nos efeitos deletérios da radiação UV nos organismos vivos.

1.3 Ouriços-do-mar como modelo experimental

O desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar é um modelo experimental amplamente utilizado em estudos científicos desde o século XIX. Os ouriços-do-mar são animais pertencentes ao filo Echinodermata, e representam um dos grupos mais encontrados 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, onde a maioria é bentônica. São caracterizados pela presença de um endoesqueleto composto de ossículos calcários; um exoesqueleto com 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. Os 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).

O *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 gônadas e artesanato de sua carapaça e espinhos (MARIANTE et al., 2009). Podem ser encontrados em águas costeiras acima de 45 metros de profundidade e a sua distribuição geográfica estende-se por todo o continente americano, desde a Carolina do Norte (EUA) até Santa Catarina (Brasil), também sendo registrada a sua presença na costa oeste africana (LIMA et al., 2009).

Apesar de sua ampla 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, 2014) indica, até março de 2015, a publicação de 7.299 artigos indexados com o termo “sea urchin” (Ouriços-do-mar, em inglês) e somente 27 artigos indexados com o termo “*Echinometra lucunter*”. Esse valor mostra que apenas 0,28% da literatura científica corresponde à pesquisa envolvendo ouriços-do-mar dessa espécie. Essa produção científica é muito baixa em relação a outras espécies mais estudadas como *Strongylocentrotus purpuratus* (1.221 trabalhos), *Paracentrotus lividus* (613 trabalhos), *Lytechinus variegatus* (567 trabalhos), *Arbacia punctulata* (471 trabalhos) e *Lytechinus pictus* (245 trabalhos).

Os ouriços-do-mar vêm sendo utilizados como modelo experimental em estudos científicos de diversas áreas devido a algumas 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, sendo que 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, o ciclo celular embrionário apresenta várias similaridades com o de células humanas, o que faz desses animais um ótimo modelo para prospecção de compostos com atividade antimetabólica (MILITAO et al., 2007).

Trabalhos utilizando ouriços-do-mar como modelo biológico datam desde 1847 (BRIGGS; WESSEL, 2006), entretanto, 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 espermatozoide 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 (HERTWING, 1876).

Grande parte do conhecimento atual sobre a fertilização e a formação de organismos multicelulares foi adquirida a partir de estudos desenvolvidos em ouriços-do-mar. A origem materna das mitocôndrias (MEVES, 1912), 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.

O desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar vem sendo também utilizado para avaliar o impacto ambiental de estressores ambientais de diversas origens (química, física ou biológica) (BOSNJAK et al., 2009; RINDE et al., 2014; STROGYLOUDI et al., 2014; ZHAO et al., 2014). A grande maioria das pesquisas a respeito dos efeitos da radiação UV em organismos marinhos tem sido realizada em ouriços-do-mar (LU;WU, 2005a).

No entanto, a maioria dos estudos sobre os efeitos da exposição à radiação UV em ouriços-do-mar é conduzida em espécies de águas temperadas. Poucos estudos analisaram a resposta à radiação UV em animais de águas tropicais. Além disso, não há relato na literatura de investigações em *Echinometra lucunter*. Essas investigações são de extrema importância ecológica e ambiental, uma vez que esse animal tem uma ampla distribuição ao longo do Oceano Atlântico.

Adicionalmente, óvulos, embriões, e larvas de ouriços-do-mar têm sido empregados como modelo experimental para a investigação do papel biológico de transportadores da superfamília ABC, bem como de compostos naturais ou sintéticos com atividade moduladora sobre essas proteínas. Esses estudos foram motivados a partir do mapeamento do genoma do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus*, que revelou 65 genes codificantes para proteínas ABC, em comparação com os 48, 56 e 31 genes codificadores de transportadores ABC em humanos, *zebrafish*, e tunicados, respectivamente (figura 4). Esses dados abrem um painel promissor para a investigação acerca do papel biológico dos transportadores ABC na fertilização e no desenvolvimento embrionário (GOLDSTONE et al., 2006).

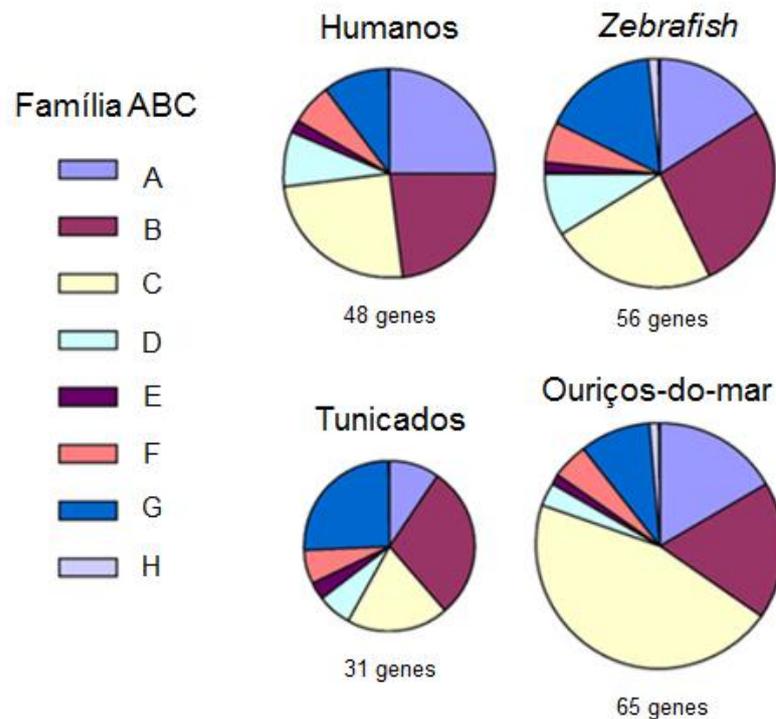


Figura 4: Painel esquemático do número de genes codificadores de transportadores ABC em humanos, *zebrafish*, tunicado e ouriços-do-mar e sua distribuição nas subfamílias A-H. Modificado de GOLDSTONE et al., 2006.

1.4 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 espermatozoide 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 gametas masculinos. Esse contato causa a fusão da vesícula acrossômica com a membrana plasmática do gameta masculino, em um processo de excitose 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).

Após a ligação entre os gametas é iniciada uma cascata de eventos no citoplasma do gameta feminino, coletivamente chamados de ativação do óvulo (quadro 1). Um dos primeiros sinais desse mecanismo é o bloqueio rápido da polispermia, que corresponde à mudança do potencial de repouso da membrana (-70 mV) para valores mais positivos (aproximadamente +20 mV), e que é dependente da abertura de canais de Na^+ através da membrana plasmática do óvulo (DAVID et al., 1988; MCCULLOH;CHAMBERS, 1999). Logo em seguida ocorre a fusão dos grânulos corticais com a membrana plasmática do óvulo, um evento dependente de Ca^{2+} , e que promove a elevação do envelope de fertilização, sendo conhecido como bloqueio lento da polispermia. O envelope de fertilização é a principal feição morfológica de um óvulo fertilizado (GLABE;VACQUIER, 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 da concentração intracelular de ROS, além da alcalinização do pH intracelular também são processos que contribuem para o início da síntese protéica e da replicação do DNA (GRAINGER et al., 1979; FRIIS;JOHANSEN, 1996). 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).

Quadro 1: Eventos iniciais e tardios da fertilização e do desenvolvimento embrionário de Ouriços-do-mar. Fonte: GILBERT (2000).

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

Após a fertilização, o desenvolvimento de um organismo multicelular passa por um processo chamado de clivagem: uma série de divisões mitóticas onde o volume do óvulo é dividido em numerosas e pequenas células denominadas 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, as divisões celulares dos blastômeros são rápidas e sincrônicas (GERHART et al., 1984).

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 (Figura 5) (SUMMERS et al., 1993).

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 o envelope de fertilização é rompido, 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, formando uma invaginação e uma depressão denominada 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, o mesoderma e o endoderma, os quais darão origem aos diferentes tecidos e órgãos da futura larva (WILT, 1987; STRICKER, 1999).

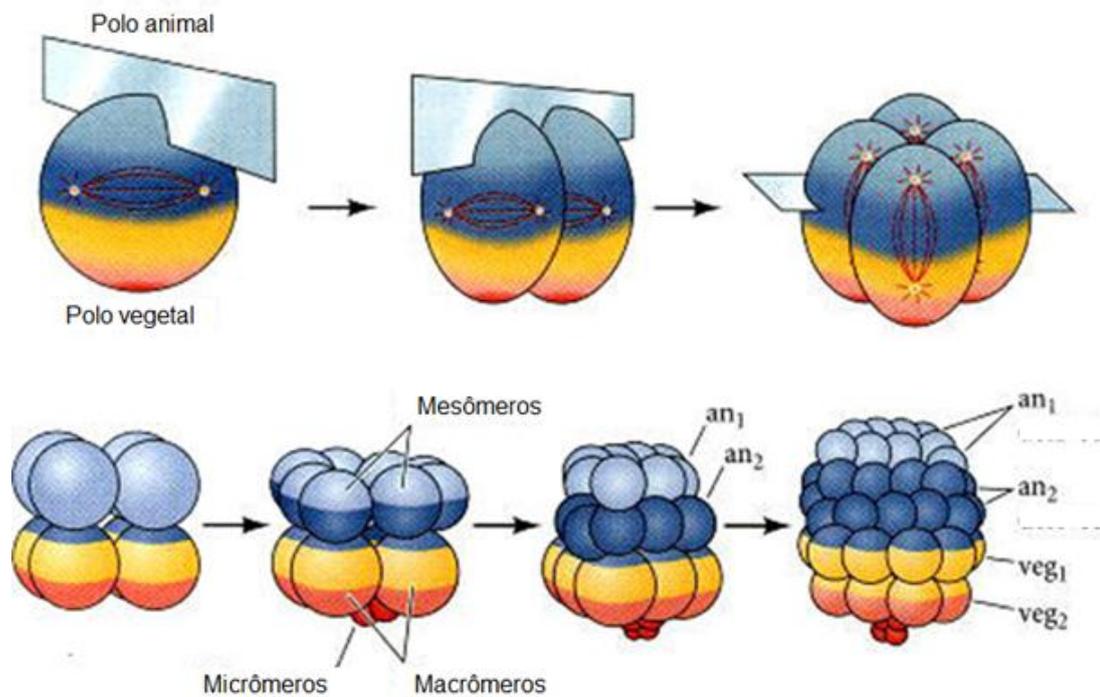


Figura 5: Esquema representativo do padrão de clivagem de ouriços-do-mar. Fonte: GILBERT (2000)

No final da gastrulação, a extremidade do arquêntero faz contato com o ectoderma, induzindo uma invaginação que formará a boca da larva. Esse contato induz também uma mudança posicional no embrião que caracteriza o estágio de prisma. Durante esse estágio o embrião assume um formato de pirâmide truncada e arredondada e o eixo dorso-ventral é estabelecido. Além disso, as células mesenquimais primárias começam a se agregar e diferenciam-se em espículas trirradiadas, as quais são os rudimentos do esqueleto larval (CONWAY et al., 1981).

A larva de ouriços-do-mar, chamada de larva plúteos, é móvel e alimenta-se do plâncton marinho. Ela se desenvolve por volta de 48 a 72 horas após a fertilização, dependendo de cada espécie. A principal característica morfológica da larva é a formação e alongação de quatro braços, dois maiores no lado dorsal e dois menores no lado ventral. 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).

1.5 O desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar como modelo experimental para a prospecção de compostos fotoativos ou com atividade bloqueadora de transportadores ABC

Devido à grande exposição dos gametas, embriões e larvas de ouriços-do-mar à radiação UV, o desenvolvimento embrionário tem sido visto como um excelente modelo biológico para a prospecção de produtos naturais com propriedades fotoprotetoras ou fotossensibilizante (LU;WU, 2005a). Esse modelo permite, ainda, a investigação do papel de proteínas da superfamília ABC nos efeitos induzidos pela radiação UV, bem como a prospecção de compostos com atividade bloqueadora de transportadores ABC. O desenvolvimento de substâncias com atividade bloqueadora de transportadores ABC é de grande importância clínica, uma vez que elas podem atuar na reversão no fenótipo MDR, que é o principal responsável pela falência terapêutica no tratamento com antibióticos e antineoplásicos.

Nos últimos anos, a incidência de várias desordens clínicas relacionadas à radiação UV têm aumentado em níveis alarmantes, e a tendência é um contínuo crescimento até o fim do século. A exposição crônica a essa radiação pode induzir uma série de respostas biológicas nocivas, incluindo o desenvolvimento de eritema, edema, queimadura, hiperplasia, imunossupressão e envelhecimento precoce. Essas alterações são direta ou indiretamente relacionadas às doenças de pele, incluindo o câncer (SVOBODOVA et al., 2003).

No ano de 2014, é estimada uma quantidade de 188.020 novos casos de neoplasias de pele (melanomas e não melanomas). No estado da Paraíba, a taxa estimada de melanoma de pele é de 1,89 casos para cada 100 mil homens e 0,87 casos para cada 100 mil mulheres. Os valores estimados para o câncer de pele não melanoma é ainda mais preocupante: 48,28 casos para cada 100 mil homens e 57,89 casos para cada 100 mil mulheres em todo o estado (INCA).

Um grande interesse na utilização de substâncias que podem ser empregadas na prevenção dos danos provocados pelo contato excessivo com a radiação UV tem surgido nas últimas décadas. A busca por novos fármacos com propriedades fotoativas e que desenvolva menos efeitos tóxicos é constante, e os produtos de origem natural são as principais opções nessa linha de pesquisa

(NICHOLS;KATIYAR, 2010). Dentre esses compostos destacam-se as cumarinas e seus derivados, devido à propriedade de absorver fortemente a radiação UV e também à sua atividade antioxidante (GOODWIN;POLLOCK, 1954; VESELINOVIC et al., 2014; WITAICENIS et al., 2014).

As cumarinas compreendem um grupo de compostos fenólicos naturais, encontrados em uma ampla variedade de plantas (KANEKO et al., 2003), bactérias (HOULT;PAYA, 1996) e fungos (KAWASE et al., 2001). Mais de 3.400 cumarinas já foram isoladas e várias outras foram sintetizadas a partir de reações de substituição em qualquer um dos sítios de sua estrutura molecular básica (1,2-benzopirona, figura 6) (BEILLEROT et al., 2008; AUDISIO et al., 2010).

A cumarina é o composto mais simples dessa classe, são lactonas provenientes do ácido o-hidroxi-cinâmico, com um esqueleto benzo- α -pirona. É um composto químico, com um aroma doce, sendo empregado como essência em perfumes desde 1882 (MIN et al., 2010). Como produto farmacêutico, a cumarina é comercializada em associação com a heparina ou a tri-hidroxi-etil-rutina para o tratamento de varizes e já foi utilizada como quimioterápico contra carcinoma pulmonar, renal e de próstata (FELTER et al., 2006).

As hidroxycumarinas formam uma importante classe de derivados cumarínicos que representam importantes papéis no desenvolvimento de compostos farmacologicamente ativos (YASARAWAN et al., 2014). O derivado 4-hidroxycumarina, ou 4-cumarinol, é um conhecido antagonista da vitamina K e é clinicamente utilizado como anticoagulante (STANCHEV et al., 2009). Já o derivado 7-hidroxycumarina, ou umbeliferona, é um importante componente de filtros solares devido a sua conhecida atividade fotoprotetora e antioxidante (RAMESH et al., 2007; DU et al., 2008).

No entanto, alguns compostos da classe das hidroxycumarinas não tiveram suas atividades farmacológicas estudadas. É o caso da 3-hidroxycumarina, ou 3-cumarinol. Apesar dos poucos estudos, essa molécula pode ser considerada como um potencial antioxidante, uma vez que os dois átomos de oxigênio na posição orto são importantes doadores de elétrons (BAILLY et al., 2004).

No geral, as cumarinas apresentaram atividades antivirais e antibacterianas (SIDDIQUI et al., 2007), antiinflamatória (FYLAKTAKIDOU et al., 2004; BUCOLO et al., 2008), antioxidantes (RAMESH;PUGALENDI, 2006; THUONG et al., 2009), antitumoral (KOFINAS et al., 1998), antiparasitária (LOPES et al., 1980) e

vasodilatadora (BACCARD et al., 2000). Kaidbey and Kligman (1981) demonstraram uma atividade fotossensibilizante da cumarina e alguns de seus derivados. No entanto, a atividade fotoprotetora e a atividade bloqueadora de transportadores ABC não foram investigadas em fármacos dessa classe.

A prospecção de compostos fotoativos ou com atividade bloqueadora de transportadores ABC é de grande importância farmacológica e clínica, uma vez que pode promover a inserção de novas opções terapêuticas para o tratamento de diversas patologias relacionadas à exposição à radiação UV ou relacionadas ao câncer. O desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar apresenta inúmeras vantagens que o torna apropriado para esse tipo de investigação científica.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o envolvimento dos transportadores ABCB1 e ABCC1 nos efeitos deletérios da UVA e UVB em gametas e embriões de ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter*, bem como investigar a fotoatividade e a atividade bloqueadora de proteínas ABC da cumarina e da 3-hidroxicumarina em gametas e embriões de *E. lucunter*.

2.2 Objetivos específicos

Os Objetivos específicos do presente trabalho foram investigar:

- O efeito da exposição de gametas ou embriões à UVA ou UVB sobre o desenvolvimento embrionário e larval de *E. lucunter*;
- O efeito de bloqueadores de transportadores ABC sobre os efeitos da UVA ou UVB em gametas e embriões de *E. lucunter*;
- O efeito da exposição à UVB sobre a atividade funcional de transportadores ABC em óvulos e zigotos de *E. lucunter*;
- A fotoatividade da cumarina e de seus derivados em gametas e zigotos de *E. lucunter* expostos à UVB;
- O efeito bloqueador de transportadores ABC da cumarina e da 3-hidroxicumarina em zigotos 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 (7° 07' S, 34° 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 entremarés (figura 8). As coletas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob os números 11545-3 (vigência 2011); 32105-2 (vigência 2012 – 2013); 32105-4 (vigência 2014). 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, subfilos Vertebrata (§3º, art. 2).



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

Após a coleta, os animais foram transportados até o laboratório em um recipiente plástico contendo água do mar coletada no local. No laboratório, os animais foram lavados com FSW (do inglês *Filtered Sea Water*) para retirada de fezes, microrganismos e parasitas aderidos à sua superfície e em seguida dispostos em um aquário 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 de FSW por espécime.

Toda a água utilizada no laboratório foi coletada na Praia do Seixas na cidade de João Pessoa, Paraíba – Brasil (7° 09' S, 34° 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 25°C.

3.1.2 Substâncias utilizadas

As seguintes substâncias foram utilizadas e obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA): verapamil (VP); calceína-AM (C-AM); reversina 205 (REV205); MK571; vimblastina (VL); e 2',7' diclorofluoresceína diacetato (H₂DCF-DA).

A cumarina e seus derivados (figura 7), obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), foram gentilmente cedidos 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 REV205, o MK571, a VL e a cumarina e seus derivados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração final do DMSO foi mantida abaixo de 1% v/v. O VP e a H₂DCF-DA foram dissolvidos em etanol absoluto, cuja concentração final foi mantida abaixo de 2%. Os veículos acima descritos, nas concentrações utilizadas para dissolução dos fármacos, não apresentaram efeito sobre o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter*.

O VP, a VL e a cumarina e seus derivados foram mantidos a 4°C, enquanto que os demais fármacos foram conservados à - 20°C.

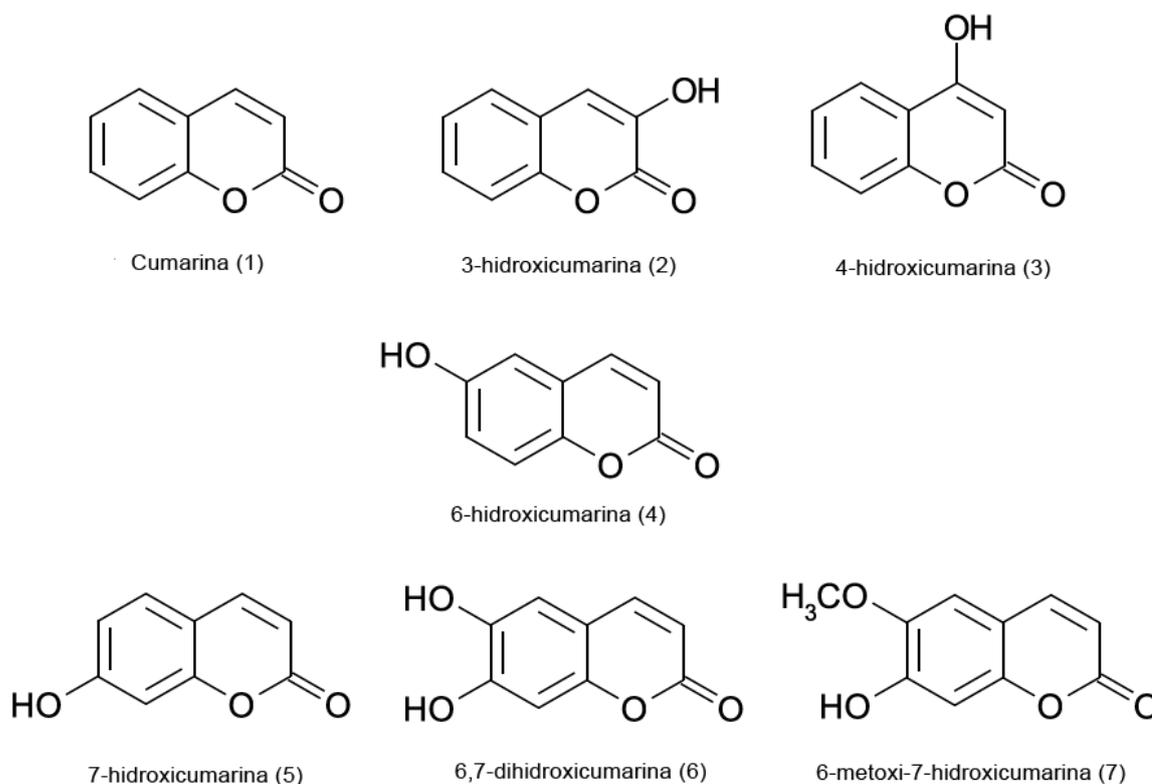


Figura 7: Cumarina e seus derivados.

3.1.4 Água do mar filtrada em filtros *millipore*

A água do mar filtrada em filtros *millipore* (mFSW, do inglês *millipore Filtered Sea Water*) foi utilizada para a diluição da suspensão de óvulos e espermatozoides antes da fertilização, bem como para a incubação dos embriões para os ensaios no estágio de prisma e no estágio larval. A mFSW foi filtrada em um sistema de filtração a vácuo com membrana de celulose e acetato com 0,45 μm (Sartorius Stedium, Alemanha).

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 (EVANS et al., 1983).

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 8).

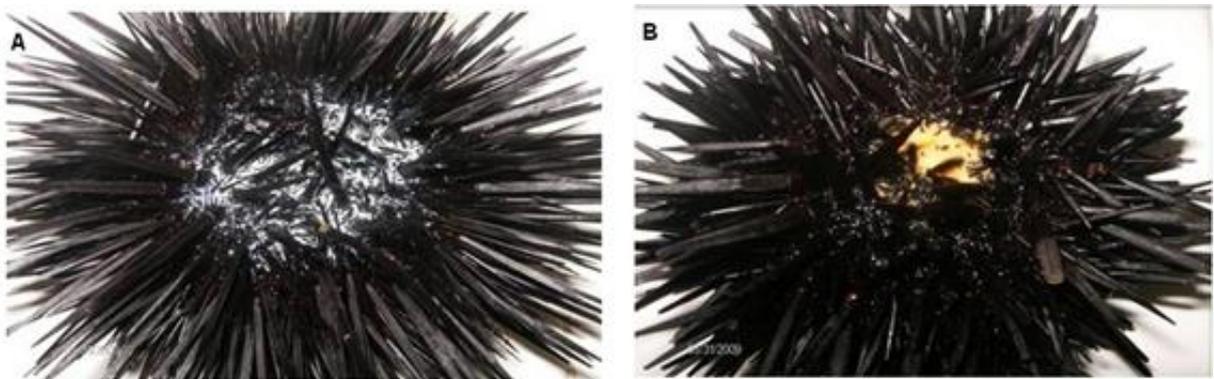


Figura 8: Identificação do sexo dos animais: Os machos liberavam uma secreção branca (A) enquanto que a secreção expelida pelas fêmeas era em tons alaranjados (B).

3.2.2 Obtenção dos gametas

Esse procedimento foi adaptado de Costa-Lotufo e colaboradores (2002). 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 intracelômica de cada espécime, com o propósito de induzir uma acentuada contração dos músculos que revestem as gônadas e a conseqüente liberação dos gametas (figura 9). Para evitar a liberação de gametas imaturos, o tempo máximo de coleta dos óvulos ou espermatozoides foi de 10 minutos.

Os espermatozoides foram coletados a seco, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, e imediatamente armazenados em tubos de microcentrífuga e refrigerados a 4°C até o momento da fertilização. Nessas condições, os gametas masculinos permaneciam viáveis por até 10 dias (figura 10).



Figura 9: Obtenção dos gametas por meio da injeção intracelômica de KCl (0,5 M).



Figura 10: Coleta dos gametas masculinos. Os espermatozoides obtidos foram armazenados em tubos de microcentrífuga e refrigerados a 4°C.

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 11). Após a coleta, os óvulos foram transferidos para uma proveta de 500 mL onde foram realizados dois processos de lavagem, por decantação, 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 ressuspensos em 50 mL de ASW e a concentração celular ajustada para 1×10^4 óvulos / mL com o auxílio de uma câmara de Neubauer.



Figura 11: Coleta dos gametas femininos. A fêmea foi invertida em béquer a fim de manter os gonóporos em contato com a FSW.

3.2.3 Fertilização *in vitro*

A fertilização foi induzida pela adição de uma suspensão de espermatozoides (1 parte de esperma seco em 49 partes de mFSW) em uma suspensão de óvulos (1×10^4 óvulos / mL), numa razão de 1:100, sob leve agitação e em temperatura ambiente. A fertilização foi confirmada após 15 minutos pela elevação do envelope 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 $26^\circ \pm 2$ °C até o final do ensaio (COSTA-LOTUFO et al., 2002).

3.2.4 Irradiação UVA e UVB

A fonte de UVA foram quatro lâmpadas *Mineralight®*, modelo UVGL-25 (365 nm - *American Laboratory Trading, Inc., USA*), enquanto que a fonte de UVB foram duas lâmpadas *Philips TL20W/12RS (UV Products Inc., USA)* que emitiam um espectro contínuo entre 290 e 315 nm. As irradiações foram realizadas de acordo

com Carini e colaboradores (2000). A irradiância da UVA foi 4 W m^{-2} e a irradiância da UVB foi de 20 W m^{-2} . As doses foram calculadas a partir da multiplicação da irradiância (W m^{-2}) pelo tempo (segundos). As doses utilizadas variaram entre 0,028 a $14,4 \text{ kJ m}^{-2}$ e foram mensuradas com o auxílio de um dosímetro Wilber Lourmat (modelo VLX-3W, *UV products Inc., USA*) equipado com um sensor para o comprimento de onda da UVA (365 nm) ou para o comprimento de onda da UVB (312 nm). A exposição à UVA nunca excedeu 60 minutos e a exposição à UVB nunca excedeu 12 minutos. As amostras (gametas ou embriões) foram irradiadas em placas de petri de vidro, não cobertas, com 50 mm de diâmetro e com volume final de 7 mL.

3.2.5 Protocolos experimentais

3.2.5.1 Efeito da radiação UVA ou UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides, óvulos ou zigotos

Para o protocolo de exposição de espermatozoides, a suspensão de gametas masculinos foi irradiada com UVA ou UVB, de acordo com o descrito no item 3.2.4. Dez minutos após a irradiação, os espermatozoides foram utilizados para fertilizar óvulos não irradiados (figura 12A).

Para o protocolo de exposição de óvulos, a suspensão de gametas femininos foi irradiada com UVA ou UVB, de acordo com o descrito no item 3.2.4. Dez minutos após a irradiação, os óvulos foram fertilizados por espermatozoides não irradiados (figura 12B).

Já para o protocolo de exposição dos zigotos, a suspensão de óvulos foi fertilizada, de acordo com o item 3.2.3, e dez ou quarenta minutos após a indução da fertilização, a suspensão de zigotos foi irradiada com UVA ou UVB, de acordo com o descrito no item 3.2.4 (figura 12C).

O desenvolvimento embrionário ocorreu na presença (ensaios com UVB) ou ausência de luz branca (ensaios com UVA e UVB). As amostras foram fixadas em paraformaldeído 2% e o desenvolvimento embrionário analisado em microscopia

óptica comum nos intervalos de 90 (estágio de primeira clivagem), 120 (estágio de segunda clivagem), 240 (estágio de mórula) e 480 minutos (estágio de blástula) após a indução da fertilização. 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.

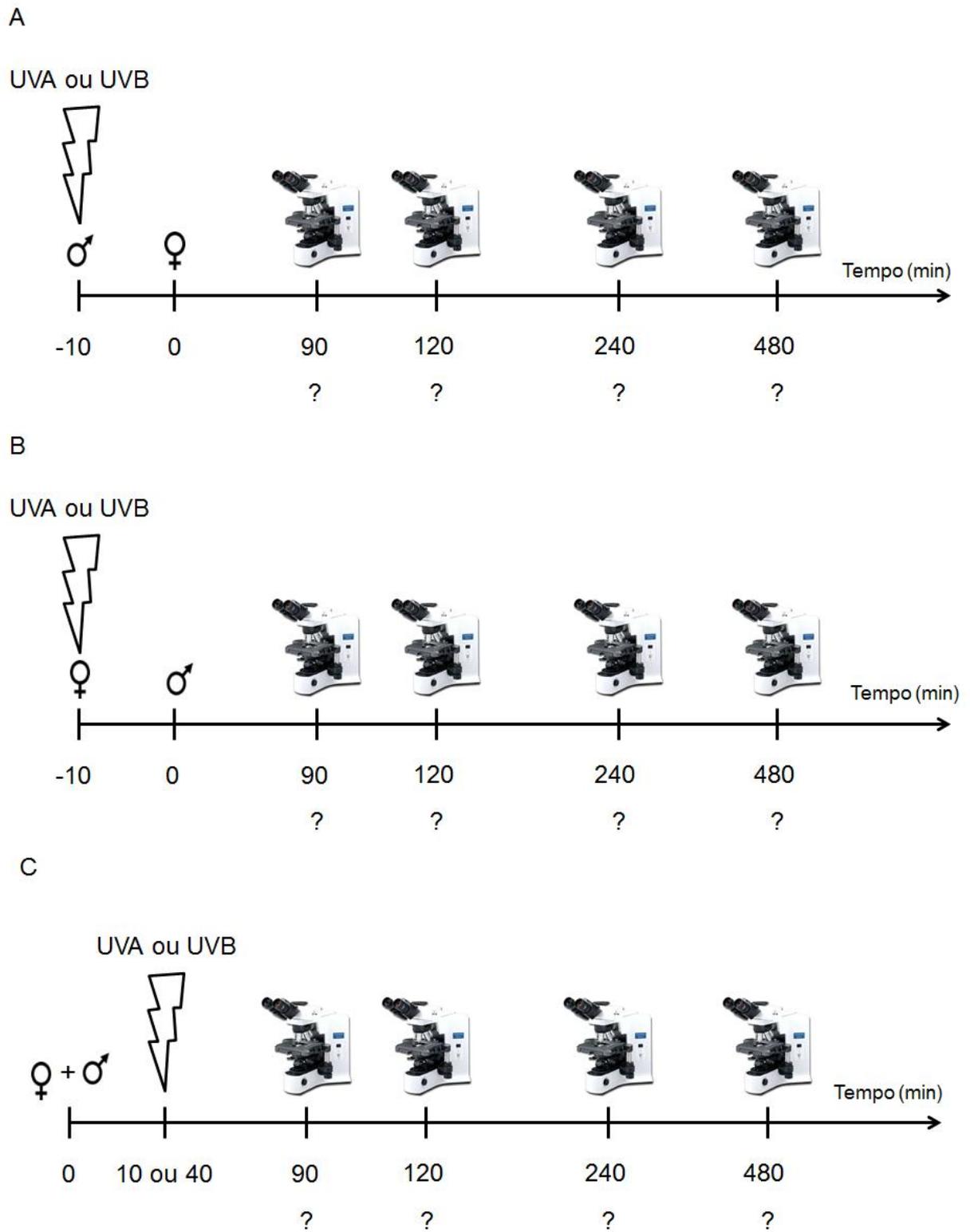


Figura 12: Protocolo experimental do ensaio do efeito da radiação UVA ou UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides (A), óvulos (B) ou zigotos (C).

3.2.5.2 Efeito da radiação UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides e óvulos

A suspensão de óvulos e a suspensão de espermatozoides foram irradiadas com UVB, de acordo com o descrito no item 3.2.4. Dez minutos após a irradiação, os óvulos irradiados foram fertilizados por espermatozoides irradiados. O desenvolvimento embrionário ocorreu na presença ou ausência de luz branca. As amostras foram fixadas em paraformaldeído 2% e o desenvolvimento embrionário analisado em microscopia óptica comum nos intervalos de 90 (estágio de primeira clivagem), 120 (estágio de segunda clivagem), 240 (estágio de mórula) e 480 minutos (estágio de blástula) após a indução da fertilização. 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).

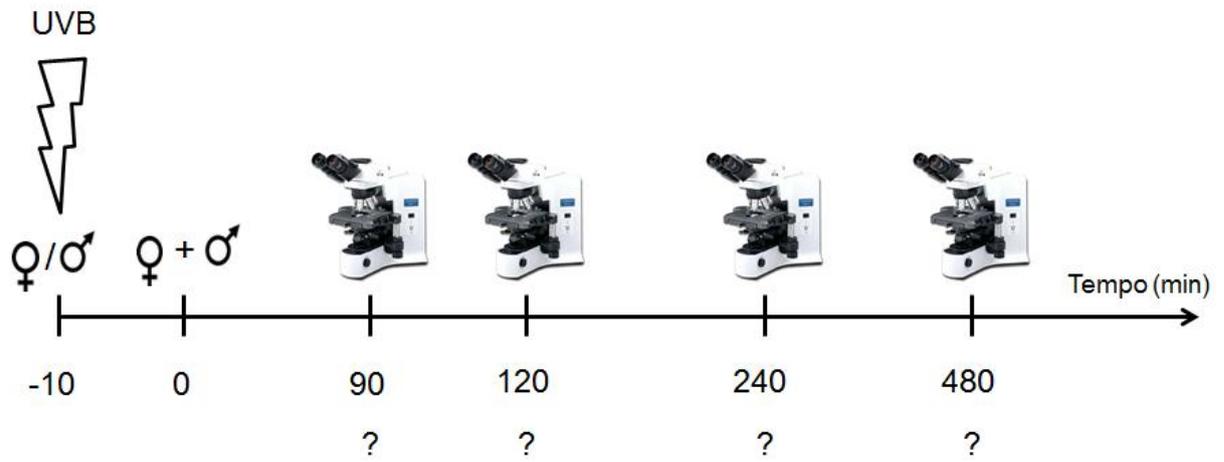


Figura 13: Protocolo experimental do ensaio do efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides e óvulos.

3.2.5.3 Efeito da radiação UVA ou UVB na concentração intracelular de ROS em espermatozoides, óvulos ou zigotos irradiados

Para avaliar os níveis intracelulares de ROS em gametas ou embriões irradiados, foi utilizado o ensaio de oxidação da 2',7' diclorofluoresceína (H₂DCF-DA). A H₂DCF-DA é uma sonda amplamente utilizada como marcador de stress oxidativo e tem sido sugerida como um excelente indicador do perfil oxidativo geral de células (WANG;JOSEPH, 1999). A H₂DCF-DA é uma molécula hidrofóbica, e não fluorescente, que se difunde rapidamente para o meio intracelular, sendo hidrolisada por esterases intracelulares, gerando como produto a H₂DCF, que pode ser oxidada na presença de ROS para a forma fluorescente. Desta forma, uma elevada fluorescência intracelular é um indicativo de alta produção de ROS, enquanto que uma reduzida fluorescência intracelular é sinal de uma baixa produção de ROS (figura 14) (LOPEZ-ONGIL et al., 1998).

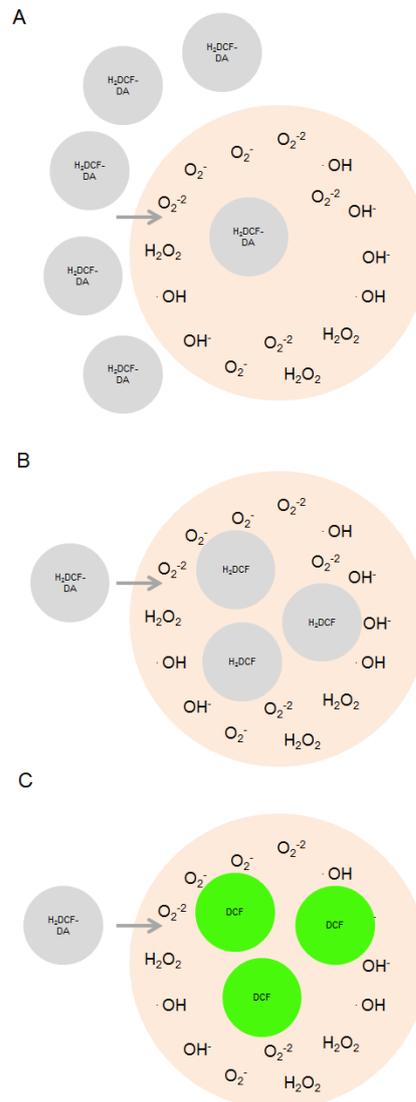


Figura 14: Representação esquemática do ensaio da oxidação da diclorofluoresceína H₂DCF para avaliar os níveis intracelulares de ROS. A H₂DCF-DA se difunde rapidamente para o meio intracelular (A) e é hidrolisada por esterases intracelulares, gerando como produto a H₂DCF (B). Na presença de ROS, a H₂DCF é oxidada para a forma fluorescente (DCF) (C).

Para a realização desse ensaio, os espermatozoides foram irradiados com três diferentes doses de UVA ou UVB e após 10 minutos foram incubados, na ausência de luz, com H₂DCF-DA (10 µM). Trinta minutos após a incubação, o acúmulo intracelular de DCF (excitação em 488 nm) foi analisado em citometria de fluxo (BD FACSCalibur), cujas análises foram conduzidas em baixo fluxo e foram avaliados apenas os espermatozoides que não apresentaram nenhuma alteração nos parâmetros FSC x SSC (figura 15A). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi utilizado como controle positivo.

A análise em óvulos e zigotos foi realizada sob microscopia de fluorescência. Os gametas femininos foram irradiados com três diferentes doses de UVA ou UVB e após 10 minutos foram incubados, na ausência de luz, com H₂DCF-DA (10 µM). Trinta minutos após a incubação, o acúmulo intracelular de DCF foi analisado em um microscópio *Olympus BX41* equipado com uma lâmpada de halogênio (figura 15B). Os zigotos foram irradiados com UVA ou UVB dez minutos após a fertilização. Dez minutos após a irradiação foram incubados, na ausência de luz, com H₂DCF-DA (2,5 µM). Trinta minutos após a incubação, o acúmulo intracelular de DCF foi analisado em microscopia de fluorescência (figura 15C). O controle positivo para ambos os protocolos também foi o H₂O₂.

As imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas por uma câmera *Olympus Q-color 5*. Todas as imagens foram capturadas na objetiva de 40x. A intensidade de fluorescência foi analisada com o software *Image J* (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*), e os valores foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MIF).

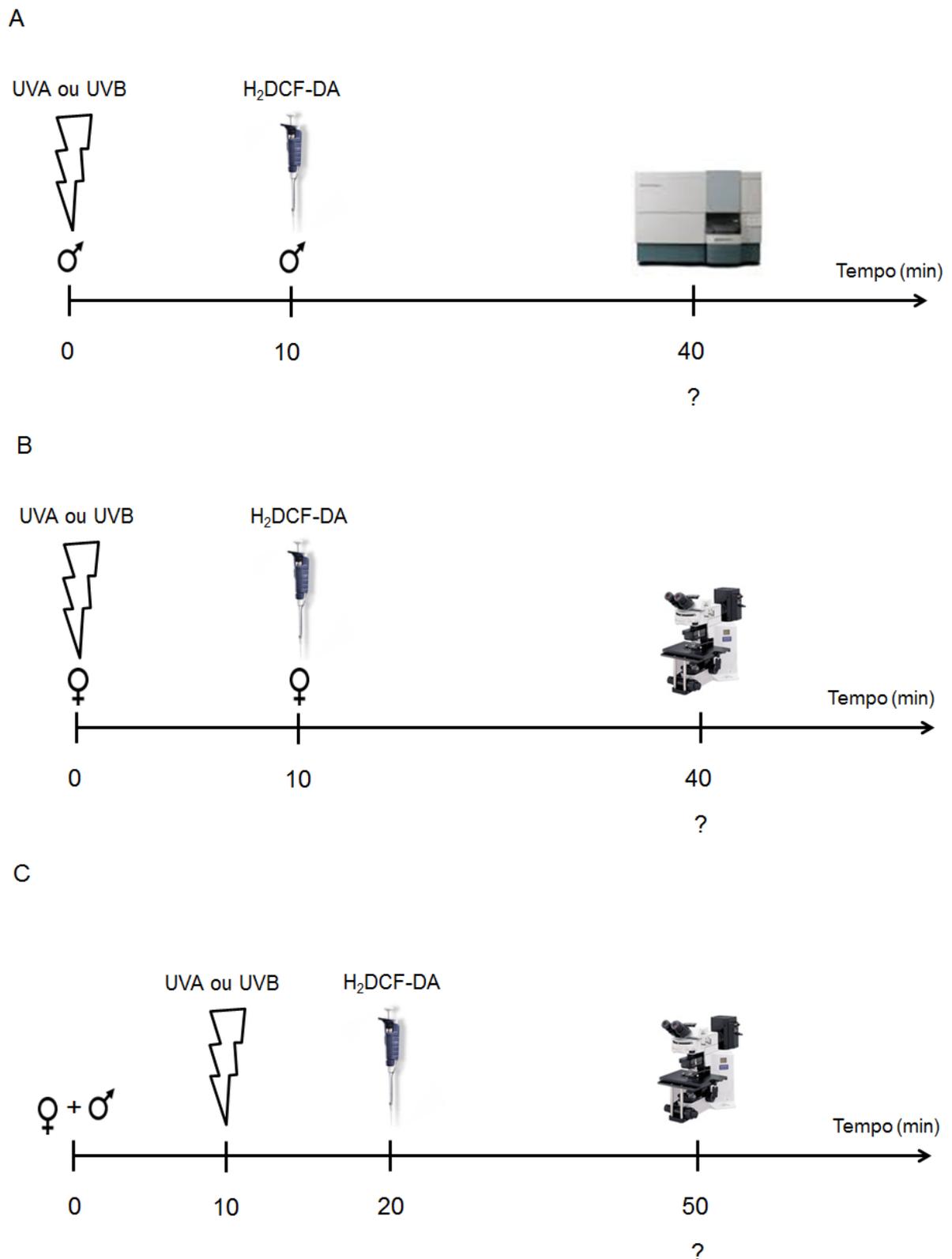


Figura 15: Protocolo experimental do ensaio da oxidação da H₂DCF. Os espermatozoides (A), óvulos (B) ou embriões (C) foram submetidos a diferentes doses de UVA ou UVB e, em seguida, incubados com H₂DCF-DA à 26 + 2°C. Após 30 minutos de incubação, as amostras foram analisadas em citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência.

3.2.5.4 Efeito da radiação UVB sobre o desenvolvimento larval: exposição de gametas, zigotos e embriões no estágio de prisma

As suspensões de óvulos, espermatozoides e zigotos foram submetidas ao mesmo protocolo de irradiação e fertilização descritos nos itens 3.2.5.1, 3.2.5.2 e 3.2.5.3. Após esse procedimento, os embriões (na concentração de 100 embriões por mL) foram transferidos para erlenmeyers contendo 100 mL de mFSW.

Adicionalmente, para investigar se o desenvolvimento embrionário tardio é sensível à radiação, embriões no estágio de prima foram expostos à UVB (nas doses de 7,2 e 14,4 kJ m⁻²) e o desenvolvimento larval foi acompanhado. Nesse protocolo, os óvulos foram fertilizados, de acordo com o item 3.2.3 e em seguida, transferidos para erlenmeyers contendo 100 mL de mFSW. Após 24 horas da indução da fertilização, as amostras foram irradiadas e novamente transferidas para outros erlenmeyers contendo 100 mL de mFSW.

O desenvolvimento embrionário ocorreu no fotoperíodo 12:12 (claro:escuro). As amostras foram monitoradas, em microscopia óptica comum, no intervalo de 48 horas após a indução da fertilização. As Fotomicrografias das larvas plúteos foram adquiridas com a câmera *Olympus Q-color 5* e as imagens foram capturadas na objetiva de 40 vezes.

O desenho experimental para esse protocolo é mostrado na figura 16A-D.

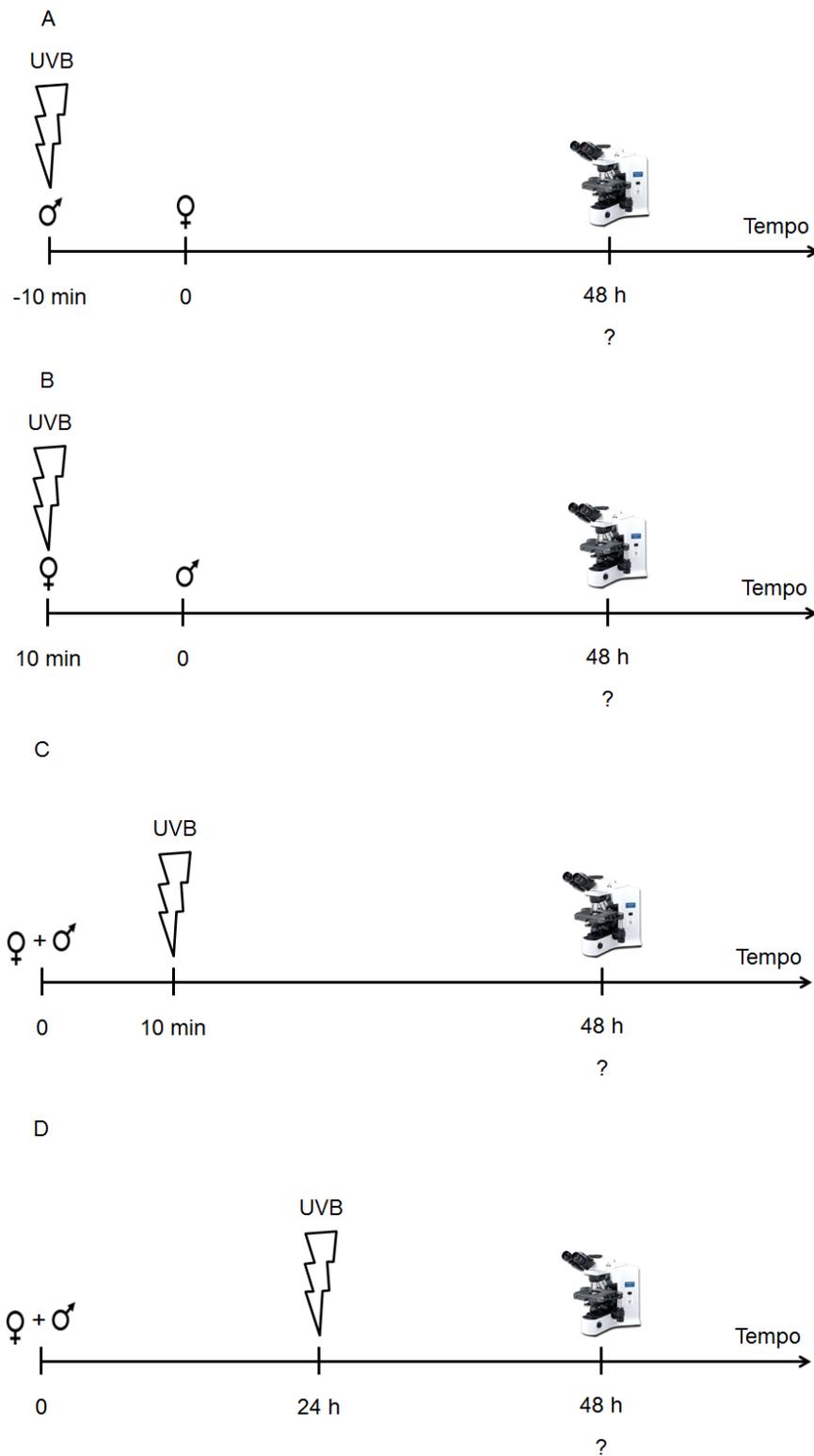


Figura 16: protocolo experimental do ensaio do efeito da UVB sobre o desenvolvimento larval: exposição de gametas, zigotos e embriões no estágio de prisma. Os espermatozoides (A), óvulos (B), zigotos (C) ou embriões no estágio de prisma (D) foram irradiados com UVB e o desenvolvimento larval foi analisado 48 horas após a fertilização.

3.2.5.5 Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de espermatozoides ou óvulos

Para o protocolo de tratamento e exposição dos espermatozoides, a suspensão de gametas masculinos foi previamente tratada com REV205 (10 μ M) ou MK571 (10 μ M). Dez minutos após, as amostras foram irradiadas com UVA ou UVB, de acordo com o descrito no item 3.2.4. Dez minutos após a irradiação, os espermatozoides foram utilizados para fertilizar óvulos não irradiados (figura 17A).

Para o protocolo de tratamento e exposição dos óvulos, a suspensão de gametas femininos foi previamente tratada com REV205 (10 μ M) ou MK571 (10 μ M). Dez minutos após, as amostras foram irradiadas com UVA ou UVB, de acordo com o descrito no item 3.2.4. Dez minutos após a irradiação, os óvulos foram fertilizados com espermatozoides não irradiados (figura 17B).

O desenvolvimento embrionário ocorreu na ausência de luz branca. As amostras foram fixadas em paraformaldeído (2%) e o desenvolvimento embrionário analisado em microscopia óptica comum nos intervalos de 90 (estágio de primeira clivagem) e 120 minutos (estágio de segunda clivagem). 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.

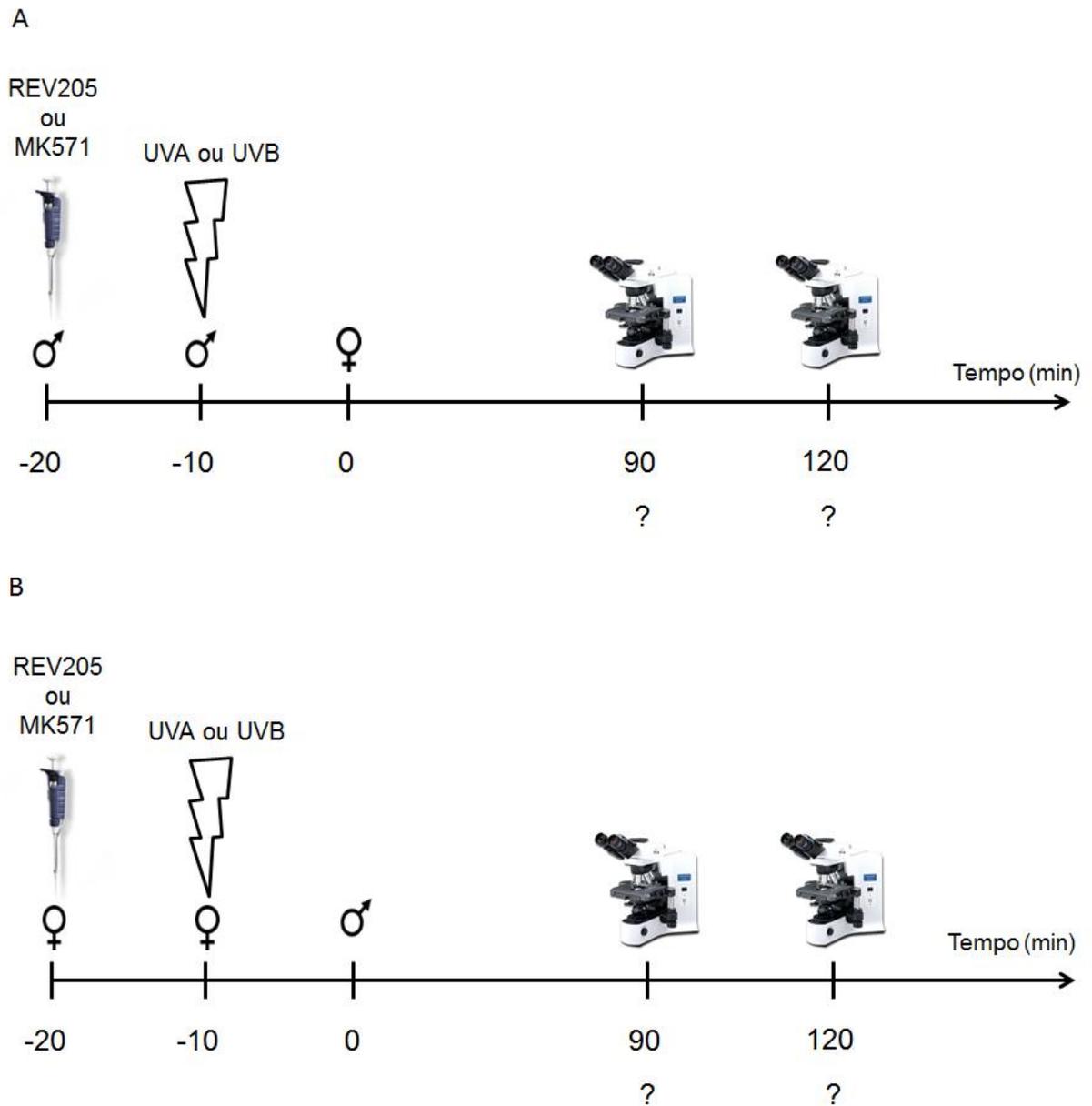


Figura 17: Protocolo experimental do ensaio do efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de espermatozoides (A) ou óvulos (B).

3.2.5.6 Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de zigotos (10 ou 40 minutos após a fertilização)

A suspensão de óvulos foi previamente tratada com REV205 (10 μM) ou MK571 (10 μM) e, em seguida, fertilizada, de acordo com o item 3.2.3. A suspensão de zigotos foi irradiada com UVB, de acordo com o descrito no item 3.2.4, dez ou quarenta minutos após a indução da fertilização.

O desenvolvimento embrionário ocorreu na ausência de luz branca. As amostras foram fixadas em paraformaldeído (2%) e o desenvolvimento embrionário analisado em microscopia óptica comum nos intervalos de 90 (estágio de primeira clivagem) e 120 minutos (estágio de segunda clivagem). 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 18).

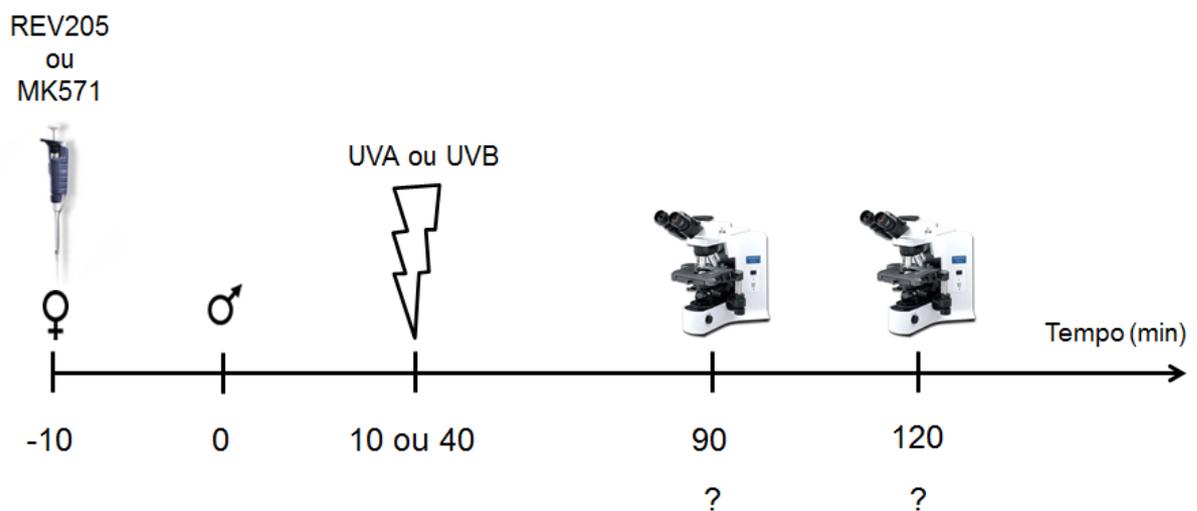


Figura 18: Protocolo experimental do ensaio do efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de zigotos (10 ou 40 minutos após a fertilização).

3.2.5.7 Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento larval: tratamento e exposição de gametas, zigotos e embriões no estágio de prisma

As suspensões de óvulos, espermatozoides e zigotos foram submetidas aos procedimentos de tratamento com os bloqueadores, irradiação e fertilização descritos nos itens 3.2.5.5, 3.2.5.6 e 3.2.5.7. Após esses procedimentos, os embriões (na concentração de 100 embriões por mL) foram transferidos para erlenmeyers contendo 100 mL de mFSW.

Para os tratamentos no estágio de prima, os óvulos foram fertilizados, de acordo com o item 3.2.3, e em seguida transferidos para erlenmeyers contendo 100 mL de mFSW. Vinte e quatro horas após a fertilização, as amostras foram tratadas com REV205 (10 μ M) ou MK571 (10 μ M), por 10 minutos, e posteriormente expostas à UVB e novamente transferidas para erlenmeyers contendo 100 mL de mFSW.

O desenvolvimento embrionário ocorreu sob fotoperíodo 12:12 (claro:escuro). As amostras foram monitoradas, em microscopia óptica comum, 48 horas após a fertilização. As fotomicrografias das larvas plúteos foram adquiridas com a câmera *Olympus Q-color 5* e as imagens foram capturadas na objetiva de 40 vezes.

O desenho experimental para esse protocolo é mostrado na figura 25A-D.

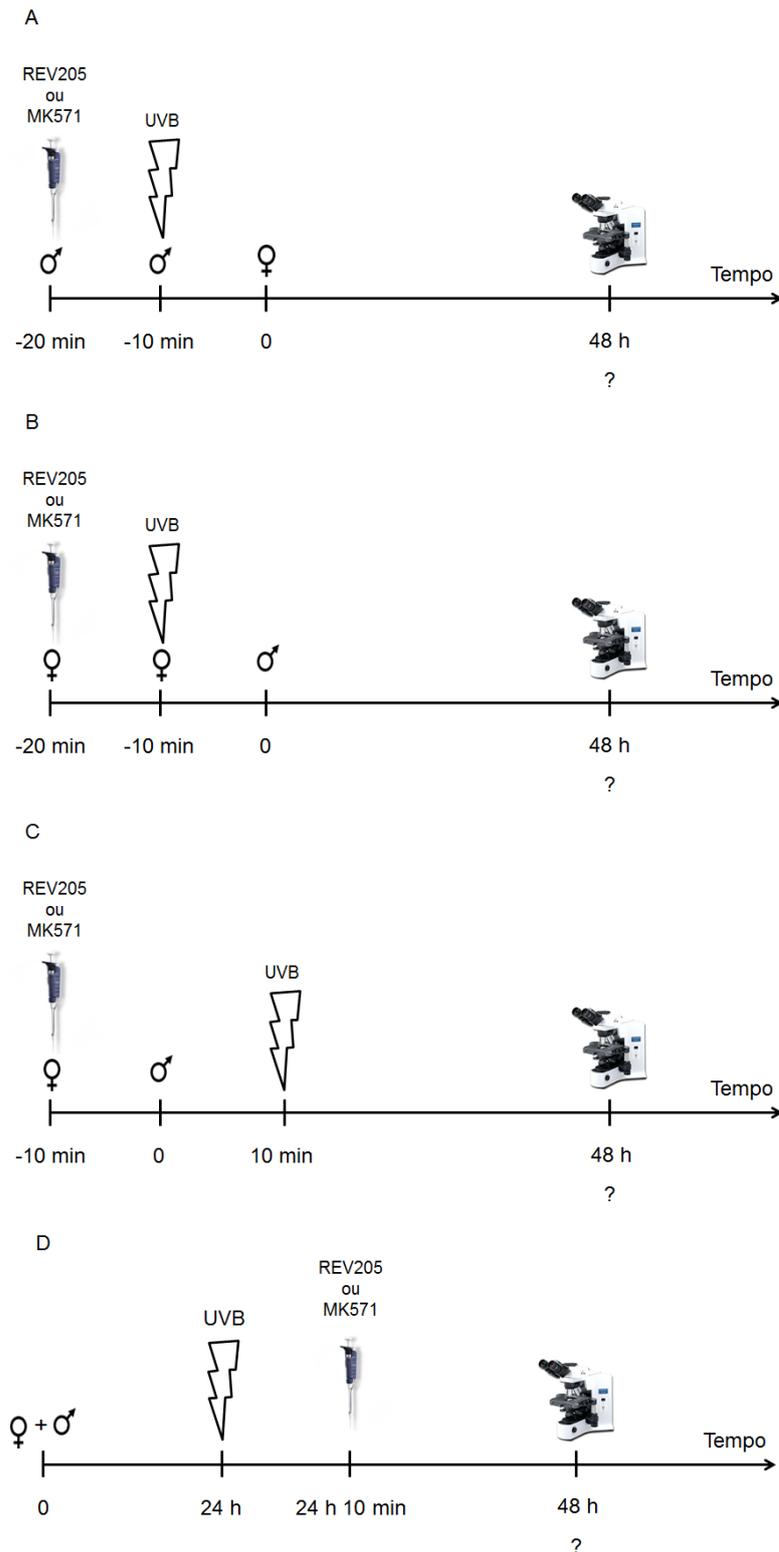


Figura 19: Protocolo experimental do ensaio do efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de gametas, zigotos e embriões no estágio de prisma. Os espermatozoides (A), óvulos (B), zigotos (C) ou embriões no estágio de prisma (D) foram tratados com os bloqueadores de proteínas ABC e posteriormente irradiados com UVB. O desenvolvimento larval foi acompanhado no intervalo de 48 horas após a indução da fertilização.

3.2.5.8 Efeito da radiação UVB sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio do acúmulo intracelular de C-AM

A C-AM é um substrato não fluorescente de transportadores ABC e seu acúmulo intracelular é inversamente proporcional à atividade dos transportadores ABC. A C-AM é convertida em calceína fluorescente por esterases intracelulares e a forma fluorescente da calceína não é um substrato de transportadores ABC sendo, portanto, retida no meio intracelular (HOLLO et al., 1994). Assim, uma alta fluorescência intracelular é indicativo de uma baixa atividade de transportadores ABC enquanto uma baixa fluorescência intracelular é sinal de uma elevada atividade dos transportadores (ESSODAIGUI et al., 1998). O princípio desse ensaio está ilustrado na figura 20.

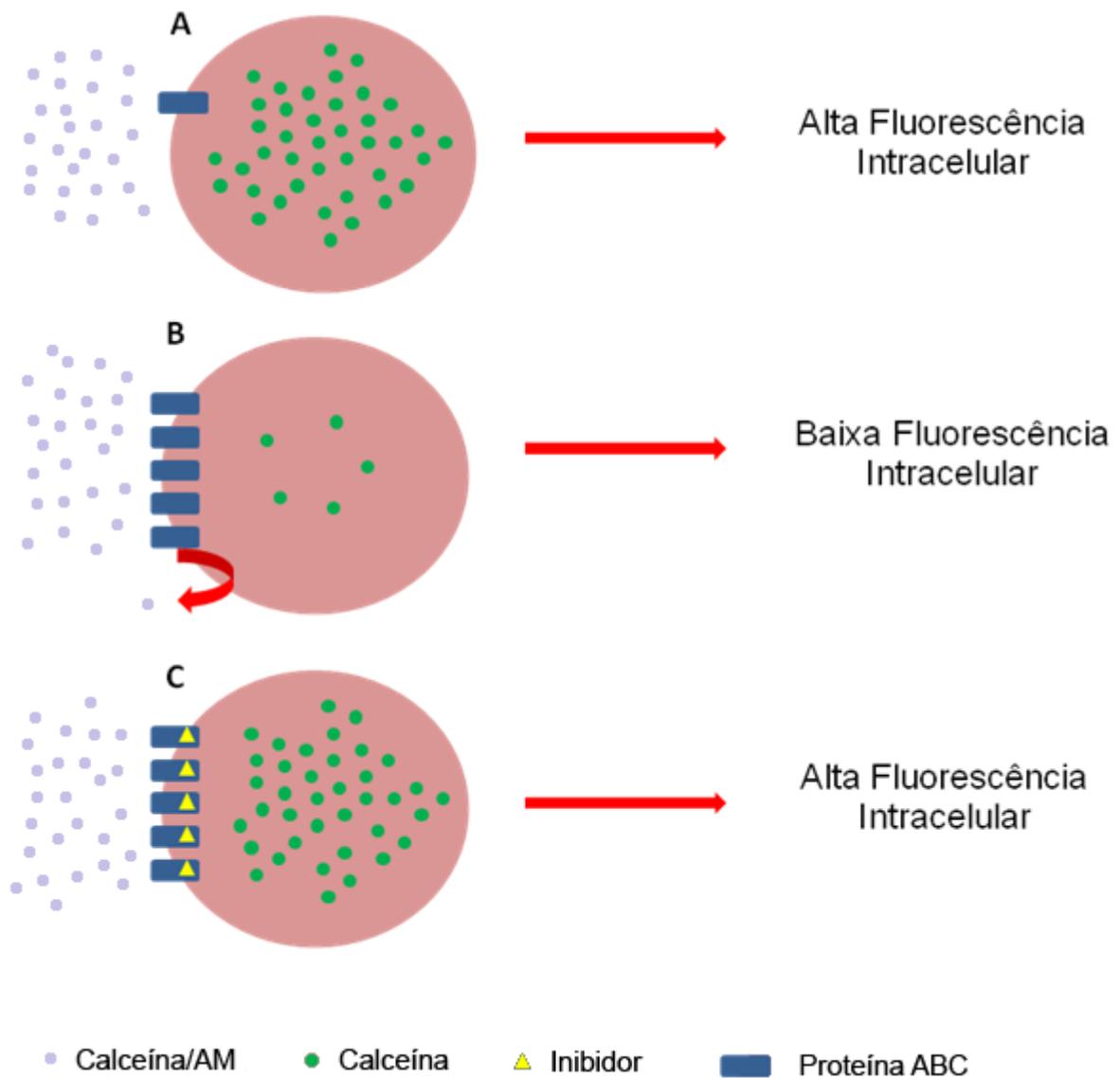


Figura 20: Representação esquemática do ensaio de C-AM para identificação de atividade de proteínas ABC em determinado tipo celular ou determinação de atividade moduladora de diversos agentes químicos ou físicos sobre os transportadores ABC. (A) Célula com baixa expressão de Proteínas ABC. (B) Célula com alta expressão de Proteínas ABC. (C) Célula com alta expressão de proteínas ABC tratada com um agente bloqueador.

O ensaio de acúmulo intracelular de C-AM foi realizado de acordo com De Souza e colaboradores (2010). Os óvulos ou os embriões (10 minutos após a fertilização) foram submetidos a diferentes doses de UVB e, em seguida, incubados com 250 nM de C-AM à $26 \pm 2^\circ\text{C}$, em placas de 24 poços, estéreis e protegidas da luz. O VP, um conhecido bloqueador de transportadores ABC, foi utilizado como controle positivo, sendo adicionado à cultura 10 minutos após a fertilização. Sessenta minutos após a fertilização, as amostras foram analisadas em microscopia de fluorescência (*Olympus BX41* equipado com uma lâmpada de halogênio). O comprimento de onda de excitação foi 450 – 480 nm e o comprimento de onda de emissão foi 515 – 700 nm. As imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas por uma câmera *Olympus Q-color 5*. Todas as imagens foram capturadas na objetiva de 40x. A intensidade de fluorescência foi analisada com o *software Image J* (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*), e os valores foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MIF). Um total de 100 embriões foi avaliado em cada amostra. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e no mínimo três vezes (figura 21).

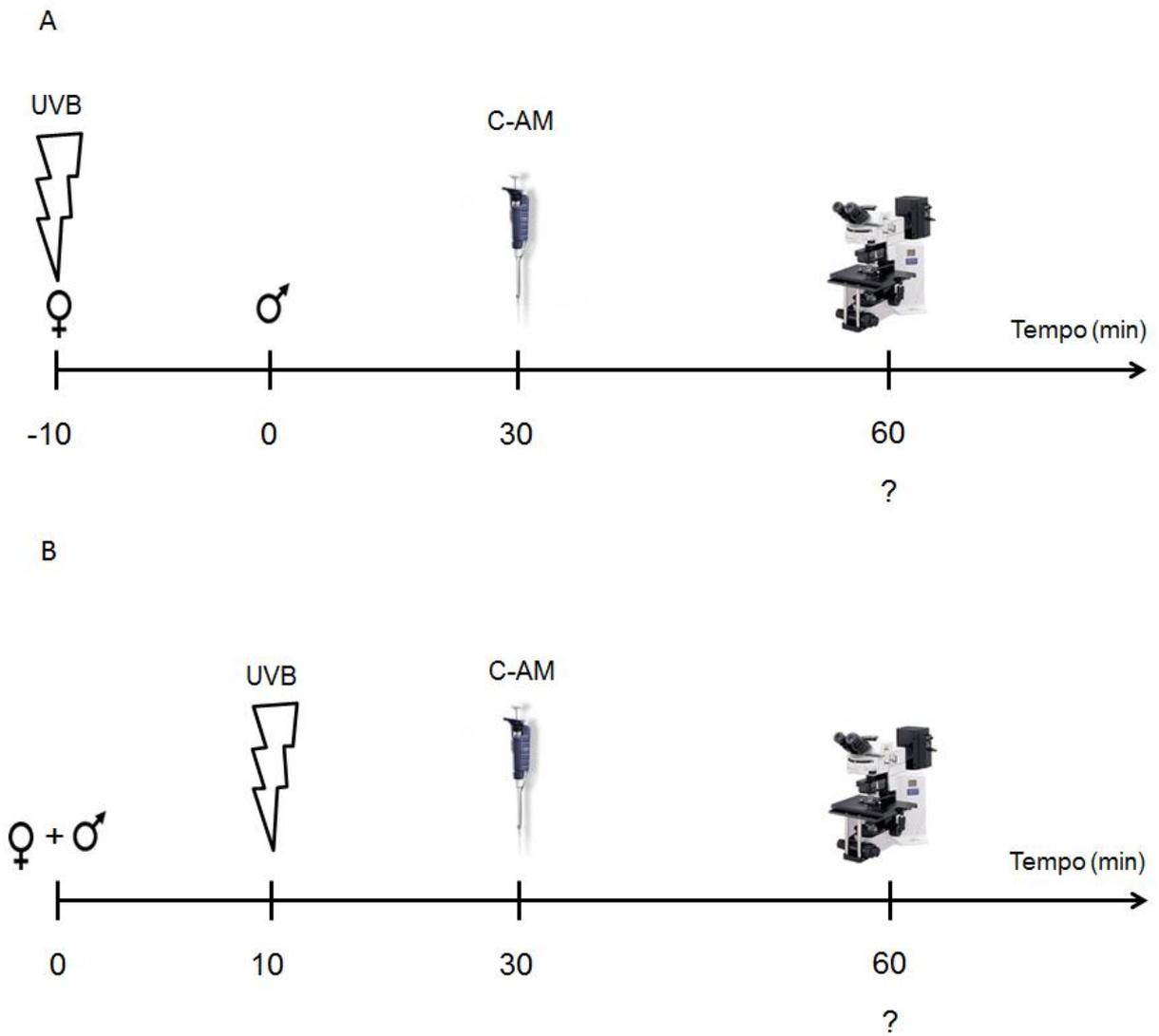


Figura 21: Protocolo experimental do ensaio de acúmulo de C-AM. Os óvulos (A) ou os embriões (B) foram submetidos a diferentes doses de UVB e, em seguida, incubados com 250 nM de C-AM à 26 + 2°C. Sessenta minutos após a fertilização, as amostras foram analisadas em microscopia de fluorescência. A intensidade de fluorescência foi analisada com o software Image J e os valores foram expressos como intensidade média da fluorescência.

3.2.5.9 Efeito da exposição à radiação UVB sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio da resistência à vimblastina

Esse ensaio também é utilizado para investigar a atividade funcional de transportadores ABC em diferentes tipos celulares, bem como avaliar a ação de fatores químicos ou físicos na modulação da atividade dessas proteínas. O princípio do ensaio está esquematizado na figura 22. A VL é um fármaco com propriedades antimitóticas que se liga à tubulina e inibe a polimerização de microtúbulos (NORBERG, 1969). A VL é um conhecido substrato de transportadores ABC, cuja atividade de efluxo é responsável por reduzir a concentração intracelular desse fármaco (UEDA et al., 1987). Células com alta expressão e atividade de transportadores ABC são mais resistentes ao efeito antimitótico da VL em comparação com células com baixa expressão e atividade dessas proteínas. Células tratadas com bloqueadores da atividade de transportadores ABC tornam-se sensíveis ao efeito antimitótico da VL.

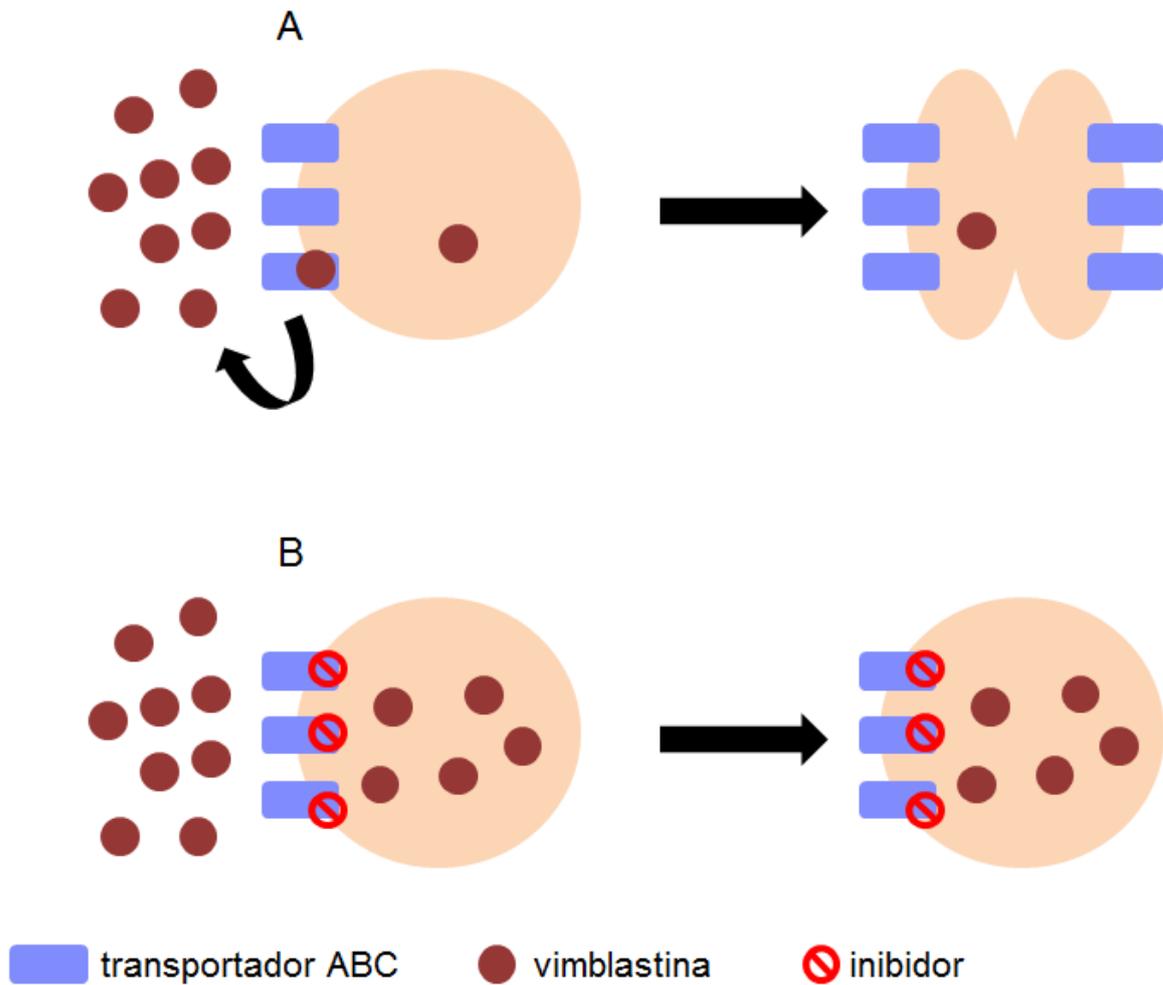


Figura 22: Representação esquemática do ensaio da resistência à VL, mediada por transportadores ABC. (A) Célula com alta expressão de Proteínas ABC. (B) Célula com alta expressão de proteínas ABC tratada com um inibidor.

O ensaio para investigar o efeito da UVB na resistência à VL mediada por transportadores ABC foi modificado de De Souza e colaboradores (2010). Os óvulos ou os embriões foram irradiados com uma dose sub-letal de UVB e tratados com VL (100 ou 400 nM). O VP foi utilizado como controle positivo, sendo adicionado à cultura 10 minutos após a fertilização. O desenvolvimento embrionário foi monitorado em microscopia óptica comum. As amostras foram fixadas em paraformaldeído (2%) e o desenvolvimento embrionário analisado em microscopia óptica comum 90 minutos após a fertilização (estágio de primeira clivagem). 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 23).

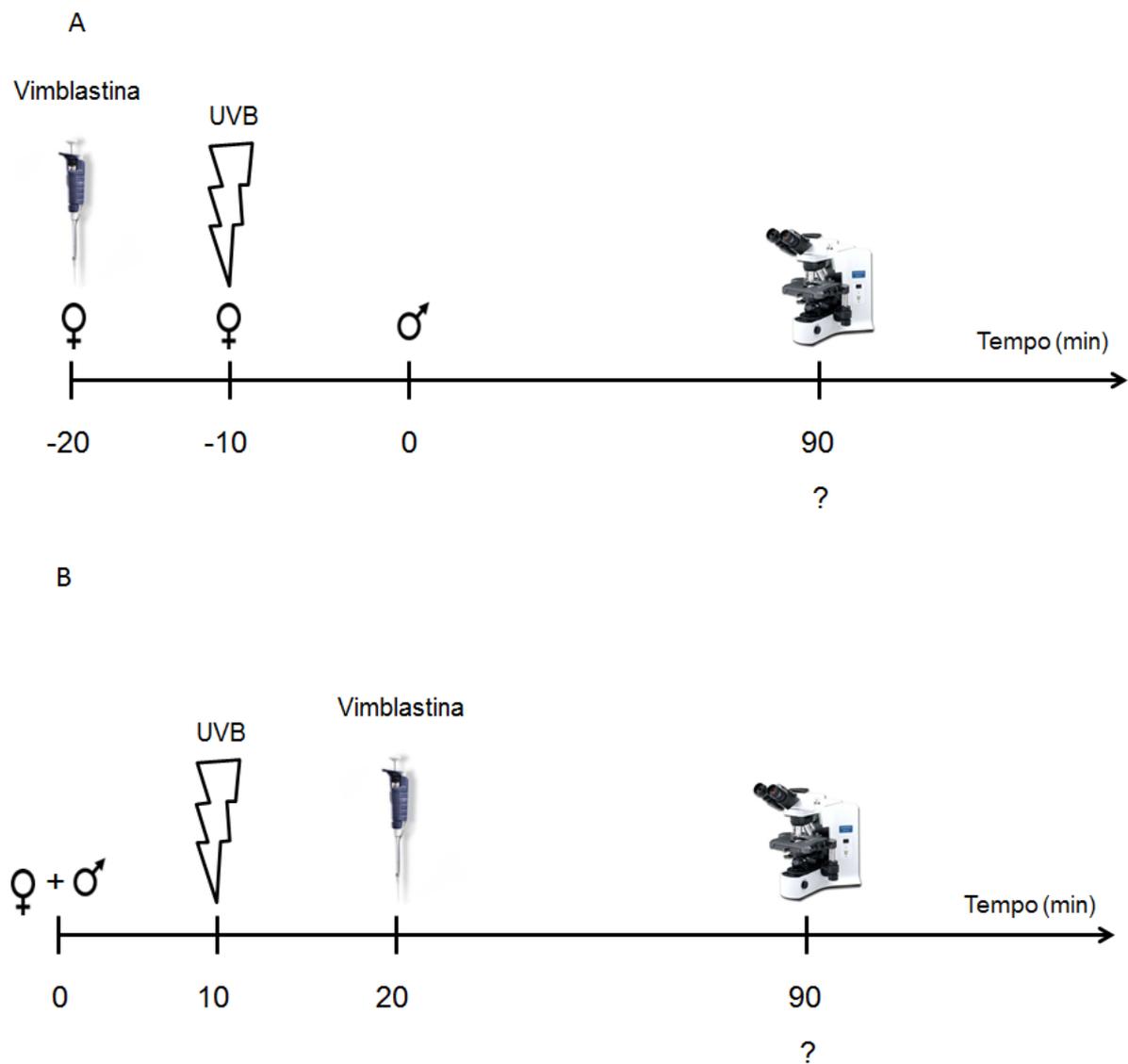


Figura 23: Protocolo experimental do ensaio da resistência à VL. Os óvulos (A) ou os embriões (B) foram submetidos a uma dose sub-letal de UVB e, em seguida, incubados com vimblastina (100 ou 400 nM). O desenvolvimento embrionário foi acompanhado em microscopia óptica comum durante o estágio de primeira clivagem.

3.2.5.10 Efeito da cumarina e de seus derivados sobre o desenvolvimento embrionário inicial

Os óvulos foram fertilizados como descrito no item 3.2.3. Dez minutos após a indução da fertilização, a suspensão de zigotos foi tratada com cumarina ou seus derivados, em diversas concentrações. O desenvolvimento embrionário ocorreu na ausência de luz branca. As amostras foram fixadas em paraformaldeído (2%) e o desenvolvimento embrionário analisado em microscopia óptica comum nos intervalos de 90 (estágio de primeira clivagem), 120 (estágio de segunda clivagem) e 240 minutos (estágio de mórula). 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 24).

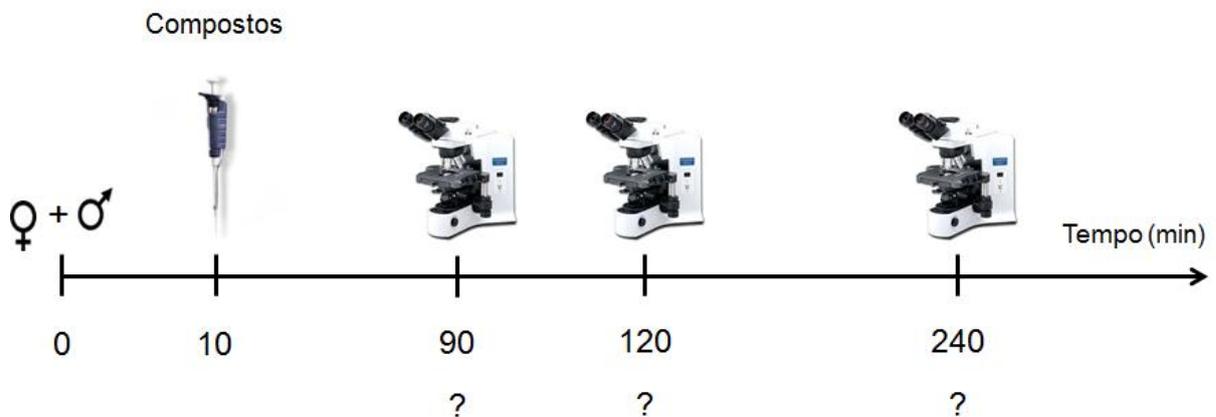


Figura 24: Protocolo experimental do ensaio do efeito da cumarina e de seus derivados sobre o desenvolvimento embrionário. Os óvulos foram fertilizados e dez minutos após a fertilização foram tratados com diversas concentrações dos compostos. O desenvolvimento embrionário foi acompanhado em microscopia óptica comum durante o estágio de primeira clivagem, segunda clivagem e durante o estágio de mórula.

3.2.5.11 Fotoatividade da cumarina e de seus derivados sobre zigotos expostos à radiação UVB: tratamento pré-irradiação

Os óvulos foram previamente tratados com a cumarina e seus derivados, e após dez minutos foram fertilizados com espermatozoides não tratados. Dez minutos após a fertilização os zigotos foram submetidos a uma dose de UVB ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$ – figura 25). O desenvolvimento embrionário ocorreu na ausência de luz branca. As amostras foram fixadas em paraformaldeído (2%) e o desenvolvimento embrionário analisado em microscopia óptica comum nos intervalos de 90 (estágio de primeira clivagem) e 120 (estágio de segunda clivagem) minutos após a fertilização. 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.

Compostos

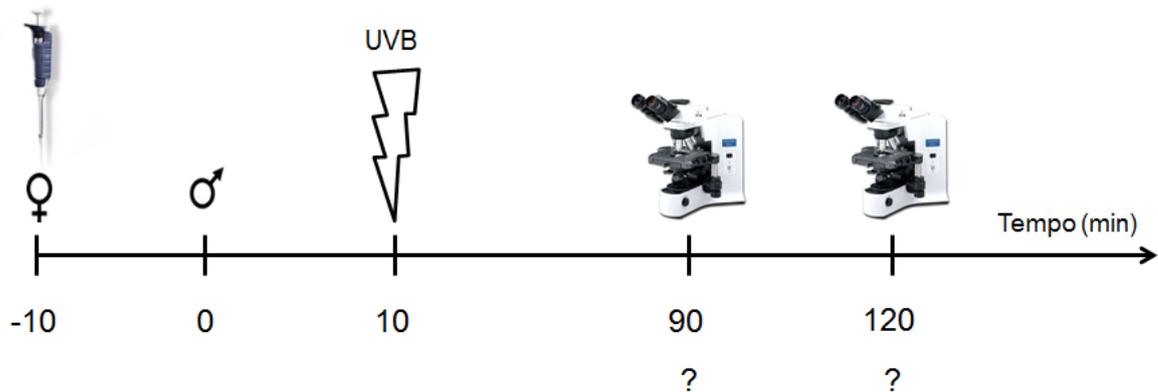


Figura 25: Protocolo experimental do ensaio da fotoatividade da cumarina e seus derivados sobre zigotos expostos à UVB: tratamento pré-irradiação. Os zigotos foram tratados com os compostos antes da irradiação com uma dose de UVB ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$). O desenvolvimento embrionário foi acompanhado em microscopia óptica comum durante o estágio de primeira e segunda clivagem.

3.2.5.12 Fotoatividade da cumarina e da 3-hidroxicumarina sobre zigotos expostos à radiação UVB: tratamento pós-irradiação

Os óvulos foram fertilizados e após dez minutos foram submetidos a uma dose de UVB ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$). Dez minutos após a irradiação os zigotos foram tratados com a cumarina e a 3-hidroxicumarina (figura 26). O desenvolvimento embrionário ocorreu na ausência de luz branca. As amostras foram fixadas em paraformaldeído (2%) e o desenvolvimento embrionário analisado em microscopia óptica comum nos intervalos de 90 (estágio de primeira clivagem) e 120 (estágio de segunda clivagem) minutos após a fertilização. 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.

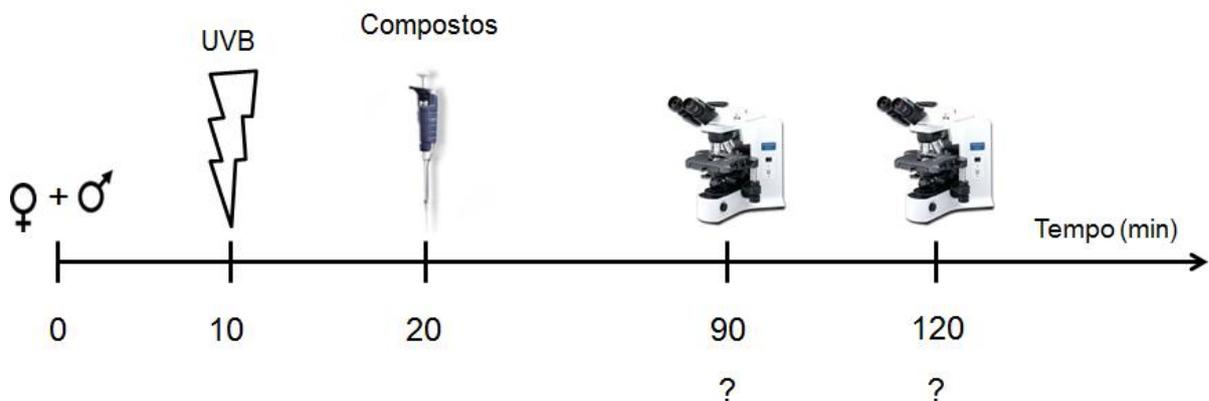


Figura 26: Protocolo experimental do ensaio da fotoatividade da cumarina e da 3-hidroxicumarina sobre zigotos expostos à UVB: tratamento pós-irradiação. Os zigotos foram tratados com os compostos antes da irradiação com uma dose de UVB ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$). O desenvolvimento embrionário foi acompanhado em microscopia óptica comum durante o estágio de primeira e segunda clivagem.

3.2.5.13 Fotoatividade da cumarina e da 3-hidroxycumarina sobre gametas expostos à radiação UVB

Os espermatozoides ou óvulos foram tratados com a cumarina ou a 3-hidroxycumarina dez minutos antes ou depois da exposição a uma dose de UVB ($0,056 \text{ kJ m}^{-2}$ e $0,45 \text{ kJ m}^{-2}$, respectivamente). Após os tratamentos, os procedimentos de irradiação e fertilização foram realizados de acordo com os itens 3.2.5.1, 3.2.5.2 e 3.2.5.3 (figuras 27A-D). O desenvolvimento embrionário ocorreu na ausência de luz branca. As amostras foram fixadas em paraformaldeído (2%) e o desenvolvimento embrionário analisado em microscopia óptica comum nos intervalos de 90 (estágio de primeira clivagem) e 120 (estágio de segunda clivagem) minutos após a fertilização. 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.

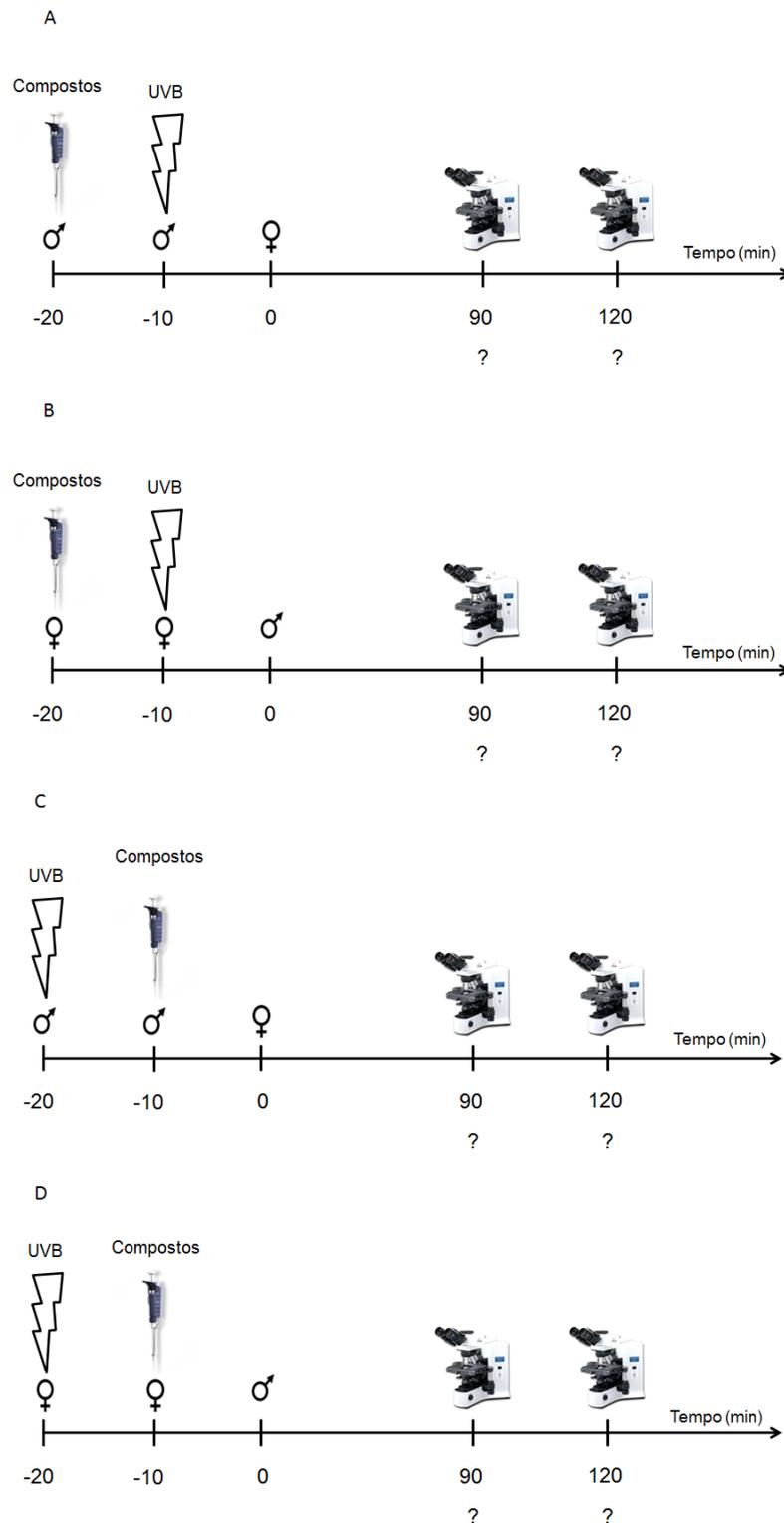


Figura 27: Protocolo experimental do ensaio da fotoatividade da cumarina e da 3-hidroxycumarina sobre gametas expostos à UVB: tratamento pré-irradiação (A-B) e tratamento pós-irradiação (C-D). Os espermatozoides (A ou C) ou os óvulos (B ou D) foram tratados com os compostos antes da irradiação com uma dose de UVB ($0,056 \text{ kJ m}^{-2}$ ou $0,45 \text{ kJ m}^{-2}$, respectivamente). O desenvolvimento embrionário foi acompanhado em microscopia óptica comum durante o estágio de primeira e segunda clivagem.

3.2.5.14 Efeito da cumarina e da 3-hidroxicumarina na atividade de transportadores ABC - Ensaio do acúmulo intracelular de C-AM

A investigação do efeito da cumarina e da 3-hidroxicumarina sobre a atividade dos transportadores ABC foi realizada por meio do ensaio de acúmulo intracelular de C-AM. Os óvulos foram fertilizados de acordo com o item 3.2.3, e 10 minutos após a fertilização, os zigotos foram tratados com a cumarina (1 μM) ou a 3-hidroxicumarina (1 μM). Trinta minutos após a fertilização, os zigotos foram incubados com 250 nM de C-AM à $26 \pm 2^\circ\text{C}$, em placas de 24 poços, estéreis e protegidas da luz. O VP foi utilizado como controle positivo e adicionado à cultura 10 minutos após a fertilização. As amostras foram analisadas em microscopia de fluorescência (*Olympus BX41* equipado com uma lâmpada de halogênio) 90 minutos após a fertilização. O comprimento de onda de excitação foi 450 – 480 nm e o comprimento de onda de emissão foi 515 – 700 nm. As imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas por uma câmera *Olympus Q-color 5*. Todas as imagens foram capturadas na objetiva de 40x. A intensidade de fluorescência foi analisada com o *software Image J* (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*), e os valores foram expressos como MIF. Um total de 100 embriões foi avaliado em cada amostra. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e no mínimo três vezes (figura 28).

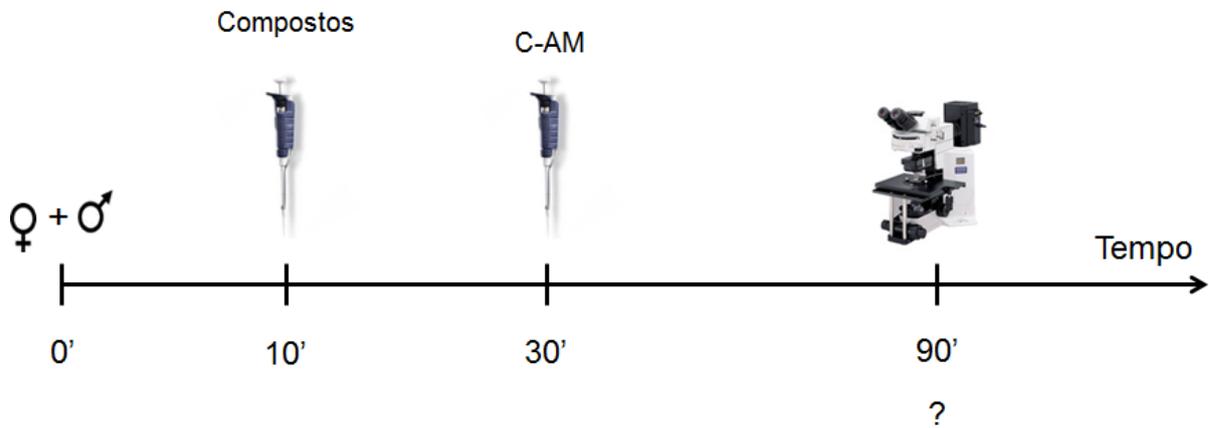


Figura 28: Protocolo experimental do ensaio de acúmulo intracelular da C-AM para investigar o efeito da cumarina e da 3-hidroxicumarina na modulação de transportadores ABC. Os embriões foram tratados com os compostos 10 minutos após a fertilização, e 30 minutos após a fertilização foram incubados com 250 nM de C-AM à 26 + 2°C. As amostras foram analisadas em microscopia de fluorescência 90 minutos após a fertilização. A intensidade de fluorescência foi analisada com o software Image J e os valores foram expressos como intensidade média da fluorescência.

3.2.5.15 Efeito da cumarina e da 3-hidroxicumarina na atividade de transportadores ABC – Ensaio da resistência à vimblastina

Os embriões foram tratados com a cumarina (1 μM) ou a 3-hidroxicumarina (1 μM) dez minutos após a fertilização e em seguida foram tratados com VL (100 ou 400 nM). O VP foi utilizado como controle positivo, sendo adicionado à cultura 10 minutos após a fertilização. O desenvolvimento embrionário foi monitorado em microscopia óptica comum. As amostras foram fixadas em paraformaldeído (2%) e o desenvolvimento embrionário analisado em microscopia óptica comum 90 minutos após a fertilização (estágio de primeira clivagem). 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 29).

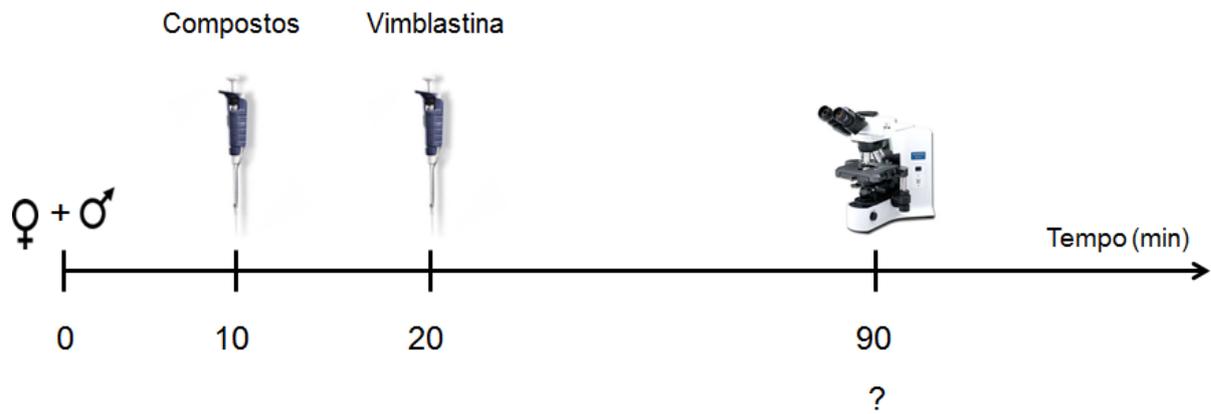


Figura 28: Protocolo experimental do ensaio de resistência à VL para investigar o efeito da cumarina e da 3-hidroxycumarina na modulação de transportadores ABC. Os embriões foram tratados com a cumarina ou a 3-hidroxycumarina e, em seguida, tratados com vimblastina (100 ou 400 nM). O desenvolvimento embrionário foi acompanhado em microscopia óptica comum durante o estágio de primeira clivagem.

3.2.6 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram expressos como média \pm 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. Os valores de DE_{50} , dose que promove 50% do 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 Efeito da radiação UVA sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides, óvulos ou embriões na ausência de luz branca

A exposição dos espermatozoides à UVA não inibiu a fertilização, uma vez que o índice de fertilização obtido foi maior que 95% em todos os tratamentos. De modo semelhante, a irradiação dos espermatozoides com diversas doses de UVA não afetou a progressão para a primeira clivagem. Nesses tratamentos o percentual de embriões que realizou a primeira divisão celular foi de $98,2 \pm 0,5\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), $98,8 \pm 0,9\%$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$), e $100,1 \pm 0,6\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$), em comparação ao grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos na progressão para a segunda clivagem e para os estágios de mórula e blástula (gráfico 1A).

A exposição dos óvulos à UVA não inibiu a fertilização. O desenvolvimento embrionário também não foi afetado pela irradiação. Durante a progressão para a primeira clivagem, o percentual de embriões que se encontrava no estágio supracitado, nas diferentes doses, foi de $93,2 \pm 1,8\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), $97,3 \pm 1,2\%$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$) e $98,6 \pm 1,9\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$) em comparação com o grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos na progressão para a segunda clivagem e para os estágios de mórula e blástula (gráfico 1B).

A exposição dos zigotos à UVA não afetou a progressão para o estágio de primeira clivagem. O percentual de embriões que realizou a primeira divisão celular foi de $99,4 \pm 0,6\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), $99,8 \pm 0,6\%$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$), e $99,6 \pm 1,2\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$), em comparação ao grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos na progressão para a segunda clivagem e para os estágios de mórula e blástula (gráfico 1C).

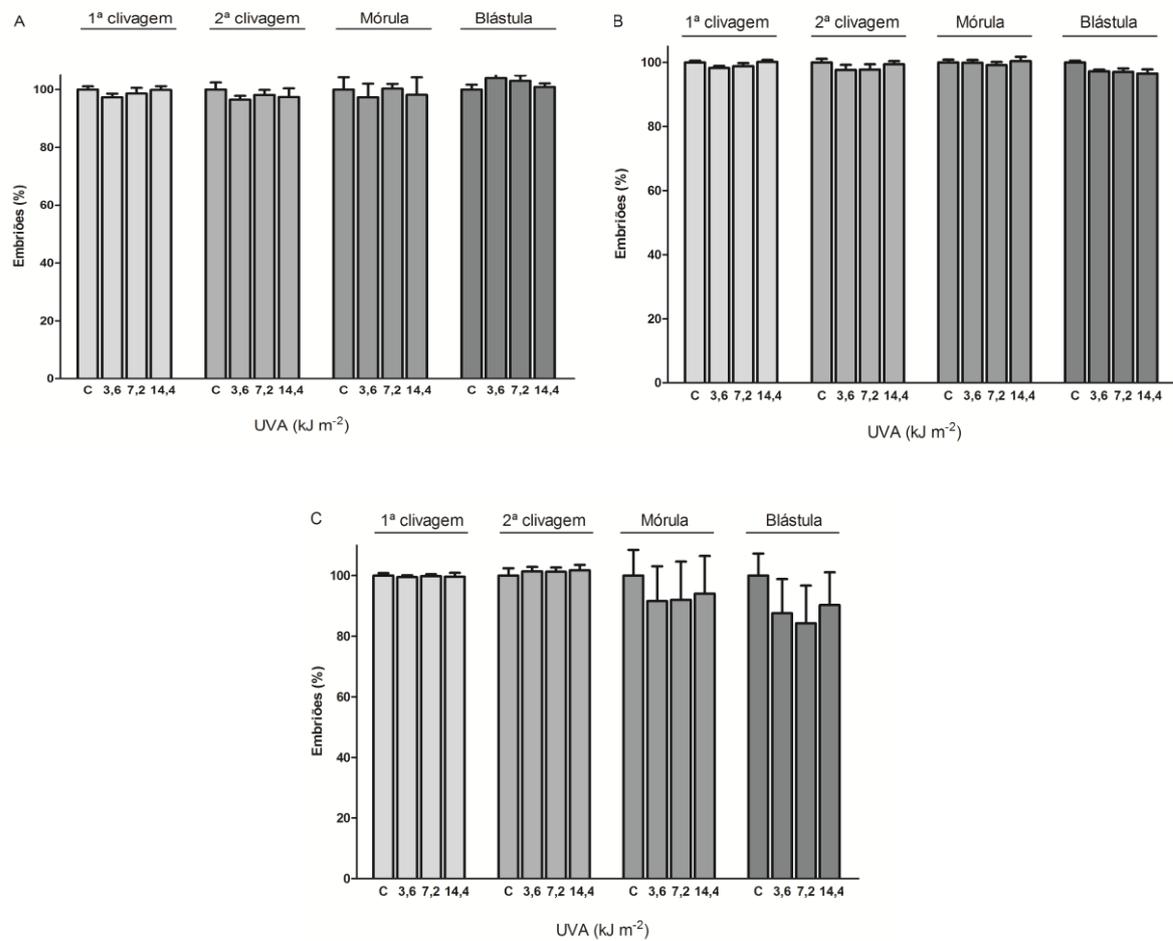


Gráfico 1: Efeito da UVA sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides (A), óvulos (B) ou embriões (C) na ausência de luz branca. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente.

4.2 Efeito da radiação UVA na concentração intracelular de ROS em espermatozoides, óvulos ou zigotos irradiados

Diversos trabalhos demonstraram que a exposição à UVA induz um drástico aumento na concentração intracelular de ROS, que é responsável pelos efeitos danosos desse tipo de radiação (REINHECKEL et al., 1999; YASUI; SAKURAI, 2000; BOSSI et al., 2008; COOPER et al., 2009). Dessa forma, fomos investigar se os níveis intracelulares de ROS em gametas e zigotos foram alterados pela exposição à UVA.

A exposição dos espermatozoides à UVA não alterou a intensidade de fluorescência intracelular do DCF. Enquanto que incubação com H_2O_2 (controle positivo) deslocou a curva de fluorescência intracelular do DCF para a direita, a irradiação nas três doses monitoradas não alterou o padrão da curva de fluorescência intracelular do DCF (gráfico 2).

A exposição dos óvulos à UVA também não alterou a intensidade de fluorescência intracelular do DCF. A MIF obtida no grupo controle foi de $17,8 \pm 0,5$ enquanto que no grupo tratado com H_2O_2 foi de $89,4 \pm 3,9$, um aumento de aproximadamente 5 vezes. A MIF obtida nos tratamentos com diferentes doses de UVA foi de $15,4 \pm 0,2$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$); $16,6 \pm 0,5$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$); e $14,0 \pm 0,4$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 3A).

De forma semelhante, a exposição dos zigotos à UVA também não alterou a intensidade de fluorescência intracelular do DCF. A MIF obtida no grupo controle foi de $29,9 \pm 1,6$ e no grupo tratado com H_2O_2 foi de $70,1 \pm 2,9$, enquanto que a MIF obtida nos tratamentos com diferentes doses de UVA foi de $31,7 \pm 1,8$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$); $32,1 \pm 1,1$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$); e $23,5 \pm 1,0$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 3B).

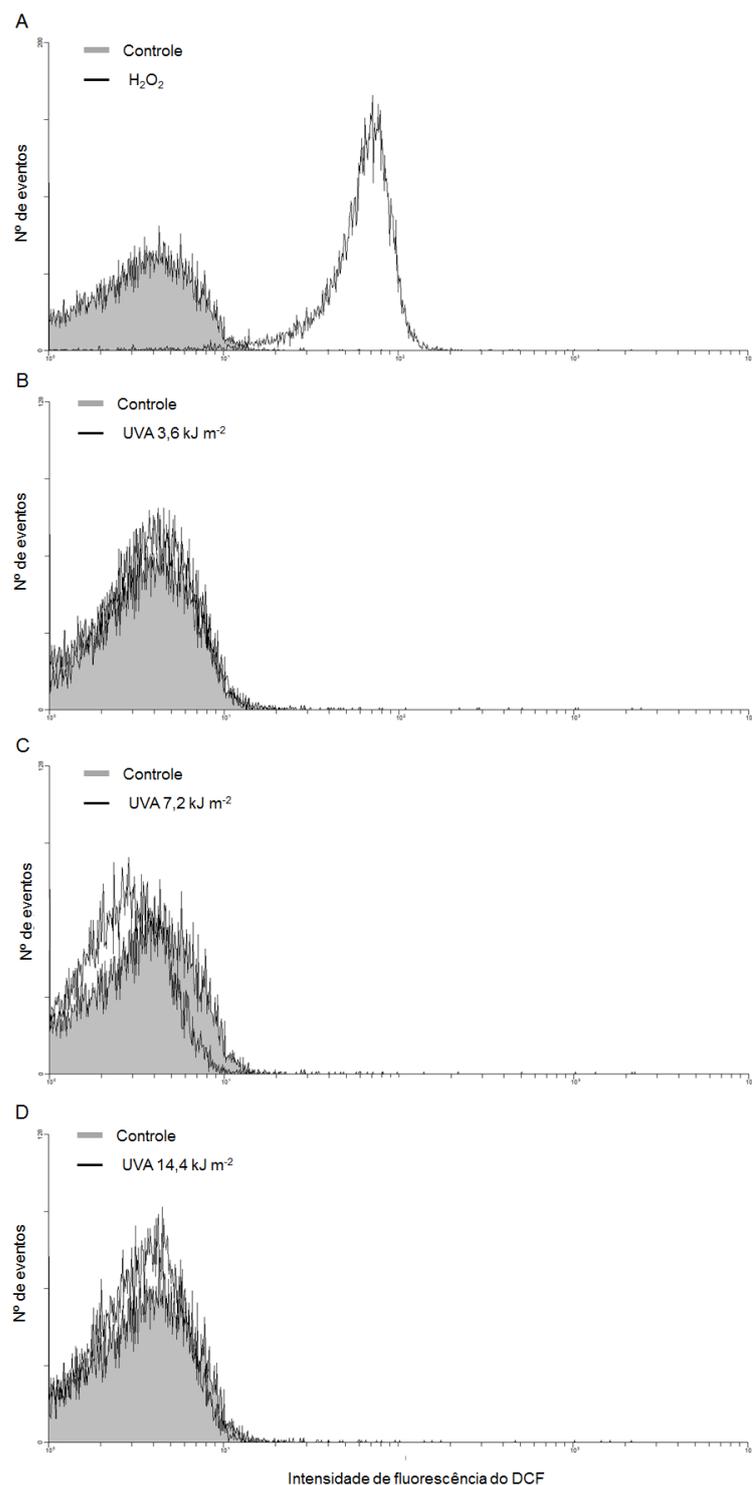


Gráfico 2: Efeito da UVA na concentração intracelular de ROS em espermatozoides. Os espermatozoides foram submetidos a diferentes doses de UVA e a concentração intracelular de ROS foi avaliada pelo acúmulo de H₂DCF-DA. O controle representa os espermatozoides não irradiados e marcados com H₂DCF-DA (10 μM). Os histogramas são representativos de 3 experimentos realizados em duplicata e de maneira independente.

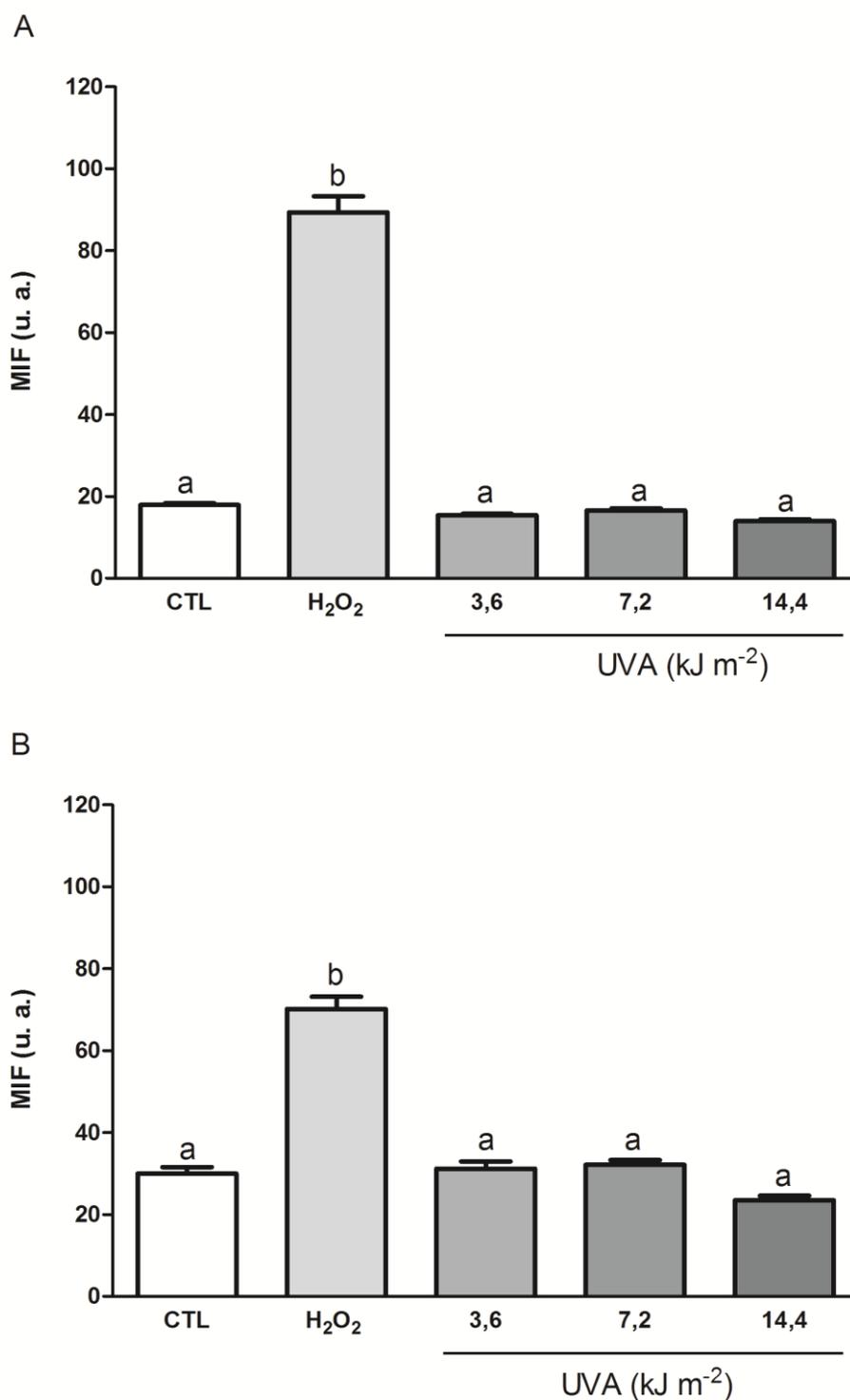


Gráfico 3: Efeito da UVA na concentração intracelular de ROS em óvulos (A) e em embriões (B). Os dados foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MIF) \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Em cada experimento foram analisados 100 embriões. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$). u.a.: unidades arbitrárias de fluorescência.

4.3 Efeito da radiação UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides na ausência de luz branca

A exposição à UVB diminuiu drasticamente a capacidade de fertilização dos espermatozoides, e conseqüentemente a formação dos zigotos, em doses superiores a $3,6 \text{ kJ m}^{-2}$ (dados não mostrados). Por esta razão, neste ensaio não foi utilizada doses maiores que a supracitada.

A UVB também diminuiu o índice de desenvolvimento embrionário. A progressão para a primeira clivagem foi atrasada, de forma dependente de dose, a partir de $0,028 \text{ kJ m}^{-2}$. Nesses tratamentos, a percentagem de inibição nas diferentes doses foi de $21,6 \pm 3,4\%$ ($0,056 \text{ kJ m}^{-2}$), $44,6 \pm 3,6\%$ ($0,112 \text{ kJ m}^{-2}$), $67,2 \pm 4,3\%$ ($0,225 \text{ kJ m}^{-2}$), $96,1 \pm 1,2\%$ ($0,45 \text{ kJ m}^{-2}$), $99,0 \pm 0,5\%$ ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$) e $100,0 \pm 0,0\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$), em comparação com o grupo controle (gráfico 4A).

O atraso na progressão para a segunda clivagem variou de um percentual de $25,3 \pm 1,9\%$ ($0,028 \text{ kJ m}^{-2}$) a $100,0 \pm 0,0\%$ ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$), em comparação com grupo controle (gráfico 4B).

A progressão para o estágio de mórula foi menos sensível à irradiação dos espermatozoides com UVB, uma vez que o percentual de inibição nas diferentes doses foi de $33,3 \pm 2,2\%$ ($0,45 \text{ kJ m}^{-2}$), $87,0 \pm 2,1\%$ ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$), $97,9 \pm 0,7\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$) e $100,0 \pm 0,0\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), em comparação com grupo controle (gráfico 4C).

Resultados similares foram observados na progressão para o estágio de blástula, o qual foi bloqueado em doses superiores a $0,45 \text{ kJ m}^{-2}$ (gráfico 4D).

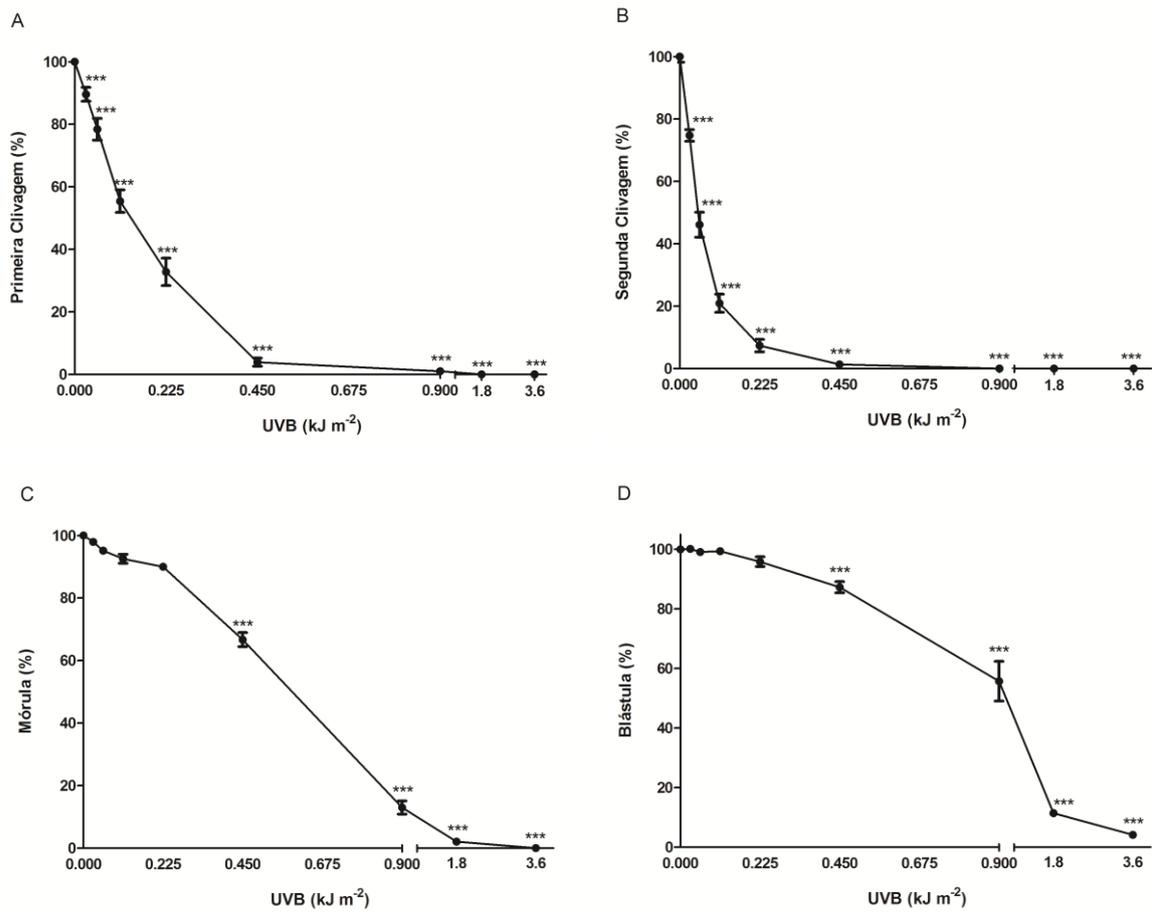


Gráfico 4: Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de espermatozoides na ausência de luz branca. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. *** $P < 0,001$ comparado com o grupo controle (teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey).

4.4 Efeito da radiação UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de óvulos na ausência de luz branca

A exposição dos óvulos à UVB não inibiu a fertilização, em nenhuma das doses analisadas (dados não mostrados). No entanto, a progressão para a primeira clivagem foi atrasada nas amostras irradiadas, de maneira dependente de dose. O percentual de inibição da primeira divisão celular variou de $20,3 \pm 1,5\%$ ($0,112 \text{ kJ m}^{-2}$) a $100,0 \pm 0,0\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 5A).

O atraso no desenvolvimento embrionário foi ainda mais acentuado na progressão para a segunda clivagem. A percentagem de inibição desse estágio, nas diferentes doses, foi de $35,5 \pm 4,2\%$ ($0,112 \text{ kJ m}^{-2}$), $43,4 \pm 3,1\%$ ($0,225 \text{ kJ m}^{-2}$), $62,2 \pm 3,4\%$ ($0,45 \text{ kJ m}^{-2}$), $67,9 \pm 3,1\%$ ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$), $85,8 \pm 2,6\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$), $91,2 \pm 1,4\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), $98,2 \pm 1,0\%$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$) e $100,0 \pm 0,0\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$), em comparação com o grupo controle (gráfico 5B).

A progressão para o estágio de mórula também foi menos sensível à irradiação dos óvulos com UVB. O percentual de inibição nas diferentes doses foi de $30,3 \pm 7,0\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$), $53,7 \pm 7,7\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), $88,7 \pm 0,3\%$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$) e $100,0 \pm 0,0\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$), em comparação ao grupo controle (gráfico 5C).

Resultados similares foram observados na progressão para o estágio de blástula, cujo percentual de inibição variou de $16,7 \pm 5,5\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$) a $100,0 \pm 0,0\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 5D).

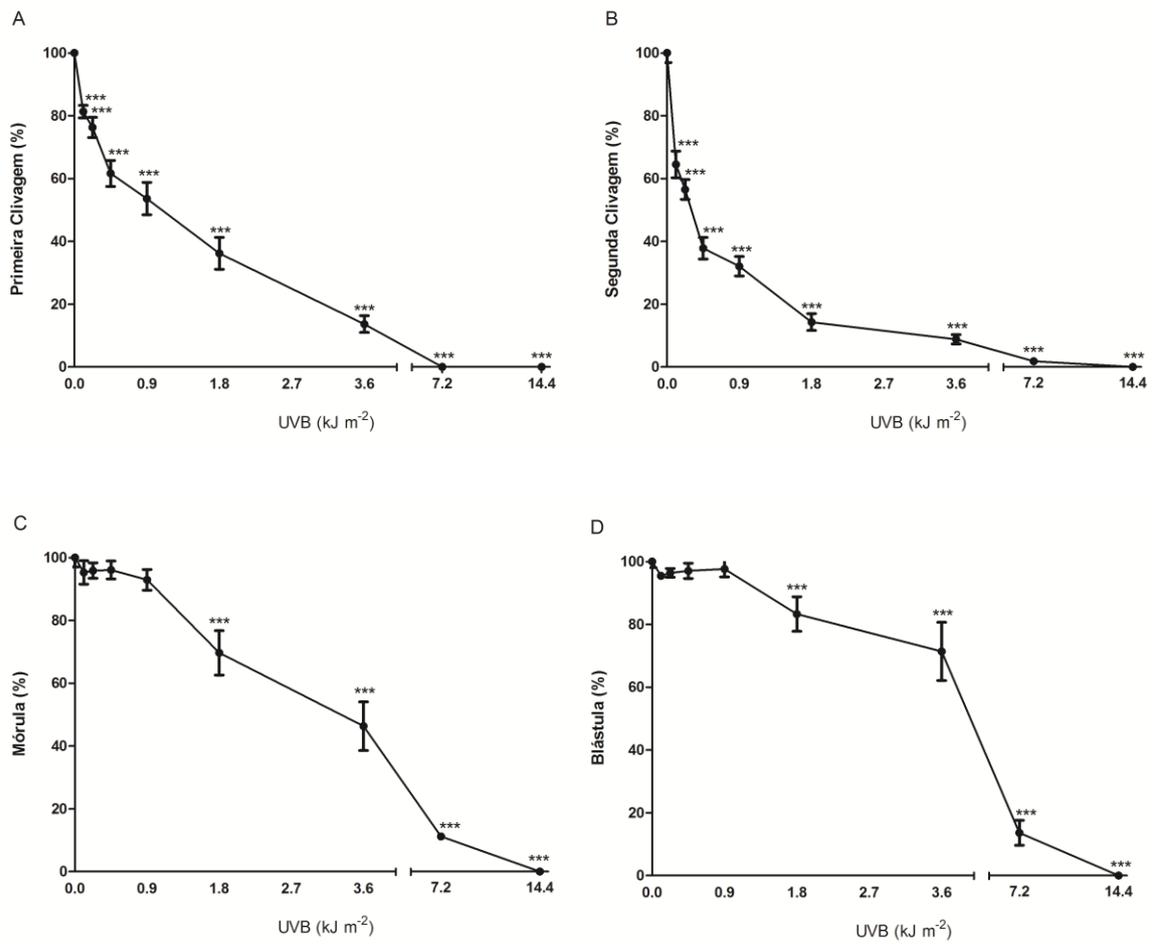


Gráfico 5: Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de óvulos na ausência de luz branca. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. *** $P < 0,001$ comparado com o grupo controle (teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey).

4.5 Efeito da radiação UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de óvulos e espermatozoides na ausência de luz branca

A exposição de ambos os gametas à UVB atrasou a progressão para a primeira clivagem de forma mais efetiva. O percentual de inibição da primeira divisão celular variou de $25,4 \pm 6,5\%$ ($0,056 \text{ kJ m}^{-2}$) a $100,0 \pm 0,0\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 6A).

O atraso na progressão para a segunda clivagem variou de um percentual de $20,6 \pm 7,4\%$ ($0,014 \text{ kJ m}^{-2}$) a $100,0 \pm 0,0\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$), em comparação com grupo controle (gráfico 6B).

A progressão para o estágio de mórula foi menos sensível à exposição dos óvulos e espermatozoides à UVB. A percentagem de inibição desse estágio nas diferentes doses foi de $26,2 \pm 5,0\%$ ($0,112 \text{ kJ m}^{-2}$), $36,3 \pm 5,2\%$ ($0,225 \text{ kJ m}^{-2}$), $70,9 \pm 3,5\%$ ($0,45 \text{ kJ m}^{-2}$), $88,3 \pm 2,1\%$ ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$), $99,1 \pm 0,5\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$) e $100,0 \pm 0,0\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), em comparação ao grupo controle (gráfico 6C).

Resultados semelhantes foram obtidos na progressão para o estágio de blástula, o qual foi atrasado somente em doses superiores a $0,9 \text{ kJ m}^{-2}$ (gráfico 6D).

4.6 Efeito da radiação UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de zigotos (10 minutos após a fertilização) na ausência de luz branca

A exposição dos zigotos à UVB atrasou a progressão para a primeira clivagem, de maneira dependente de dose. O percentual de inibição da primeira divisão celular variou de $21,8 \pm 1,8\%$ ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$) a $100,0 \pm 0,0\%$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 7A).

Resultados similares foram obtidos na progressão para o estágio de segunda clivagem, o qual foi retardado em doses superiores a $0,45 \text{ kJ m}^{-2}$ (gráfico 7B).

A progressão para o estágio de mórula foi menos sensível à exposição dos zigotos à UVB. A percentagem de inibição desse estágio nas diferentes doses foi de $11,4 \pm 1,2\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$), $36,3 \pm 1,7\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), $75,0 \pm 1,3\%$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$) e $100,0 \pm 0,0\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$), em comparação ao grupo controle (gráfico 7C).

A progressão para o estágio de blástula também foi menos sensível à exposição dos zigotos à UVB, o qual foi atrasado somente em doses superiores a $7,2 \text{ kJ m}^{-2}$ (gráfico 7D).

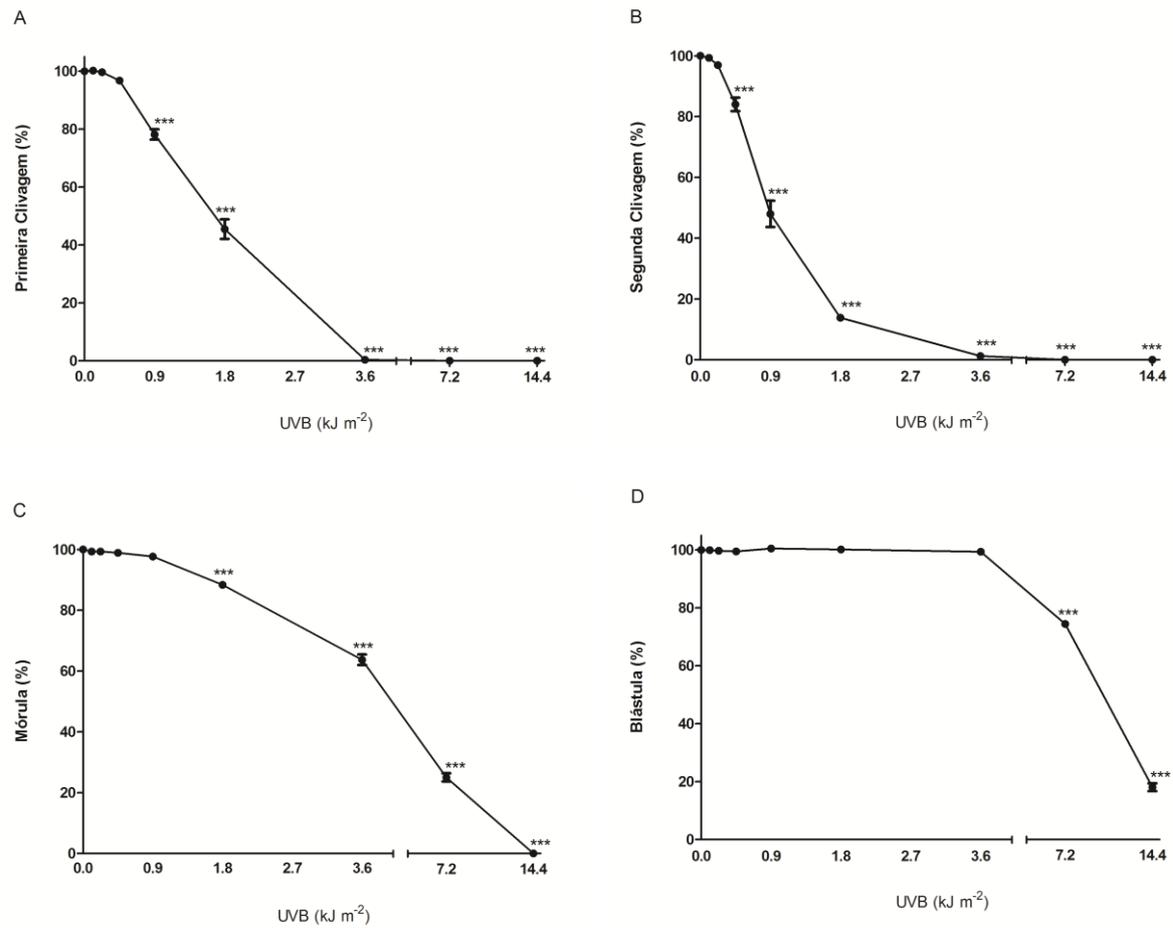


Gráfico 7: Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de zigotos (10 minutos após a fertilização) na ausência de luz branca. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. *** $P < 0,001$ comparado com o grupo controle (teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey).

4.7 Comparação da sensibilidade de espermatozoides, óvulos e zigotos à irradiação com UVB

Para comparar os diferentes graus de sensibilidade à UVB, foi calculada a DE_{50} (dose que induz 50% do efeito máximo) para todos os estágios analisados e tratamentos realizados. Os valores obtidos são apresentados na forma de média e intervalo de confiança 95% (tabela 1).

Tabela 1: Valores da DE_{50} para o efeito inibitório da UVB sobre o desenvolvimento embrionário derivado de espermatozoides, óvulos ou zigotos irradiados.

	DE_{50} – Média \pm EPM kJ m^{-2}		
	Exposição de espermatozoides	Exposição de óvulos	Exposição de zigotos
1ª Clivagem	0,153 \pm 0,07	0,980 \pm 0,55	1,691 \pm 0,69
2ª Clivagem	0,056 \pm 0,12	0,277 \pm 0,58	0,876 \pm 0,45
Mórula	0,564 \pm 0,26	3,240 \pm 0,34	4,898 \pm 0,38
Blástula	0,925 \pm 0,23	4,750 \pm 0,36	7,874 \pm 0,10

Pode-se observar que os menores valores da DE_{50} , para todos os estágios monitorados, foram obtidos quando os espermatozoides foram expostos à UVB. Em contraste, os maiores valores da DE_{50} foram obtidos nos estágios do desenvolvimento embrionário derivado de zigotos irradiados.

Foi verificado também que, em todos os tratamentos, o estágio de segunda clivagem apresentou os menores valores da DE_{50} , seguido dos estágios de primeira clivagem, mórula e blástula.

4.8 Efeito da radiação UVB na concentração intracelular de ROS em espermatozoides, óvulos ou zigotos irradiados

Alguns trabalhos demonstraram que a exposição à UVB também pode induzir um aumento na concentração intracelular de ROS, que é responsável pela degradação de macromoléculas celulares e potencialização dos efeitos danosos desse tipo de radiação (HASEGAWA et al., 1992; ZHANG et al., 1997). Portanto, fomos investigar se os níveis intracelulares de ROS em gametas e zigotos foram alterados pela exposição à UVB.

A exposição dos espermatozoides à UVB não alterou a intensidade de fluorescência intracelular do DCF. Enquanto que a incubação com H₂O₂ (controle positivo) deslocou a curva de fluorescência intracelular do DCF para a direita, a irradiação nas três doses monitoradas não alterou o padrão da curva de fluorescência intracelular do DCF (gráfico 8).

A exposição dos óvulos à UVB também não alterou a intensidade de fluorescência intracelular do DCF, conforme observado nos ensaios em microscopia de fluorescência. A MIF obtida no grupo controle foi de $31,7 \pm 2,8$ enquanto que em óvulos incubados com H₂O₂ foi de $211,4 \pm 8,2$, um aumento de aproximadamente 6 vezes. A IMF obtida nos tratamentos com diferentes doses de UVA foi de $35,4 \pm 2,7$ ($0,112 \text{ kJ m}^{-2}$); $22,5 \pm 0,5$ ($0,45 \text{ kJ m}^{-2}$); e $24,3 \pm 1,0$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 9A).

De forma semelhante, a exposição dos zigotos à UVA também não alterou a intensidade de fluorescência intracelular do DCF. A IMF obtida no grupo controle foi de $31,9 \pm 0,8$ e no grupo tratado com H₂O₂ foi de $103,3 \pm 2,2$, enquanto que a MIF obtida nos tratamentos com diferentes doses de UVA foi de $30,6 \pm 1,2$ ($0,45 \text{ kJ m}^{-2}$); $29,5 \pm 1,8$ ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$); e $29,7 \pm 5,9$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 9B).

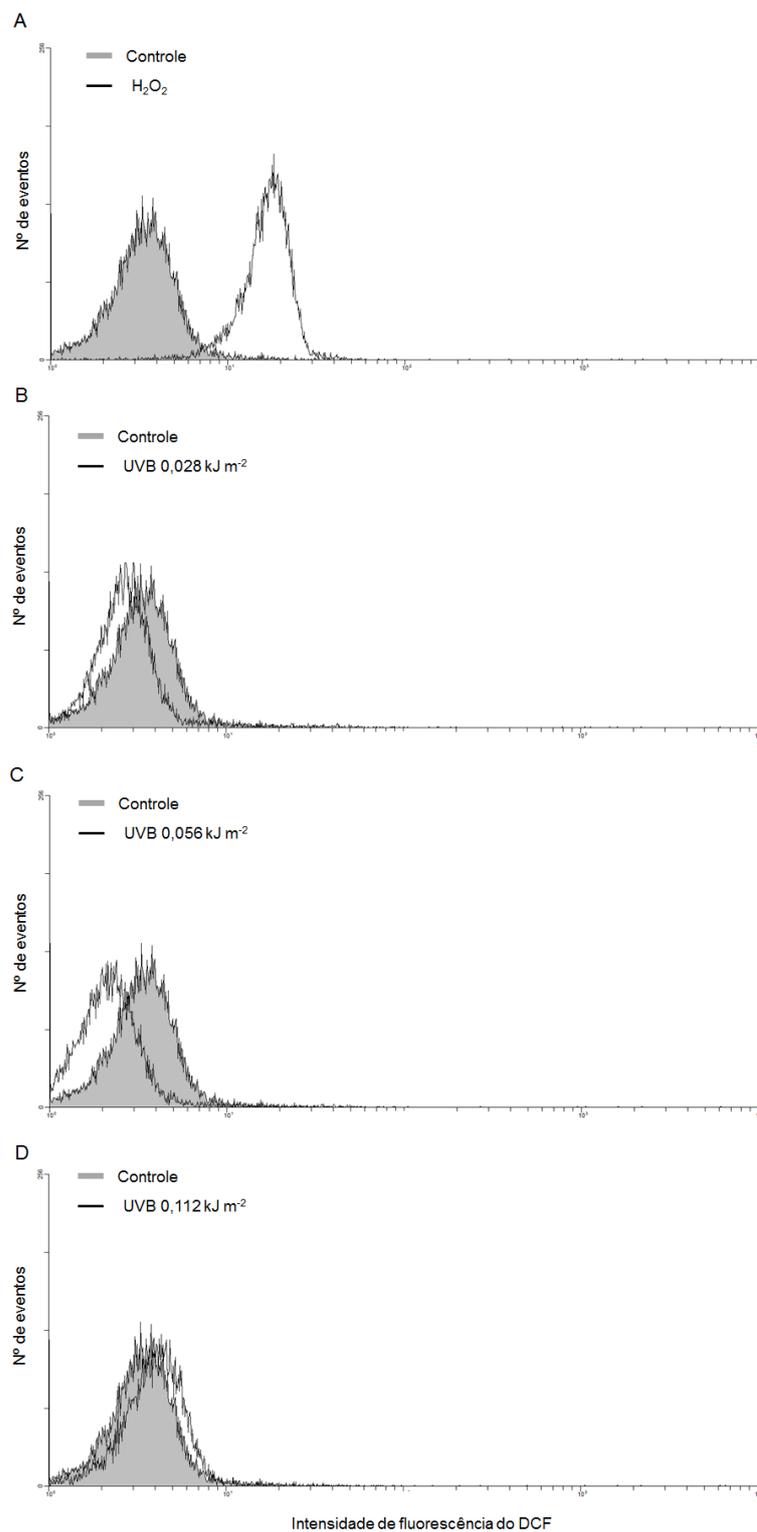


Gráfico 8: Efeito da UVB na concentração intracelular de ROS em espermatozoides. Os espermatozoides foram submetidos a diferentes doses de UVB e a concentração intracelular de ROS foi avaliada pelo acúmulo de DCF. O controle representa os espermatozoides não irradiados e marcados com DCFH-DA. Os histogramas são representativos de 3 experimentos realizados em duplicata e de maneira independente.

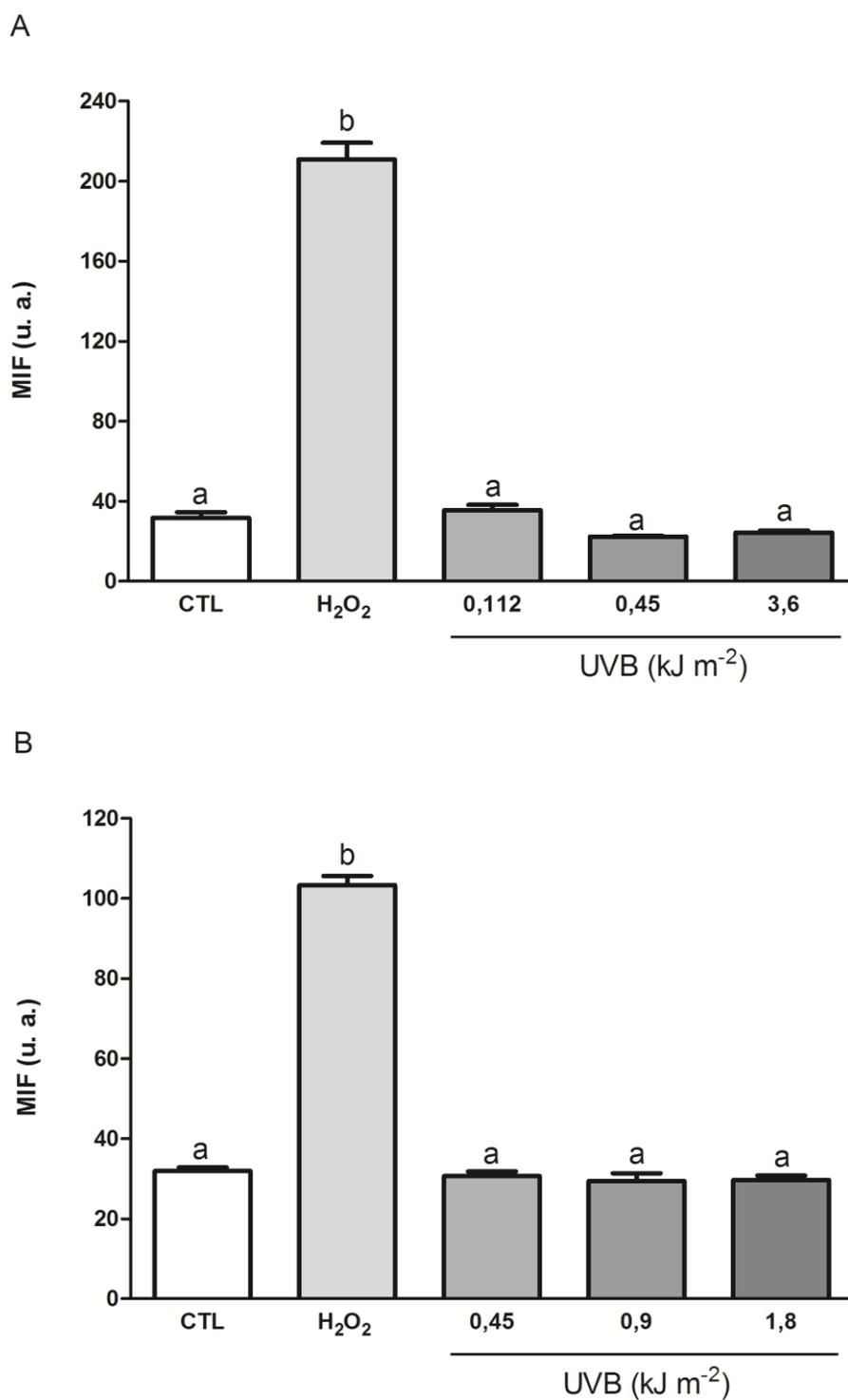


Gráfico 9: Efeito da UVB na concentração intracelular de ROS em óvulos (A) ou embriões (B). Os dados foram expressos como média da intensidade de fluorescência (MIF) \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Em cada experimento foram analisados 100 embriões. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$). u.a.: unidades arbitrárias de fluorescência.

4.9 Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de espermatozoides na presença de luz branca

A fotoliase é uma enzima monomérica com 420 a 616 aminoácidos, que contém um cofator catalítico de dinucleotídio de flavina e adenina (FAD) e um cofator que absorve fótons. Dependendo do subtipo da enzima o segundo cofator por ser a meteniltetrahidrofolato pterina ou a 8-hidroxi-7,8-dimetil-5-deazariboflavina. A fotoliase é responsável pelas reações de fotoreparo aos danos no DNA induzidos por vários tipos de radiação (AUBERT et al., 2000; FUJIHASHI et al., 2007). Isely e colaboradores (2009) demonstraram a presença do mRNA da fotoliase em gônadas, óvulos fertilizados, embriões no estágio de gástrula e prisma, e em larva plúteos do ouriço-do-mar *Sterechinus neumayeri*.

Mediante o exposto, fomos investigar se ocorre atividade de fotoreparo em *E. lucunter* e se esse mecanismo é capaz de reverter os danos no desenvolvimento embrionário induzidos pela UVB.

A exposição dos espermatozoides à UVB, na presença de luz branca, atrasou a progressão para a primeira clivagem apenas nas duas doses mais elevadas. O percentual de inibição obtido foi de $59,6 \pm 1,4\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$) e $71,7 \pm 2,1\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 10A). A progressão para a segunda clivagem também foi atrasada nessas doses e o percentual de inibição foi de $70,7 \pm 2,2\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$) e $86,3 \pm 1,7\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 10B).

A progressão para o estágio de mórula foi menos sensível à exposição dos espermatozoides à UVB, na presença de luz branca. O desenvolvimento para esse estágio foi atrasado apenas na dose mais elevada, obtendo um percentual de inibição de $18,4 \pm 1,8\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 10C). Resultados semelhantes foram obtidos na progressão para o estágio de blástula (gráfico 10D).

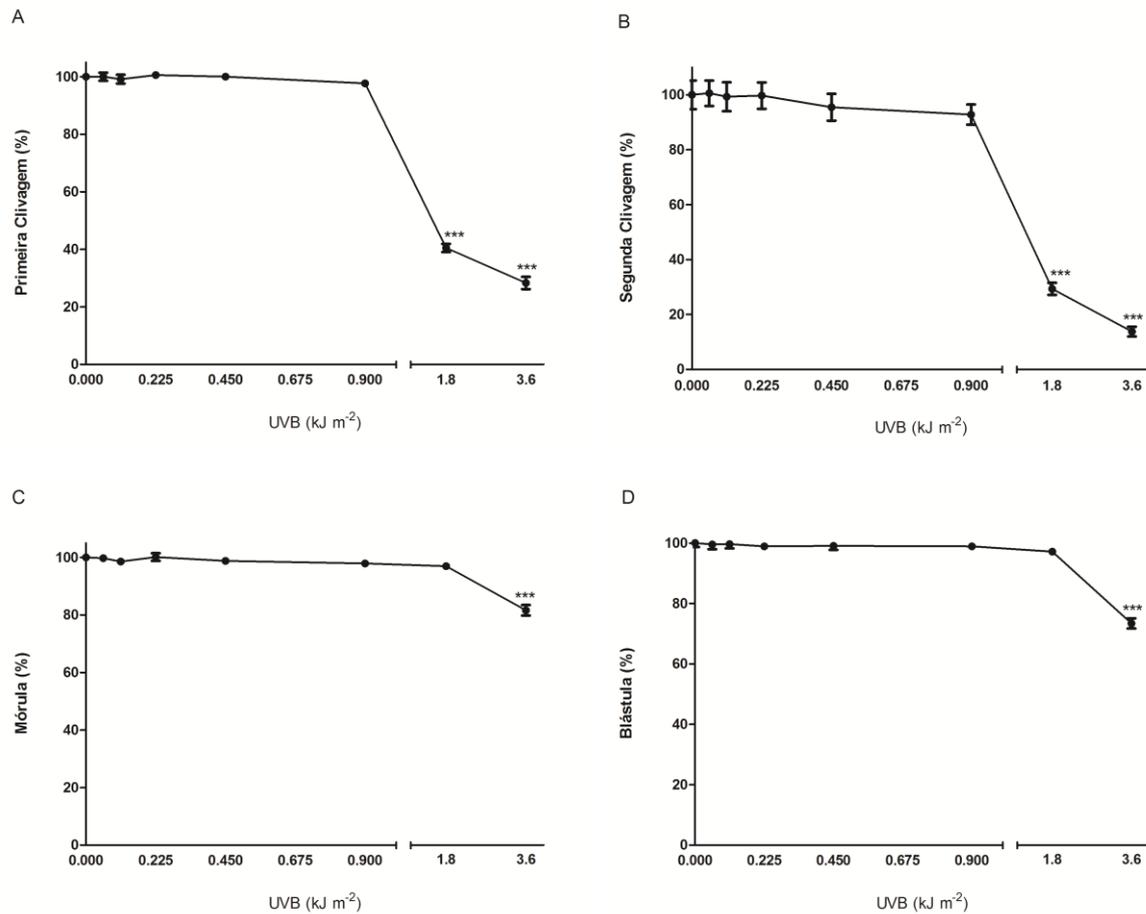


Gráfico 10: Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de espermatozoides na presença de luz branca. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. *** P < 0,001 comparado com o grupo controle (teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey).

Para melhor comparar os diferentes graus de sensibilidade à UVB em espermatozoides expostos, foi calculada a DE_{50} para todos os estágios analisados, na presença ou ausência de luz branca. Os valores obtidos foram apresentados na forma de média e intervalo de confiança 95% (tabela 2).

Tabela 2: Valores da DE_{50} para o efeito inibitório da UVB sobre o desenvolvimento embrionário derivado de espermatozoides irradiados na presença ou ausência de luz branca.

DE_{50} – Média (Intervalo de confiança 95%) kJ m^{-2}		
	Ausência de luz branca	Presença de luz branca
1ª Clivagem	0,153 \pm 0,07	1,515 \pm 0,14
2ª Clivagem	0,056 \pm 0,12	1,444 \pm 0,30
Mórula	0,564 \pm 0,26	> 3,6
Blástula	0,925 \pm 0,23	> 3,6

No estágio de primeira clivagem, os valores da DE_{50} referente ao tratamento na presença de luz branca foram cerca de 10 vezes mais elevados em comparação com o tratamento na ausência de luz branca. No estágio de segunda clivagem essa diferença foi ainda mais acentuada, cerca de 25 vezes. A DE_{50} para os estágios de mórula e blástula referentes ao tratamento na presença de luz branca não pôde ser calculada, uma vez que todas as doses analisadas apresentaram um percentual de inibição superior a 50%.

4.10 Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de óvulos na presença de luz branca

A progressão para o estágio de primeira clivagem foi atrasada em doses superiores a $3,6 \text{ kJ m}^{-2}$. Os percentuais de inibição obtidos nesses tratamentos foram de $11,7 \pm 0,8\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), $30,7 \pm 4,9\%$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$) e $71,6 \pm 4,6\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 11A). Resultados semelhantes foram obtidos na progressão para o estágio de segunda clivagem (gráfico 11B).

A progressão para o estágio de mórula foi menos sensível à exposição dos óvulos à UVB, na presença de luz branca. O desenvolvimento para esse estágio foi atrasado apenas na dose mais elevada, obtendo um percentual de inibição de $15,9 \pm 2,3\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 11C). Já a progressão para o estágio de blástula não foi afetada por nenhuma dose analisada (gráfico 11D).

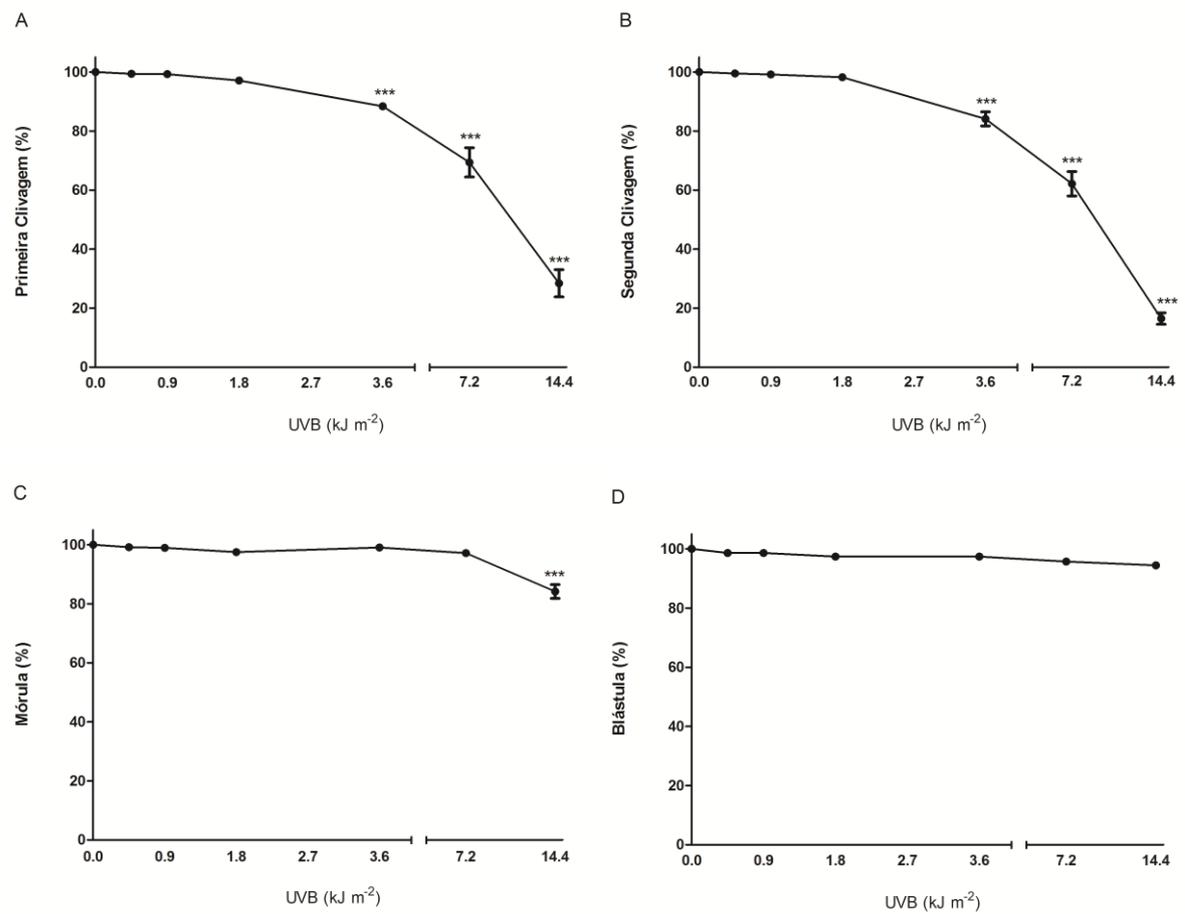


Gráfico 11: Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de óvulos na presença de luz branca. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. *** $P < 0,001$ comparado com o grupo controle (teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey).

Os valores da DE_{50} para o efeito inibitório da UVB sobre o desenvolvimento embrionário derivado de óvulos irradiados na presença de luz branca comparado com a irradiação na ausência de luz branca são mostrados na tabela 3. Os valores obtidos são apresentados na forma de média e intervalo de confiança 95%.

Tabela 3: Valores da DE_{50} para o efeito inibitório da UVB sobre o desenvolvimento embrionário derivado de óvulos irradiados na presença ou ausência de luz branca.

DE_{50} – Média (Intervalo de confiança 95%) kJ m^{-2}		
	Ausência de luz branca	Presença de luz branca
1ª Clivagem	0,980 \pm 0,55	7,886 \pm 0,39
2ª Clivagem	0,277 \pm 0,58	7,611 \pm 0,48
Mórula	3,240 \pm 0,34	> 14,4
Blástula	4,750 \pm 0,36	> 14,4

No estágio de primeira clivagem, os valores da DE_{50} referente ao tratamento na presença de luz branca foram cerca de 8 vezes mais elevados em comparação com o tratamento na ausência de luz branca. No estágio de segunda clivagem essa diferença foi ainda mais acentuada, cerca de 27 vezes. A DE_{50} para os estágios de mórula e blástula referentes ao tratamento na presença de luz branca não pôde ser calculada, uma vez que todas as doses analisadas apresentaram um percentual de inibição superior a 50%.

4.11 Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de zigotos (10 minutos após a fertilização) na presença de luz branca

A progressão para o estágio de primeira clivagem foi atrasada apenas nas duas doses mais elevadas. Os percentuais de inibição obtidos foram de $43,9 \pm 0,8\%$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$) e $100,0 \pm 0,0\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 12A). Resultados semelhantes foram obtidos na progressão para o estágio de segunda clivagem (gráfico 12B).

A progressão para o estágio de mórula foi menos sensível à exposição dos óvulos à UVB, na presença de luz branca. O desenvolvimento para esse estágio foi atrasado apenas na dose de $14,4 \text{ kJ m}^{-2}$ cujo percentual de inibição foi de $12,4 \pm 0,9\%$ (gráfico 12C). Resultados semelhantes foram obtidos na progressão para o estágio de blástula (gráfico 12D).

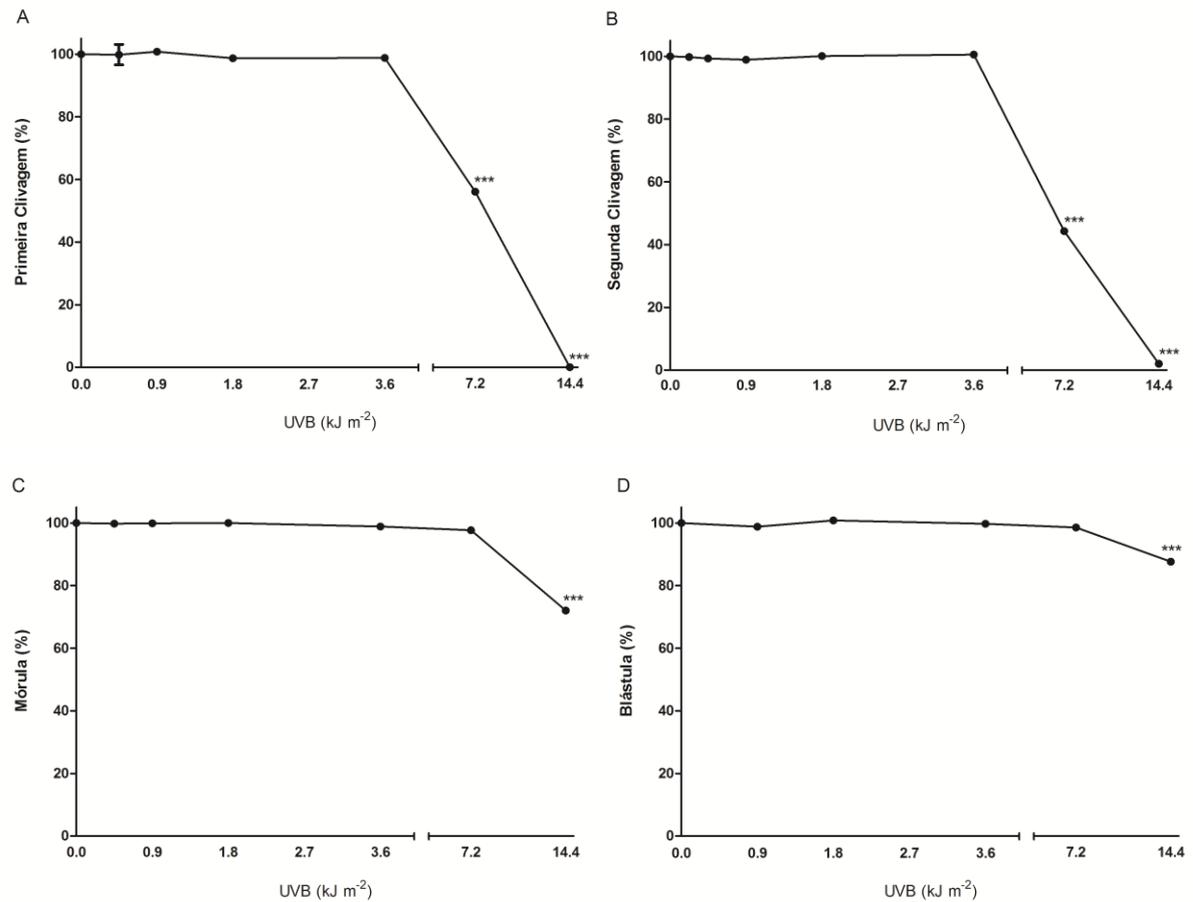


Gráfico 12: Efeito da UVB sobre os estágios de primeira clivagem (A), segunda clivagem (B), mórula (C) e blástula (D): exposição de zigotos (10 minutos após a fertilização) na presença de luz branca. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo controle foi considerado 100%. *** $P < 0,001$ comparado com o grupo controle (teste de ANOVA seguido do pós-teste de Tukey).

Os valores da DE_{50} para o efeito inibitório da UVB sobre o desenvolvimento embrionário derivado de zigotos irradiados na presença de luz branca comparado com a irradiação na ausência de luz branca são mostrados na tabela 4. Os valores obtidos são apresentados na forma de média e intervalo de confiança 95%.

Tabela 4: Valores da DE_{50} para o efeito inibitório da UVB sobre o desenvolvimento embrionário derivado de zigotos irradiados na presença ou ausência de luz branca.

DE_{50} – Média (Intervalo de confiança 95%) kJ m^{-2}		
	Ausência de luz branca	Presença de luz branca
1ª Clivagem	1,691 \pm 0,69	7,418 \pm 0,14
2ª Clivagem	0,876 \pm 0,45	7,082 \pm 0,24
Mórula	4,898 \pm 0,38	> 14,4
Blástula	7,874 \pm 0,10	> 14,4

No estágio de primeira clivagem, os valores da DE_{50} referente ao tratamento na presença de luz branca foram cerca de 4 vezes mais elevados em comparação com o tratamento na ausência de luz branca. No estágio de segunda clivagem essa diferença foi cerca de 8 vezes. A DE_{50} para os estágios de mórula e blástula referentes ao tratamento na presença de luz branca não pôde ser calculada, uma vez que todas as doses analisadas apresentaram um percentual de inibição superior a 50%.

4.12 Efeito da UVB sobre o desenvolvimento larval: exposição de espermatozoides, óvulos, zigotos e embriões no estágio de prisma

Em seguida, fomos investigar se os danos no desenvolvimento embrionário inicial, induzidos pela exposição de gametas e zigotos à UVB, persistiam até o desenvolvimento da larva plúteos.

O desenvolvimento larval foi afetado quando o zigoto foi obtido a partir de espermatozoides irradiados com UVB. Quando os gametas masculinos foram submetidos a uma dose de $1,8 \text{ kJ m}^{-2}$, a larva plúteos apresentou severas deformações, como por exemplo mal formação das espículas e do trato gastrointestinal, em comparação com as larvas controle. No entanto, quando os espermatozoides foram submetidos à dose de $3,6 \text{ kJ m}^{-2}$, o desenvolvimento embrionário foi interrompido durante a gastrulação e a larva plúteos não foi formada.

O desenvolvimento larval derivado de óvulos ou zigotos irradiados não foi sensível à UVB. Nesses tratamentos as larvas plúteos apresentaram o mesmo aspecto morfológico e fisiológico das larvas controle.

Adicionalmente, investigamos o efeito da irradiação de embriões no estágio de prisma sobre o desenvolvimento larval. Nesse tratamento, a formação da larva plúteo também não foi prejudicada (figura 30).

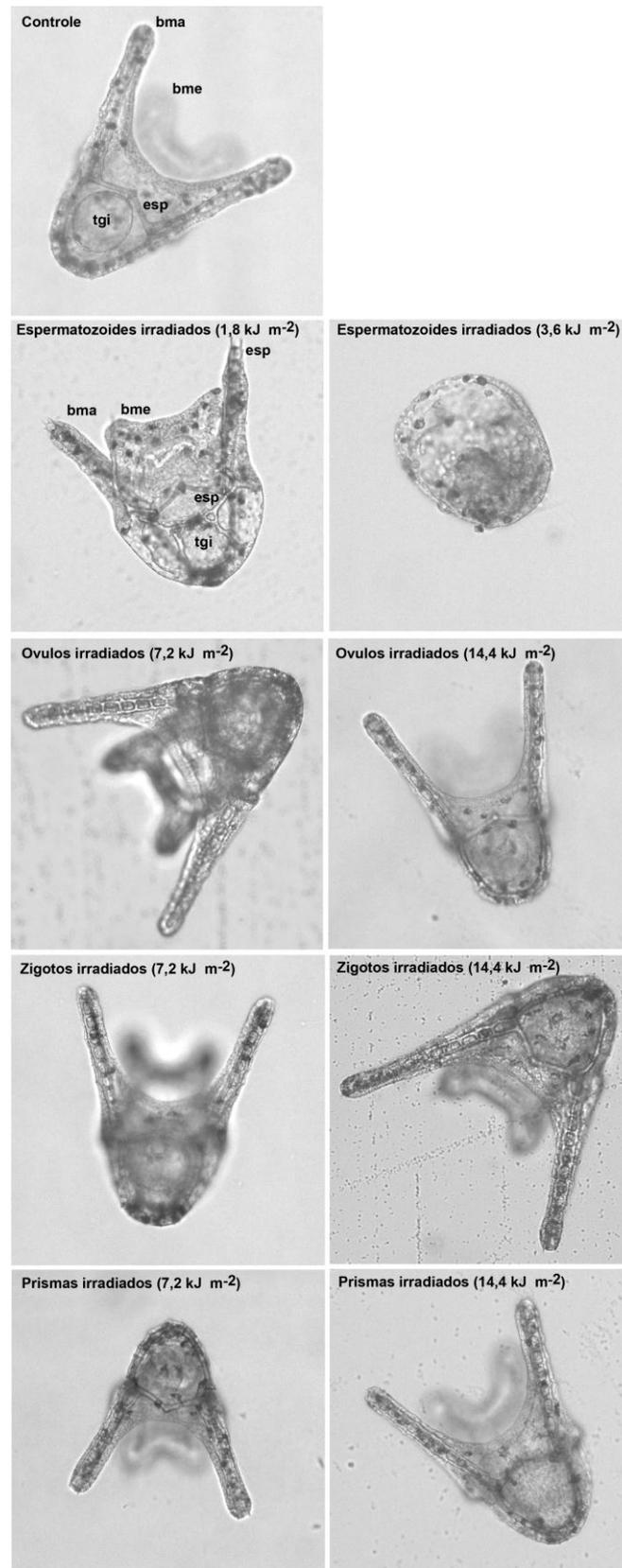


Figura 30: Fotomicrografias de larvas plúteos derivadas de gametas, zigotos, ou embriões no estágio de prisma, expostos à UVB. bma: braços maiores; bme: braços menores; tgi: trato gastrointestinal; esp: espículas.

4.13 Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de espermatozoides

Os bloqueadores de transportadores ABC, REV205 (10 μ M – bloqueador do transportador ABCB1) ou MK571 (10 μ M – bloqueador do transportador ABCC1), não inibiram *per si* o desenvolvimento embrionário nos estágios monitorados. O tratamento com essas substâncias antes ou após (10 ou 40 minutos) a fertilização não alterou a progressão para a primeira clivagem, segunda clivagem ou para o estágio de mórula, em comparação com o grupo controle (gráfico 13A-C).

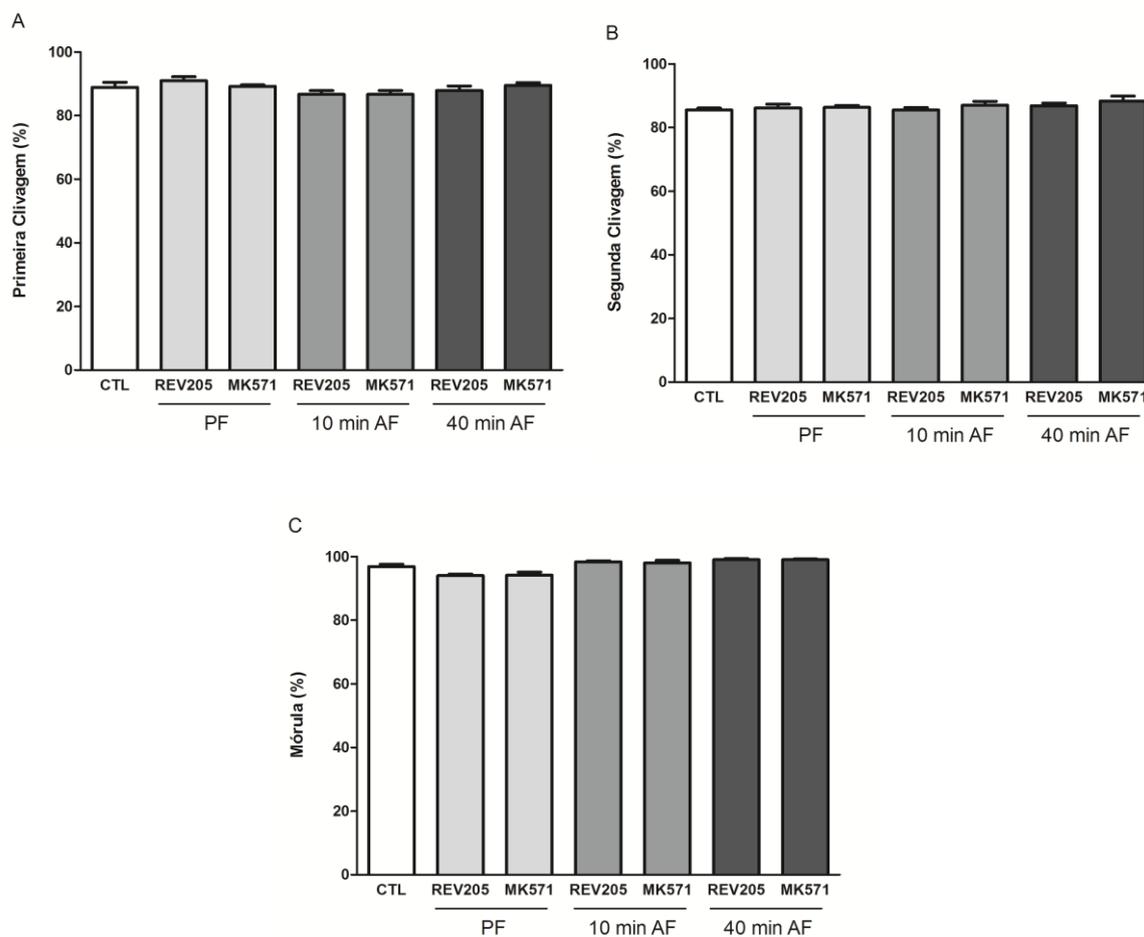


Gráfico 13: Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC *per si* sobre o desenvolvimento embrionário. O percentual de embriões que atingiram a primeira clivagem (A), a segunda clivagem (B) e o estágio de mórula (C) são mostrados. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. PF: pré-fertilização; 10 min AF: 10 minutos após a fertilização; 40 min AF: 40 minutos após a fertilização.

O tratamento dos espermatozoides com REV205 ou MK571 e a posterior irradiação com UVA diminuiu o percentual do desenvolvimento embrionário. A REV205 inibiu a progressão para o estágio de primeira clivagem em $26,1 \pm 7,5\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), $32,1 \pm 7,6\%$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$) e $53,3 \pm 7,5\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$), comparado com o grupo irradiado e não tratado com o bloqueador. O tratamento com MK571 reduziu acentuadamente o percentual de embriões em primeira clivagem em $62,9 \pm 6,7\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), $83,2 \pm 3,7\%$ ($7,2 \text{ kJ m}^{-2}$) e $100,0 \pm 0,3\%$ ($14,4 \text{ kJ m}^{-2}$). Resultados similares foram obtidos na progressão para o estágio de segunda clivagem (gráficos 14A-B).

O tratamento dos espermatozoides com os bloqueadores de transportadores ABC, e a posterior irradiação com UVB não alterou o efeito inibitório da UVB sobre o desenvolvimento embrionário. A incubação dos espermatozoides com REV205 ou MK571 induziu, em todas as doses e estágios analisados, o mesmo padrão inibitório observado no grupo irradiado e não tratado (gráficos 14C-D).

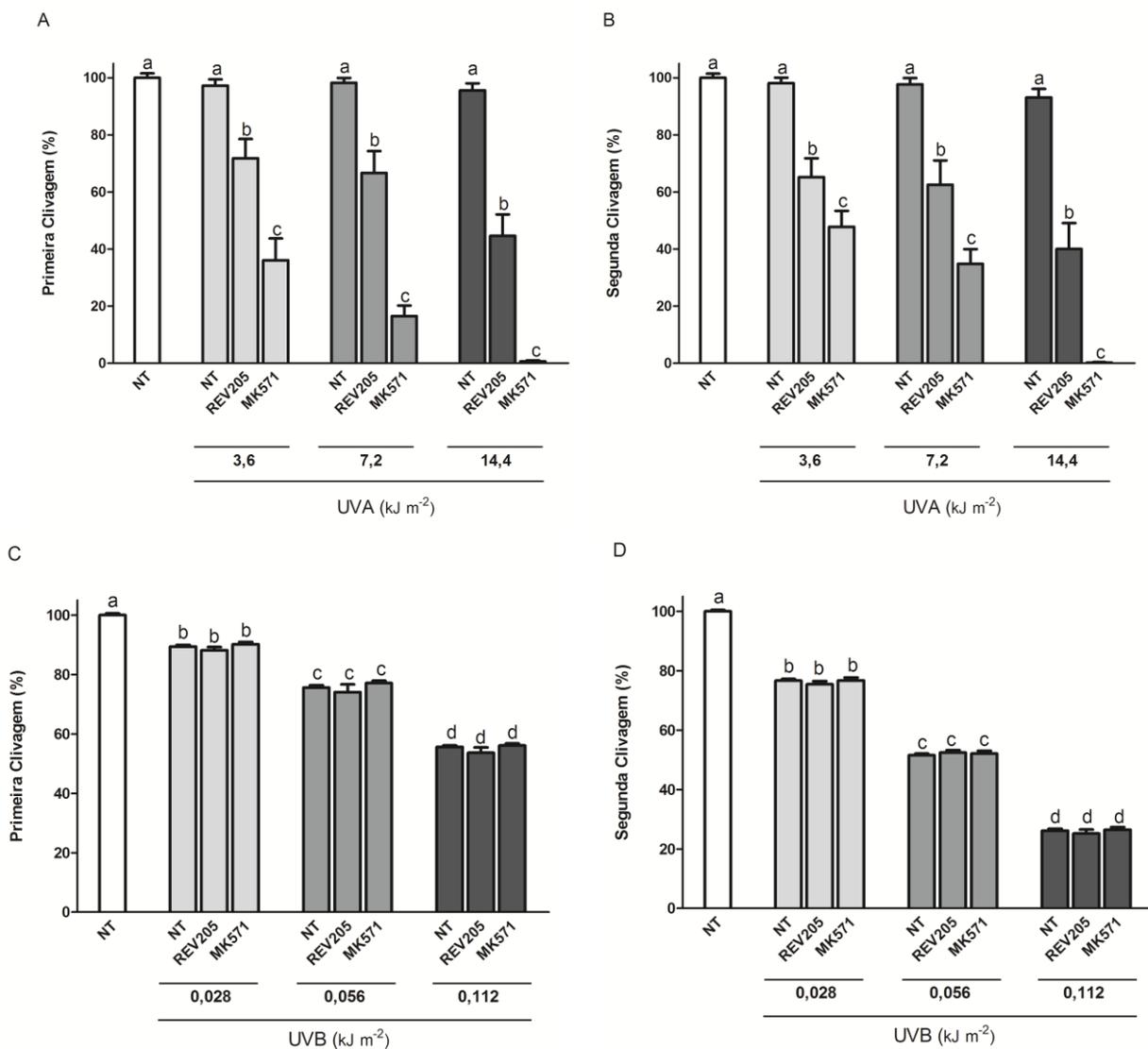


Gráfico 14: Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o estágio de primeira clivagem e o estágio de segunda clivagem: tratamento e exposição de espermatozoides à UVA (A-B) ou à UVB (C-D). Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo não irradiado e não tratado foi considerado 100%. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$). NT: não tratado.

4.14 Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de óvulos

O tratamento dos óvulos com os bloqueadores de proteínas ABC e a posterior irradiação com UVA não reverteu a resistência a essa radiação. O tratamento com REV205 ou MK571 induziu o mesmo percentual de primeira e segunda clivagem, comparado com o grupo irradiado e não tratado com os bloqueadores (gráficos 15A-B).

Em contraste, a exposição dos óvulos à UVB, na presença do bloqueador do transportadores ABCC1, aumentou o efeito inibitório da UVB na progressão para a primeira e a segunda clivagem. Enquanto que o bloqueador de ABCB1, REV205, não alterou o efeito da UVB sobre a primeira divisão celular, o tratamento com o MK57 aumentou o efeito inibitório da exposição à UVB sobre a primeira clivagem em $35,9 \pm 5,8\%$ ($0,112 \text{ kJ m}^{-2}$), $42,7 \pm 4,3\%$ ($0,45 \text{ kJ m}^{-2}$) e $55,1 \pm 0,6\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), comparado com o grupo irradiado e não tratado com os bloqueadores (gráfico 15C).

A REV205 aumentou o efeito inibitório da UVB na progressão para a segunda clivagem na dose mais baixa ($19,7 \pm 4,7\%$ de inibição comparado com o grupo irradiado e não tratado). O tratamento com MK571 e a posterior irradiação com UVB reduziu o percentual de segunda clivagem em $34,8 \pm 5,0\%$ ($0,112 \text{ kJ m}^{-2}$), $35,2 \pm 4,8\%$ ($0,45 \text{ kJ m}^{-2}$) e $59,4 \pm 1,1\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$), comparado com o grupo irradiado e não tratado com os bloqueadores (gráfico 15D).

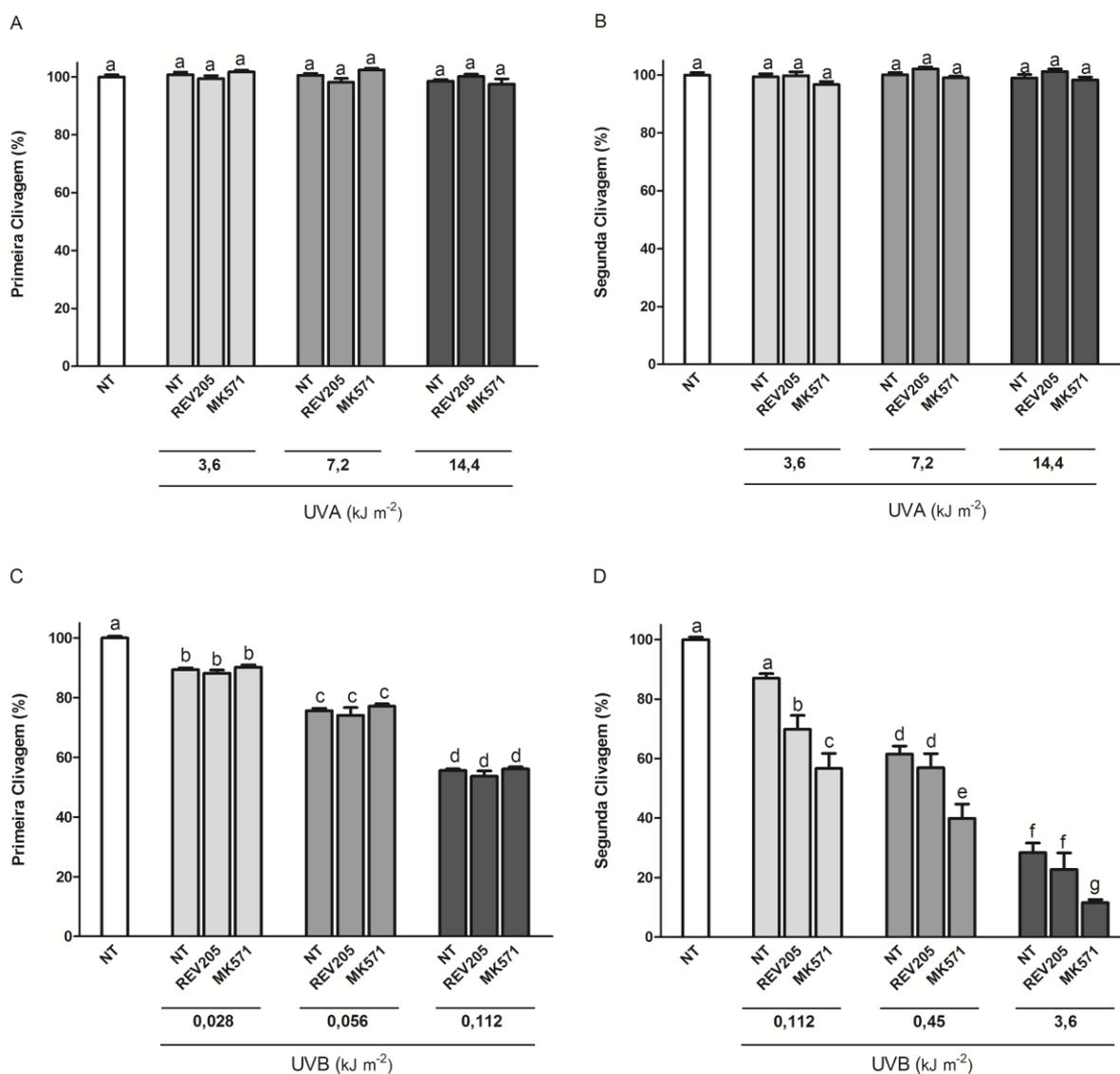


Gráfico 15: Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o estágio de primeira clivagem e o estágio de segunda clivagem: tratamento e exposição de óvulos à UVA (A-B) ou à UVB (C-D). Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo não tratado e não irradiado foi considerado 100%. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$). NT: não tratado.

4.15 Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de zigotos (10 minutos após a fertilização)

O tratamento dos zigotos (10 minutos após a fertilização) com os bloqueadores de proteínas ABC e a posterior irradiação com UVA não induziu efeitos inibitórios sobre o desenvolvimento embrionário. O tratamento dos zigotos com REV205 ou MK571 exibiu o mesmo percentual de progressão para a primeira e segunda clivagem comparado com o grupo irradiado e não tratado com os bloqueadores (gráfico 16A-B).

De modo contrário, a irradiação dos zigotos com UVB ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$), na presença de REV205, atrasou a progressão para a primeira clivagem. No entanto, na presença de MK571, o percentual de primeira divisão celular foi o mesmo comparado com o grupo irradiado e não tratado com os bloqueadores (gráfico 16C). Resultados similares foram observados na progressão para a segunda clivagem. O tratamento com o bloqueador da proteína ABCB1, REV205, inibiu a segunda divisão celular quando os zigotos foram expostos à $0,45$, $0,9$ e $1,8 \text{ kJ m}^{-2}$ ($31,6 \pm 2,7\%$, $70,3 \pm 0,7\%$ e $100,0 \pm 0,0\%$ de inibição, respectivamente, comparado ao grupo irradiado e não tratado com REV205). O tratamento com MK571 não alterou o perfil inibitório induzido pela UVB sobre a segunda clivagem (gráfico 16D).

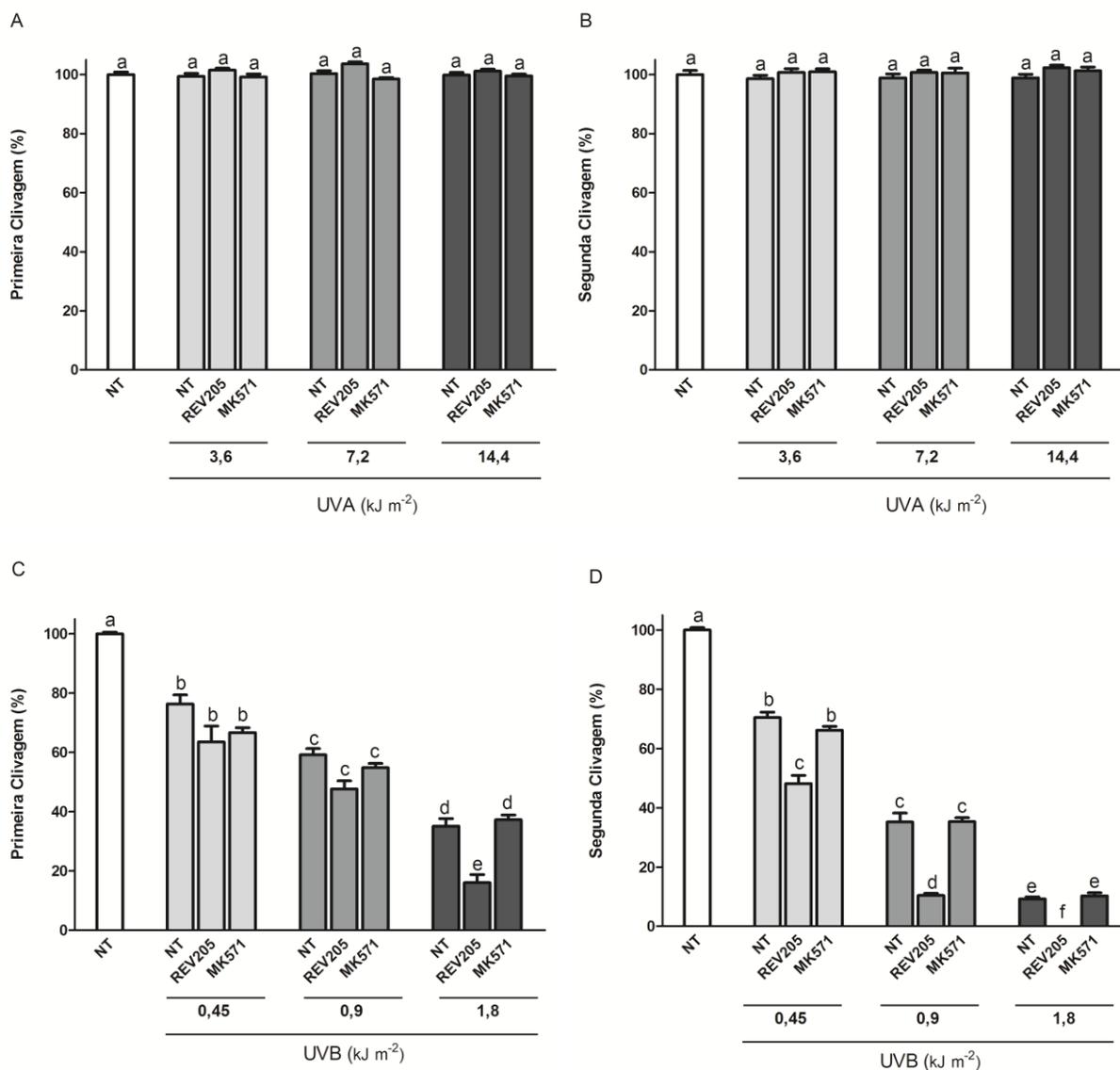


Gráfico 16: Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o estágio de primeira clivagem e o estágio de segunda clivagem: tratamento e exposição de zigotos (10 minutos após a fertilização) à UVA (A-B) ou à UVB (C-D). Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo não tratado e não irradiado foi considerado 100%. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$). NT: não tratado.

4.16 Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de zigotos (40 minutos após a fertilização)

Os transportadores ABC presentes em zigotos de ouriços-do-mar estão completamente ativos em aproximadamente 20 minutos após a fertilização (HAMDOUN, A. M. et al., 2004; DE SOUZA et al., 2010). Portanto, decidimos investigar se o grau de atividade dos transportadores ABC afeta a sensibilidade dos embriões à UVB. Para tanto, os zigotos foram irradiados, com UVB, 40 minutos após a fertilização, quando os transportadores ABC estão completamente ativos.

O desenvolvimento embrionário foi mais resistente à UVB quando os zigotos foram irradiados 40 minutos após a fertilização, em comparação com a irradiação 10 minutos após a fertilização. O percentual de zigotos que completaram a primeira divisão celular, quando irradiados 10 minutos após a fertilização, foi de $77,2 \pm 1,7\%$ ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$), $44,9 \pm 0,3\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$) e $0,3 \pm 0,3\%$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$). Por outro lado, a UVB não bloqueou a progressão para o estágio de primeira clivagem quando os zigotos foram irradiados 40 minutos após a fertilização, uma vez que o percentual de desenvolvimento obtido foi semelhante ao grupo não irradiado (gráfico 17).

Na progressão para o estágio de segunda clivagem e para o estágio de mórula foi observado o mesmo padrão inibitório em ambos os tratamentos (irradiação em 10 ou 40 minutos após a fertilização). Nenhum efeito inibitório foi observado na progressão para o estágio de blástula (dados não mostrados).

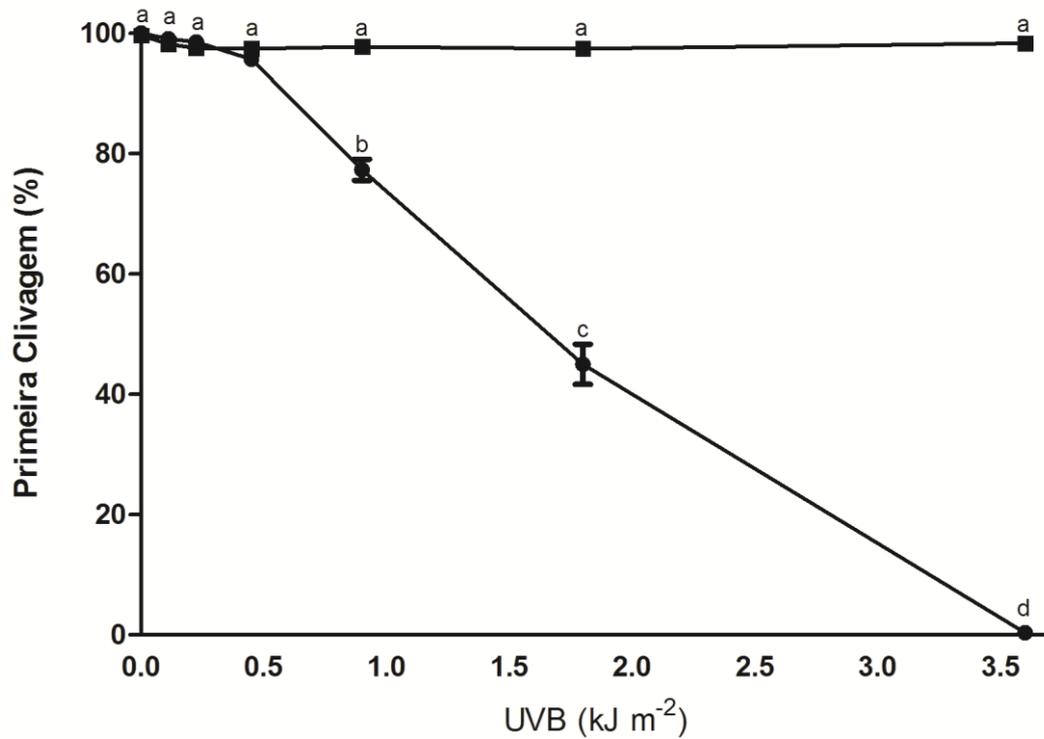


Gráfico 17: Efeito da UVB sobre o desenvolvimento embrionário inicial: exposição de zigotos (40 minutos após a fertilização) à UVB. (●) irradiação 10 minutos após a fertilização; (■) irradiação 40 minutos após a fertilização. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.17 Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de zigotos (40 minutos após a fertilização)

Para confirmar se a resistência dos zigotos à UVB, quando os mesmos foram irradiados 40 minutos após a fertilização, estava associada com a completa ativação dos transportadores ABC, os zigotos foram irradiados, no tempo supracitado, na presença de bloqueadores de transportadores ABC.

O tratamento dos zigotos com REV205 ou MK571 bloqueou parcialmente a progressão para a primeira clivagem comparado ao grupo irradiado e não tratado com os bloqueadores. A REV205, e a posterior exposição à UVB, induziram um aumento de $14,5 \pm 3,1\%$ ($0,45 \text{ kJ m}^{-2}$), $25,3 \pm 4,6\%$ ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$) e $16,4 \pm 3,1\%$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$) no percentual de inibição em relação ao grupo irradiado e não tratado com REV205. O tratamento com MK571, e a subsequente exposição à UVB, também inibiram a primeira divisão celular em $12,1 \pm 3,1\%$ ($0,45 \text{ kJ m}^{-2}$), $20,8 \pm 4,4\%$ ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$) (gráfico 17A).

Resultados similares foram observados na progressão para a segunda clivagem. REV205 ou MK571 inibiram a segunda divisão celular quando os zigotos foram expostos à $0,45 \text{ kJ m}^{-2}$ ($18,1 \pm 3,2\%$ e $13,2 \pm 2,4\%$ de inibição, respectivamente) (gráfico 17B).

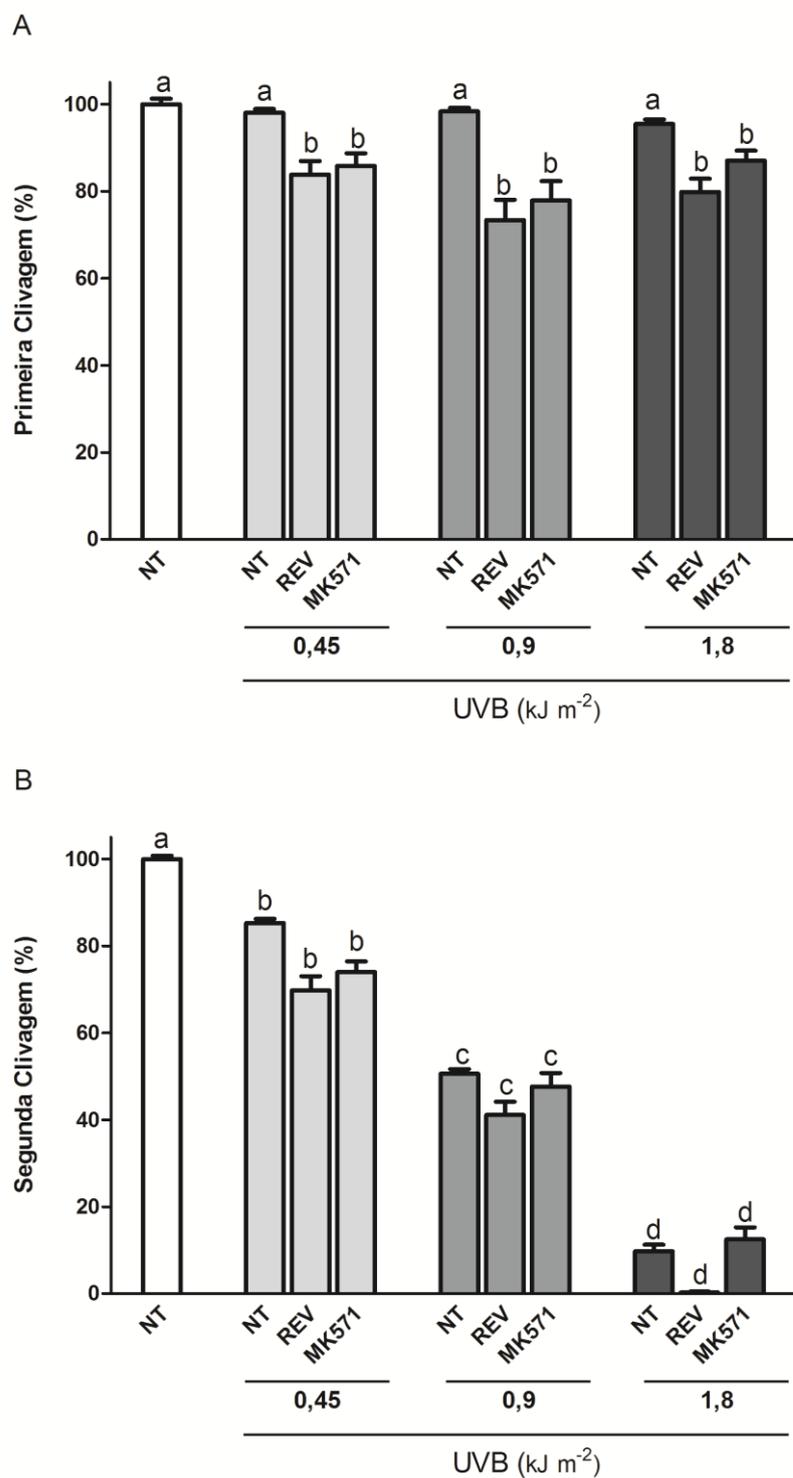


Gráfico 18: Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o estágio de primeira clivagem (A) e no estágio de segunda clivagem (B): tratamento e exposição de zigotos (40 minutos após a fertilização). Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. O percentual de desenvolvimento do grupo não tratado e não irradiado foi considerado 100%. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.18 Efeito dos bloqueadores de transportadores ABC sobre o desenvolvimento embrionário: tratamento e exposição de gametas, zigotos e embriões no estágio de prisma

Fomos investigar se os danos no desenvolvimento embrionário inicial, induzidos pelo tratamento de gametas e zigotos com bloqueadores de proteínas ABC e a posterior exposição à UVB, persistiam até o desenvolvimento da larva plúteos. O tratamento com REV205 ou MK571 *per si* não inibiu o desenvolvimento larval e não provocou alterações morfológicas na larva plúteos, comparado com o grupo não tratado com os bloqueadores.

O desenvolvimento larval foi prejudicado quando os espermatozoides foram tratados com REV205 ou MK571 e posteriormente irradiados com uma dose sub-letal de UVB. Quando os gametas masculinos foram submetidos a uma dose de 0,45 kJ m⁻², a larva plúteos desenvolveu de forma normal, comparada com as larvas derivadas de espermatozoides não irradiados. No entanto, quando os espermatozoides foram tratados com REV205 ou MK571, e submetidos a mesma dose de UVB, o desenvolvimento embrionário foi interrompido durante o estágio de prisma.

Resultados semelhantes foram obtidos quando os óvulos foram tratados com os bloqueadores dos transportadores ABC e irradiados com uma dose sub-letal de UVB. As larvas plúteos derivadas de óvulos submetidos a uma dose de 14,4 kJ m⁻² desenvolveram-se de forma normal e semelhante ao grupo não irradiado. O tratamento dos óvulos com REV205, e a posterior irradiação, induziu um atraso no desenvolvimento larval e comprometeu a formação dos braços maiores e menores da larva plúteos. O tratamento com MK571, e a posterior irradiação com UVB, além de provocar um atraso no desenvolvimento larval e interrupção no estágio de prisma, induziu, também, a má formação nas espículas.

O desenvolvimento larval derivado de zigotos tratados com REV205 ou MK571 e posteriormente irradiados com a dose sub-letal de 14,4 kJ m⁻² não foi alterado. Nesses tratamentos as larvas plúteos se encontravam com o mesmo aspecto morfológico e fisiológico das larvas controle. Adicionalmente, investigamos também o efeito do tratamento de embriões no estágio de prisma com os bloqueadores de transportadores ABC e a posterior irradiação na dose sub-letal de

14,4 kJ m⁻². Nesses tratamentos, a formação da larva plúteo também não foi prejudicada (figura 31).

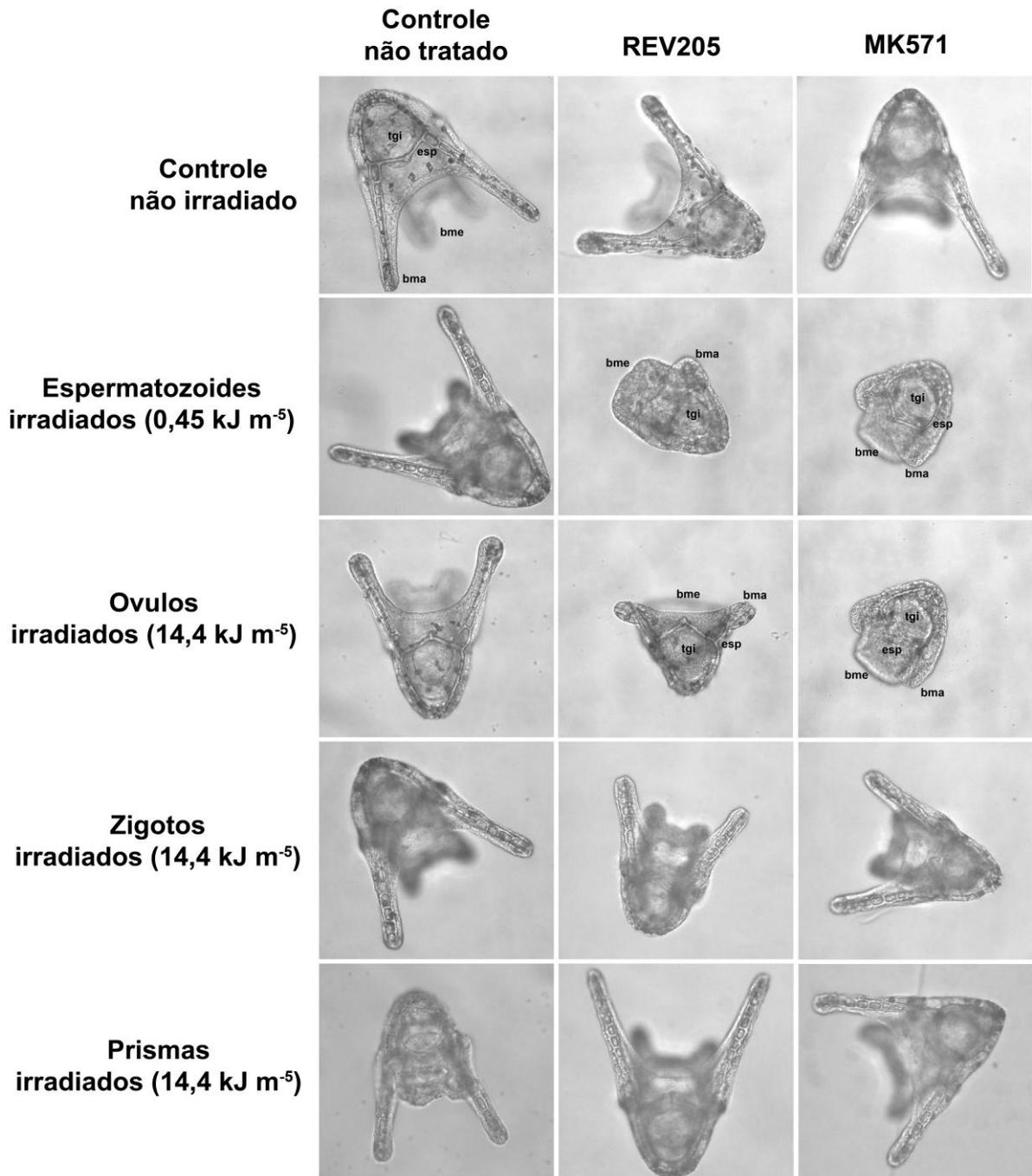


Figura 31: Fotomicrografias de larvas plúteos derivadas de gametas, zigotos e embriões no estágio de prisma, tratados com bloqueadores de proteína ABC e posteriormente expostos à UVB. bma: braços maiores; bme: braços menores; tgi: trato gastro-intestinal; esp: espículas.

4.19 Efeito da UVB sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio de acúmulo intracelular de C-AM

O efeito da irradiação com UVB sobre a atividade dos transportadores ABC foi investigada por meio do ensaio do acúmulo de C-AM, o qual é amplamente utilizado para avaliar a atividade de proteínas ABC em vários modelos biológicos (HAMDOUN, A. et al., 2004; DE SOUZA et al., 2010; FARIA et al., 2011; FISCHER et al., 2013; SINGH; PRASAD; KAPOOR; et al., 2014).

A irradiação dos óvulos com UVB não aumentou a concentração intracelular de calceína fluorescente no intervalo de 60 minutos após a fertilização. A IMF nas diferentes doses foi de $50,8 \pm 4,3$ ($0,112 \text{ kJ m}^{-2}$); $48,7 \pm 7,6$ ($0,45 \text{ kJ m}^{-2}$); e $51,9 \pm 2,3$ ($3,6 \text{ kJ m}^{-2}$) comparados com o grupo não irradiado, cuja IMF foi de $44,7 \pm 2,1$. O bloqueador da proteína ABCB1, VP (controle positivo, $10 \mu\text{M}$), aumentou a IMF para $88,1 \pm 4,6$, o que corresponde a aproximadamente duas vezes a IMF do grupo não irradiado (gráfico 20A). De modo semelhante, a IMF obtida quando os embriões foram expostos à UVB foi de $20,3 \pm 0,6$ ($0,45 \text{ kJ m}^{-2}$); $21,4 \pm 0,6$ ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$); e $20,9 \pm 1,8$ ($1,8 \text{ kJ m}^{-2}$) comparado com o grupo não irradiado ($23,3 \pm 0,6$). O VP aumentou a IMF para $64,4 \pm 5,0$ (gráfico 20B). As fotomicrografias fluorescentes representativas deste ensaio são mostradas na figura 32.

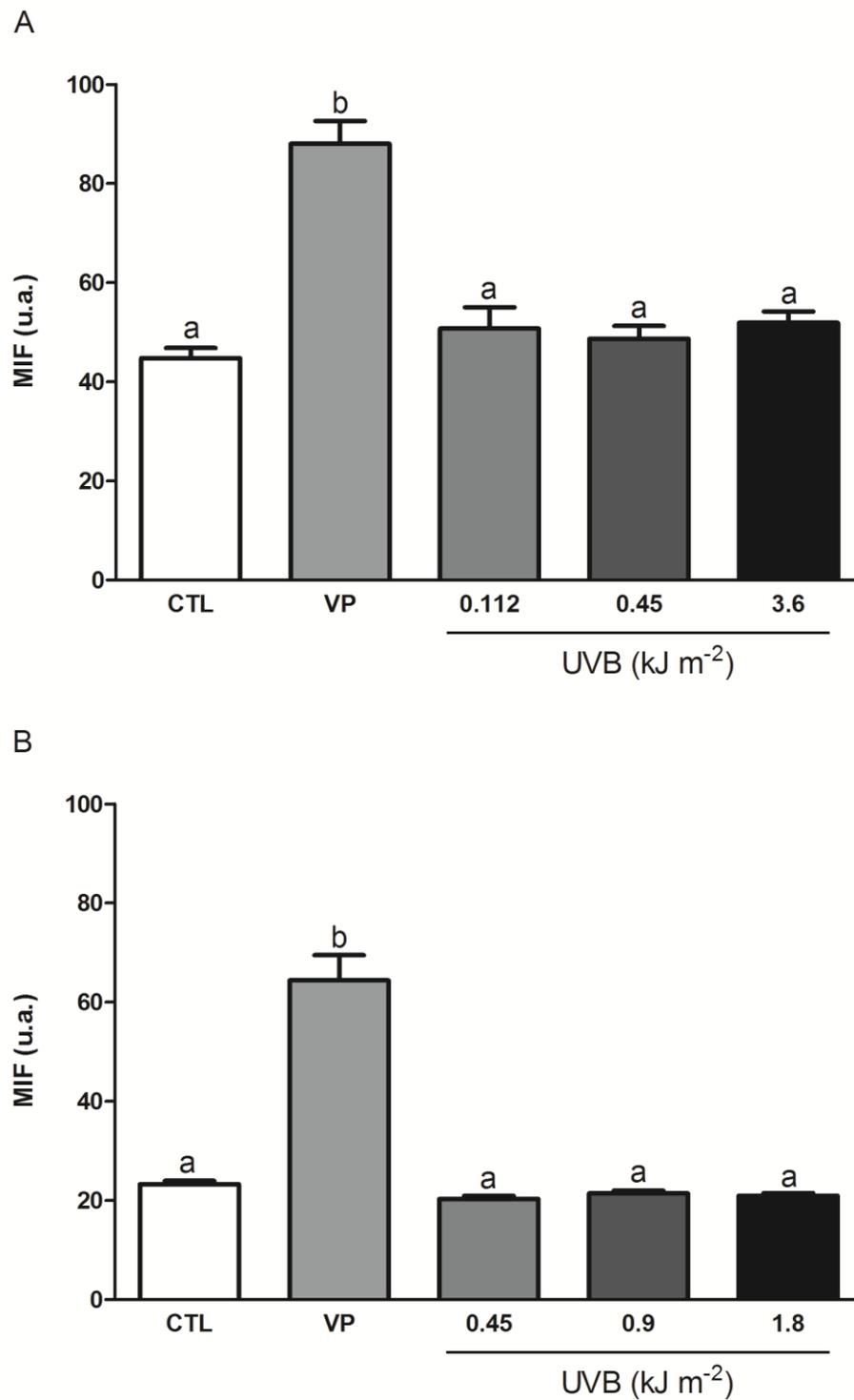


Gráfico 19: Efeito da exposição à UVB sobre a atividade de transportadores ABC - Ensaio de acúmulo da C-AM. Os óvulos (A) ou os embriões (B) foram submetidos a diferentes doses de UVB e a atividade dos transportadores ABC foi avaliada pelo acúmulo intracelular de calceína. Os dados são expressos como intensidade média de fluorescência (IMF) \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$). u.a.: unidades arbitrárias de fluorescência.

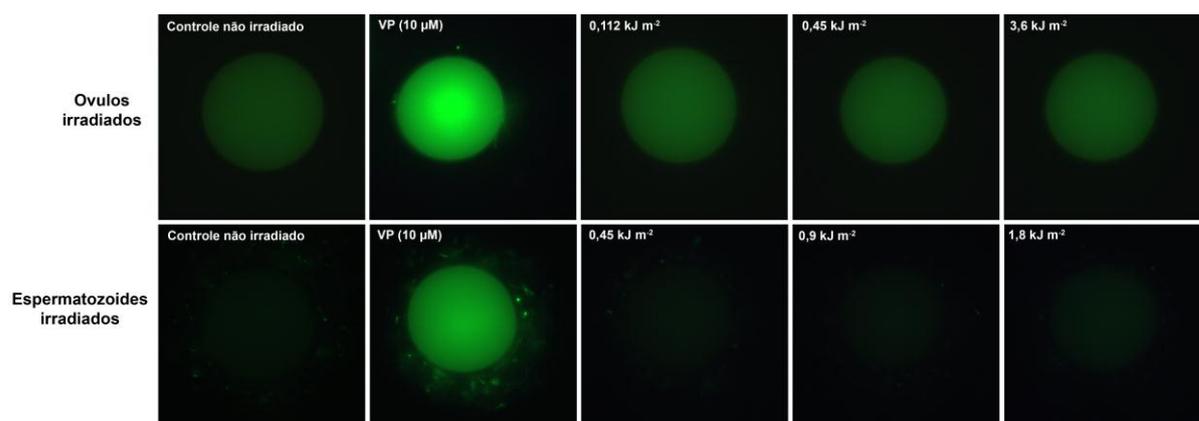


Figura 32: Fotomicrografias de embriões derivados de óvulos ou embriões expostos à UVB e incubados com C-AM.

4.20 Efeito da UVB sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio da resistência à vimblastina

Adicionalmente, foi investigado o efeito da UVB na resistência, mediada por transportadores ABC, de óvulos e embriões à VL, um fármaco com propriedades anti-mitóticas que se liga à tubulina e inibe a polimerização de microtúbulos (UEDA et al., 1987). Esse ensaio é amplamente empregado na avaliação da atividade de proteínas ABC em diversos modelos experimentais (STEPHENS et al., 2001; DE SOUZA et al., 2010; OSMAN-PONCHET et al., 2014).

Os óvulos ou embriões foram previamente irradiados com uma dose sub-letal de UVB e em seguida tratados com VL (100 ou 400 nM). A menor concentração de VL não apresentou efeito inibitório sobre a primeira clivagem. Em contraste, a primeira divisão celular foi drasticamente bloqueada quando os óvulos (gráfico 20A) ou embriões (gráfico 20B) foram tratados com 400 nM de VL. O tratamento simultâneo de VL, em ambas as concentrações, e VP (controle positivo, 10 μ M) bloqueou eficazmente a progressão para o estágio de primeira clivagem. Resultados similares foram obtidos na progressão para o estágio de segunda clivagem. Entretanto, a exposição de óvulos ou de embriões à UVB não reverteu a resistência à VL (100 nM ou 400 nM), uma vez que o percentual de primeira e de segunda clivagem obtidos nesses tratamentos foram semelhantes aos obtidos no grupo não irradiado e tratado com VL.

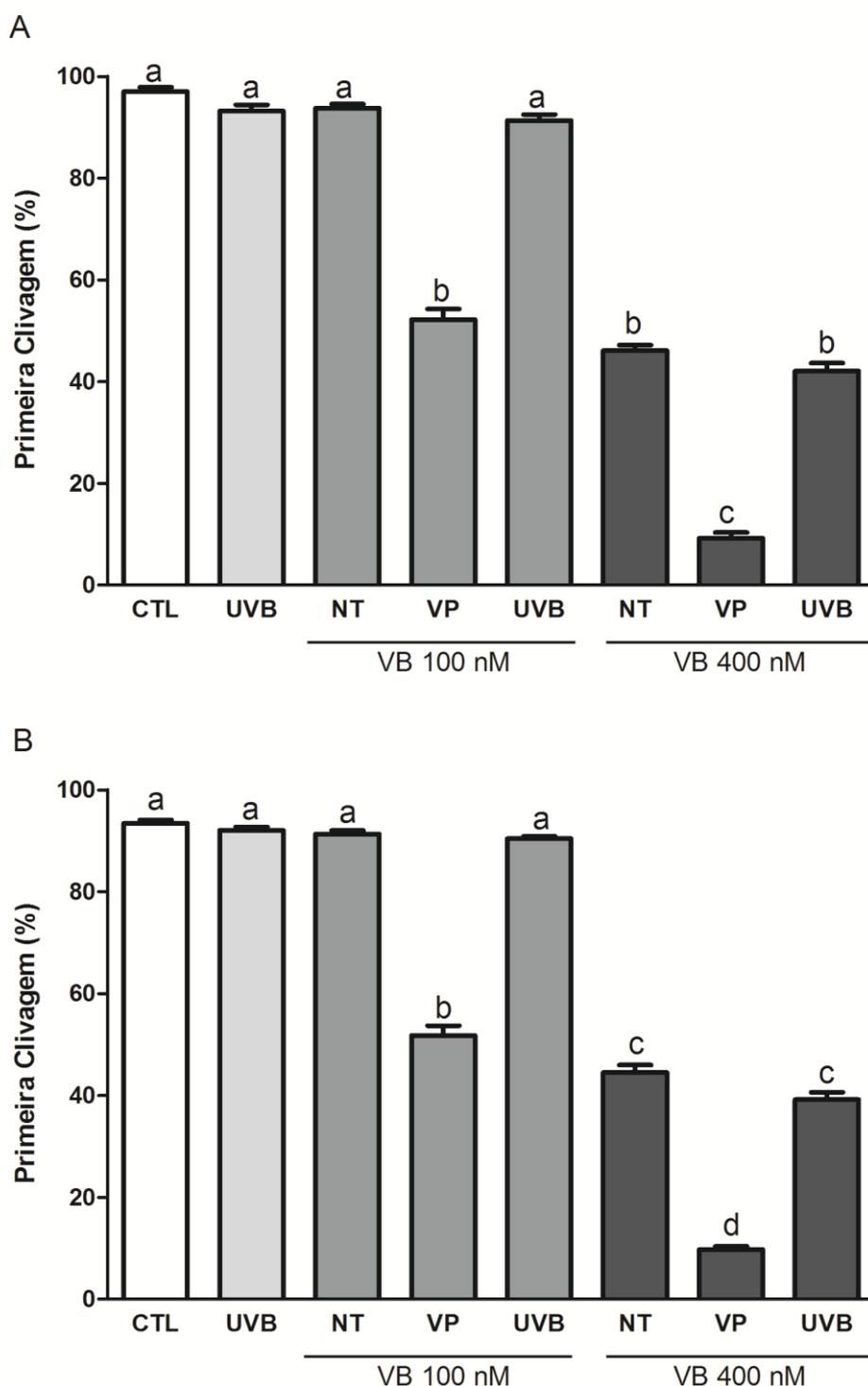


Gráfico 20: Efeito da exposição à UVB sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio da resistência à vimblastina, mediada por transportadores ABC. Os óvulos (A) ou os embriões (B) foram submetidos a uma dose sub-lethal de UVB e, em seguida, incubados com VL (100 ou 400 nM). Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$). NT: não tratado.

4.21 Efeito da cumarina e de seus derivados sobre o desenvolvimento embrionário inicial

Os resultados do presente trabalho mostram que o desenvolvimento embrionário inicial e larval de *E. lucunter* foram particularmente sensíveis à exposição de gametas e embriões à UVB. Nossos dados apontam também para um relevante efeito fotoprotetor de transportadores ABC sobre os danos causados pela exposição de gametas e embriões à UVB, e que os bloqueadores REV205 e MK571 revertem o fenótipo de resistência à UVB. O conjunto desses resultados legitima esse modelo experimental para a investigação dos efeitos da radiação UV e a sua relação com proteínas da superfamília ABC, estabelecendo o desenvolvimento embrionário de *E. lucunter* como um modelo experimental para o estudo e prospecção de fármacos com fotoatividade ou com atividade moduladora sobre os transportadores ABC. Dessa forma, utilizamos o presente modelo supracitado como um modelo prospectivo para novos fármacos, avaliando a atividade moduladora sobre transportadores ABC e a fotoatividade da cumarina e de seus derivados.

Inicialmente, fomos investigar se os compostos supracitados apresentavam efeito antimitótico sobre o desenvolvimento embrionário inicial de *E. lucunter*. Todos os compostos (1-7) inibiram a progressão para a primeira clivagem, de maneira dependente de concentração a partir de 5 μM . A cumarina bloqueou a progressão para a primeira clivagem, apresentando percentuais de inibição de $13,8 \pm 1,0\%$ (5 μM); $35,2 \pm 2,7\%$ (50 μM); $46,4 \pm 1,9\%$ (100 μM) e $60,4 \pm 1,3\%$ (200 μM) (gráfico 21A). O valor de CE_{50} para o tratamento com a cumarina foi de 52,9 μM . Os derivados cumarínicos (2-7) foram 10 vezes mais efetivos que a cumarina no bloqueio da primeira divisão celular (tabela 5). Resultados similares foram obtidos na progressão para a segunda clivagem e para o estágio de mórula (gráfico 21B-C).

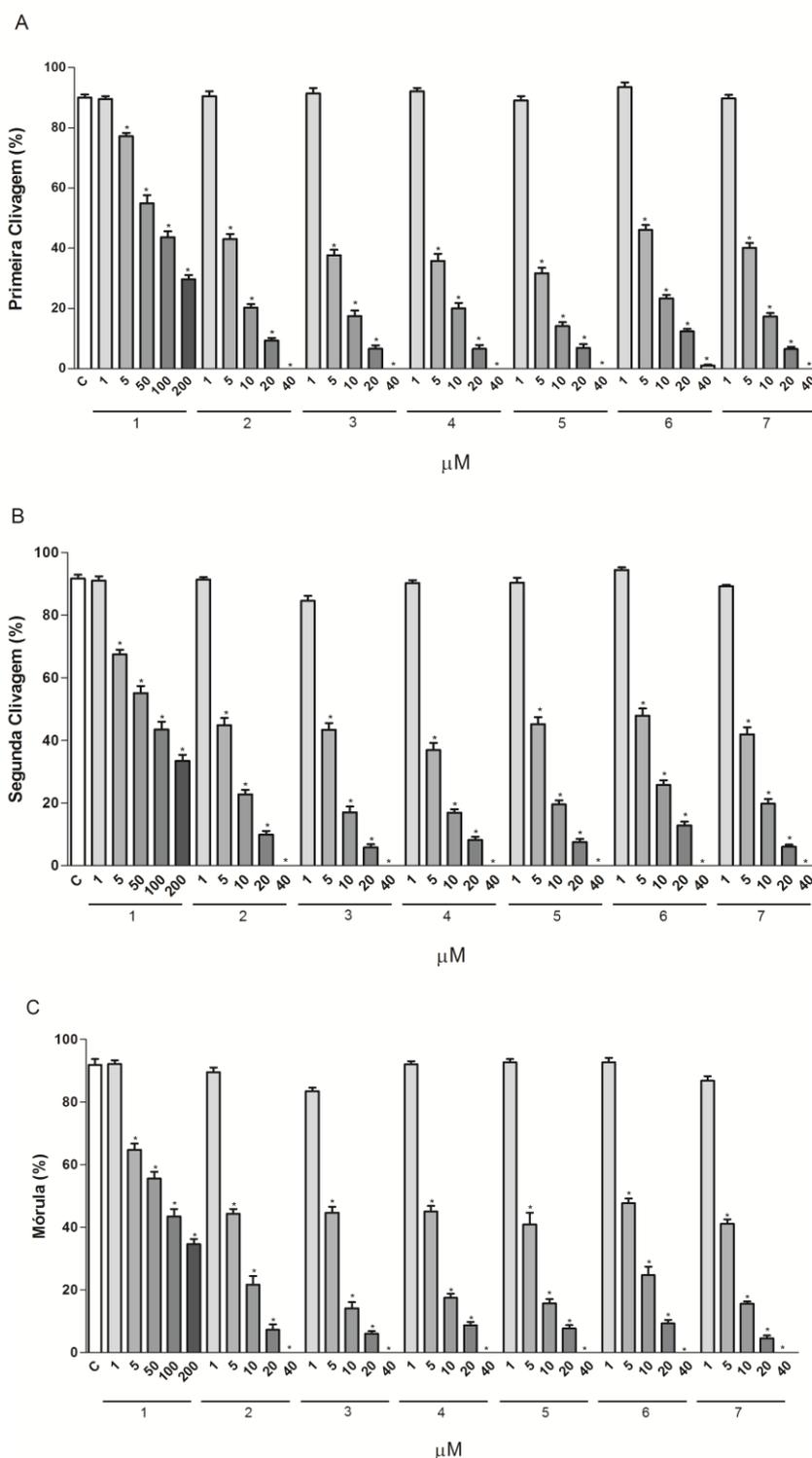


Gráfico 21: Efeito da cumarina e de seus derivados sobre a progressão para o estágio de primeira clivagem (A), de segunda clivagem (B) e para o estágio de mórula (C). Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. *** $P < 0,001$ comparado com o controle (one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey). (1) cumarina; (2) 3-hidroxycumarina; (3) 4-hidroxycumarina; (4) 6-hidroxycumarina; (5) 7-hidroxycumarina; (6) 6,7-dihidroxycumarina; (7) 6-metoxi-7-hidroxycumarina.

Tabela 5: Valores da CE_{50} para o tratamento da cumarina e seus derivados sobre o desenvolvimento embrionário (progressão para a primeira clivagem)

Compostos	CE_{50} - média \pm EPM (μ M)
Cumarina (1)	52.9 \pm 1.15
3- hidroxycumarina (2)	4.84 \pm 0.20
4- hidroxycumarina (3)	4.74 \pm 0.18
6- hidroxycumarina (4)	4.87 \pm 0.22
7- hidroxycumarina (5)	4.68 \pm 0.22
6,7- dihidroxycumarina (6)	4.69 \pm 0.15
6-metoxi-7- hidroxycumarina (7)	4.81 \pm 0.22

4.22 Efeito fotoprotetor da cumarina e seus derivados sobre zigotos expostos à UVB: tratamento prévio à irradiação.

Em uma primeira abordagem experimental, os zigotos foram tratados com os compostos antes da irradiação com UVB. Para evitar o bloqueio do desenvolvimento embrionário, ambos os compostos foram utilizados na concentração de 1 μM . Na progressão para a primeira clivagem, a UVB ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$) induziu um bloqueio de $42,0 \pm 0,9\%$. O tratamento prévio com a cumarina diminuiu o efeito embriotóxico da UVB em $20,3 \pm 1,2\%$. Resultados similares foram obtidos quando os embriões foram previamente tratados com a 3-hidroxycumarina (**2**), a qual diminuiu o efeito inibitório da UVB em $21,3 \pm 1,8\%$. No entanto, os compostos **3-7** não alteraram os efeitos deletérios induzidos pela UVB em zigotos. Resultados similares foram obtidos na progressão para a segunda clivagem (gráfico 22).

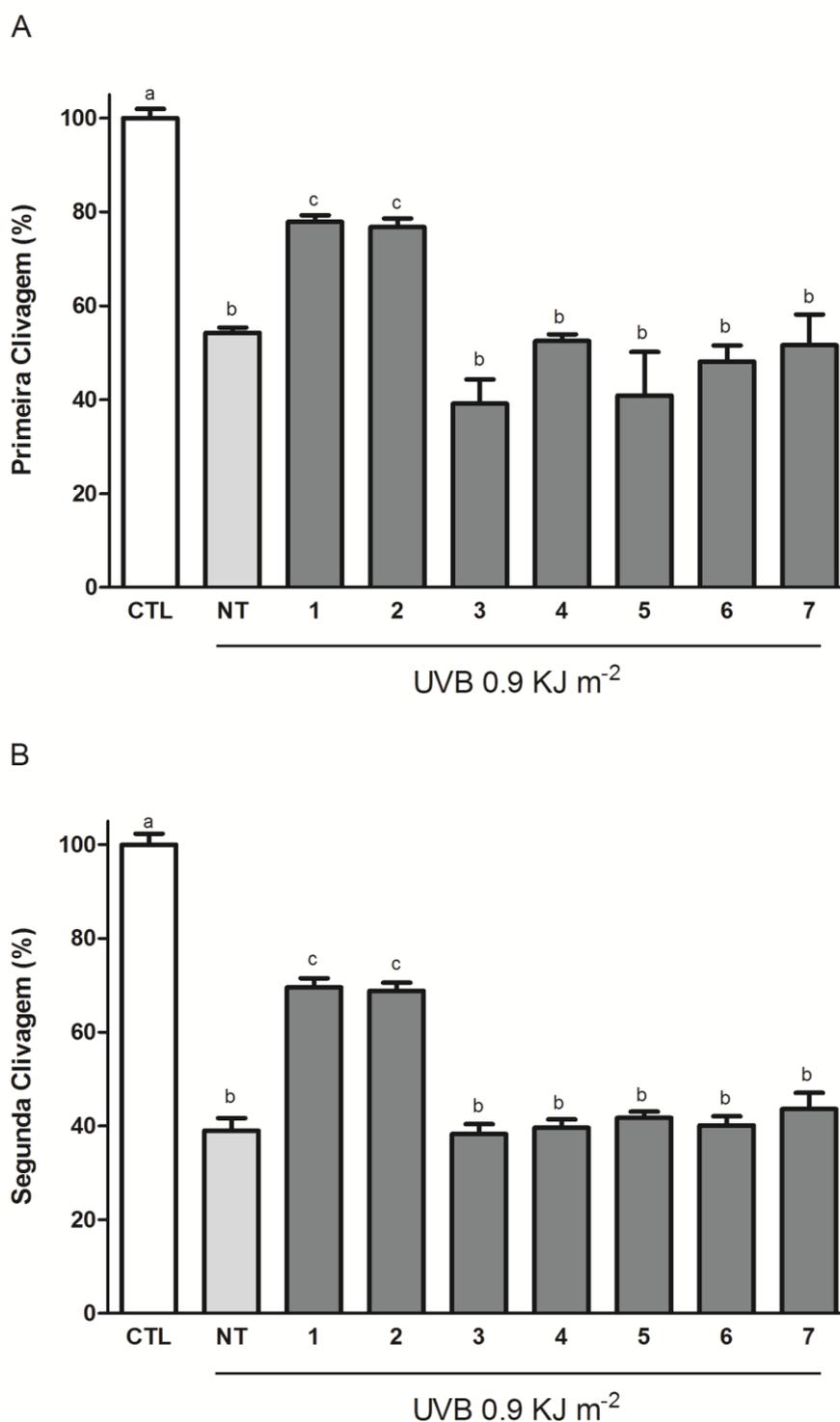


Gráfico 22: Efeito fotoprotetor da cumarina e seus derivados zigotos expostos à UVB: tratamento prévio à irradiação. O percentual de embriões que atingiram a primeira clivagem (A) e a segunda clivagem (B) é mostrado. Os dados foram expressos como média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$). (NT) Não tratado; (1) cumarina; (2) 3-hidroxycumarina; (3) 4-hidroxycumarina; (4) 6-hidroxycumarina; (5) 7-hidroxycumarina; (6) 6,7-dihidroxycumarina; (7) 6-metoxi-7-hidroxycumarina.

4.23 Efeito fotoprotetor da cumarina e do 3-cumarinol sobre zigotos expostos à UVB: Tratamento após a irradiação

Em seguida, fomos investigar o efeito fotoprotetor da cumarina (**1**) e da 3-hidroxycumarina (**2**) sobre o desenvolvimento embrionário, após a exposição à UVB. A UVB ($0,9 \text{ kJ m}^{-2}$) inibiu a progressão para a primeira clivagem em $44,0 \pm 1,1\%$. O pós-tratamento com a cumarina ($1,1 \mu\text{M}$) não alterou os efeitos deletérios induzidos pela UVB. De modo similar, o pós-tratamento com a 3-hidroxycumarina (**2**, $1 \mu\text{M}$) não diminuiu os efeitos inibitórios da UVB sobre a primeira divisão celular. Resultados similares foram obtidos para a progressão para a segunda clivagem (gráfico 23).

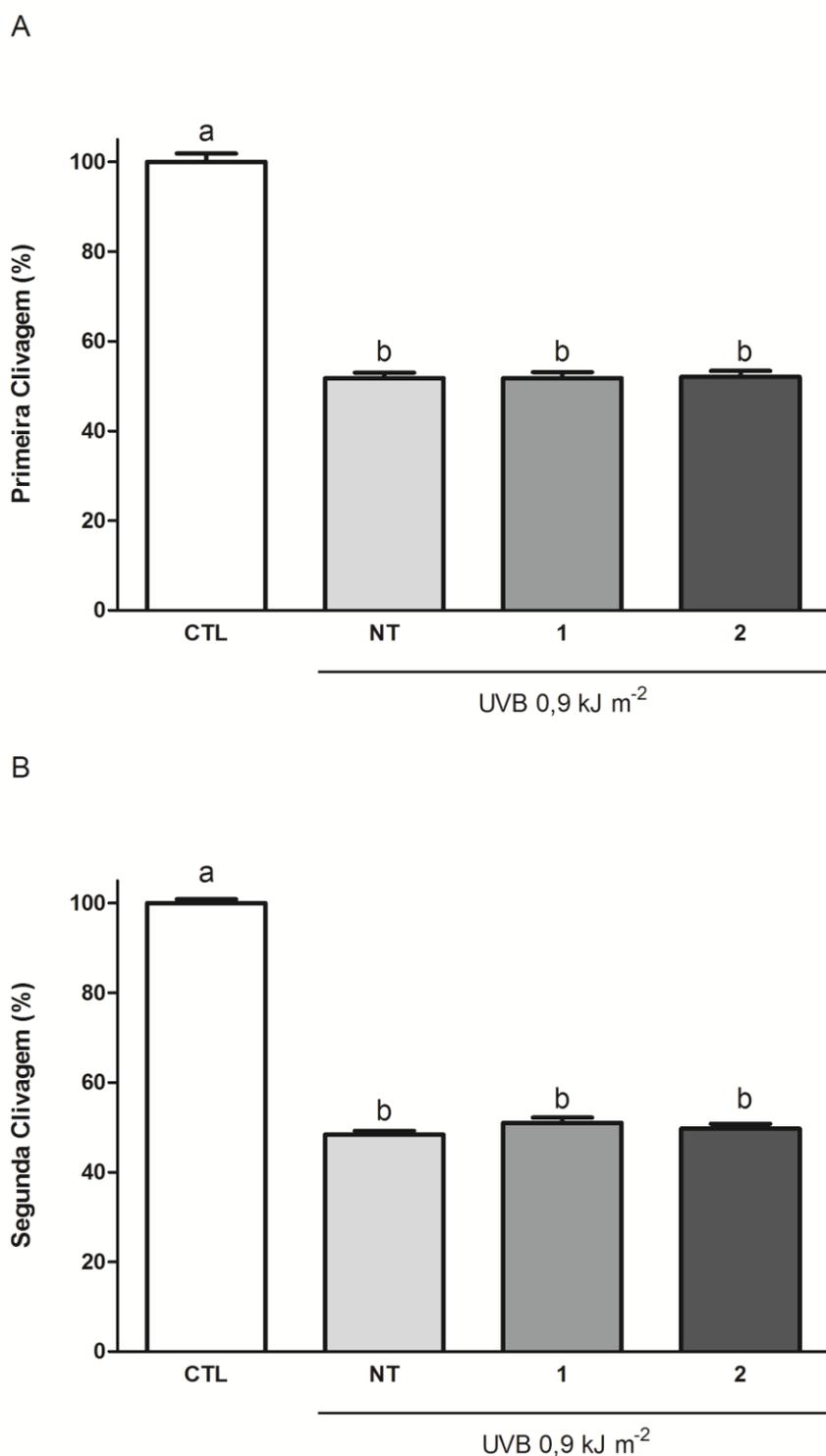


Gráfico 23: Efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxycumarina sobre zigotos expostos à UVB: tratamento posterior à irradiação. O percentual de embriões que atingiram a primeira clivagem (A) e a segunda clivagem (B) é mostrado. Os dados foram expressos como média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$). (NT) Não tratado; (1) cumarina; (2) 3-hidroxycumarina;

4.24 Efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxicumarina sobre gametas expostos à UVB: Tratamento prévio à irradiação

Adicionalmente, também foi investigado o efeito fotoprotetor da cumarina (**1**, 1 μM) e da 3-hidroxicumarina (**2**, 1 μM) em espermatozoides ou óvulos expostos à UVB. A progressão para a primeira clivagem foi inibida pela UVB em $52,1 \pm 1,5\%$ (espermatozoides irradiados - $0,056 \text{ kJ m}^{-2}$) e $43,4 \pm 2,4\%$ (óvulos irradiados - $0,45 \text{ kJ m}^{-2}$). O tratamento prévio com a cumarina (**1**) reduziu de forma relevante os efeitos deletérios da UVB sobre a primeira clivagem, apresentando percentuais de inibição de $17,6 \pm 3,9\%$ (espermatozoides irradiados - $0,056 \text{ kJ m}^{-2}$) e $6,2 \pm 2,4\%$ (óvulos irradiados - $0,45 \text{ kJ m}^{-2}$). De modo semelhante, o tratamento prévio com a 3-hidroxicumarina (**2**) diminuiu os efeitos deletérios da UVB para $18,1 \pm 3,9\%$ (espermatozoides irradiados - $0,056 \text{ kJ m}^{-2}$) e $6,7 \pm 2,0\%$ (óvulos irradiados - $0,45 \text{ kJ m}^{-2}$). Resultados similares foram obtidos na progressão para a segunda clivagem (gráfico 24).

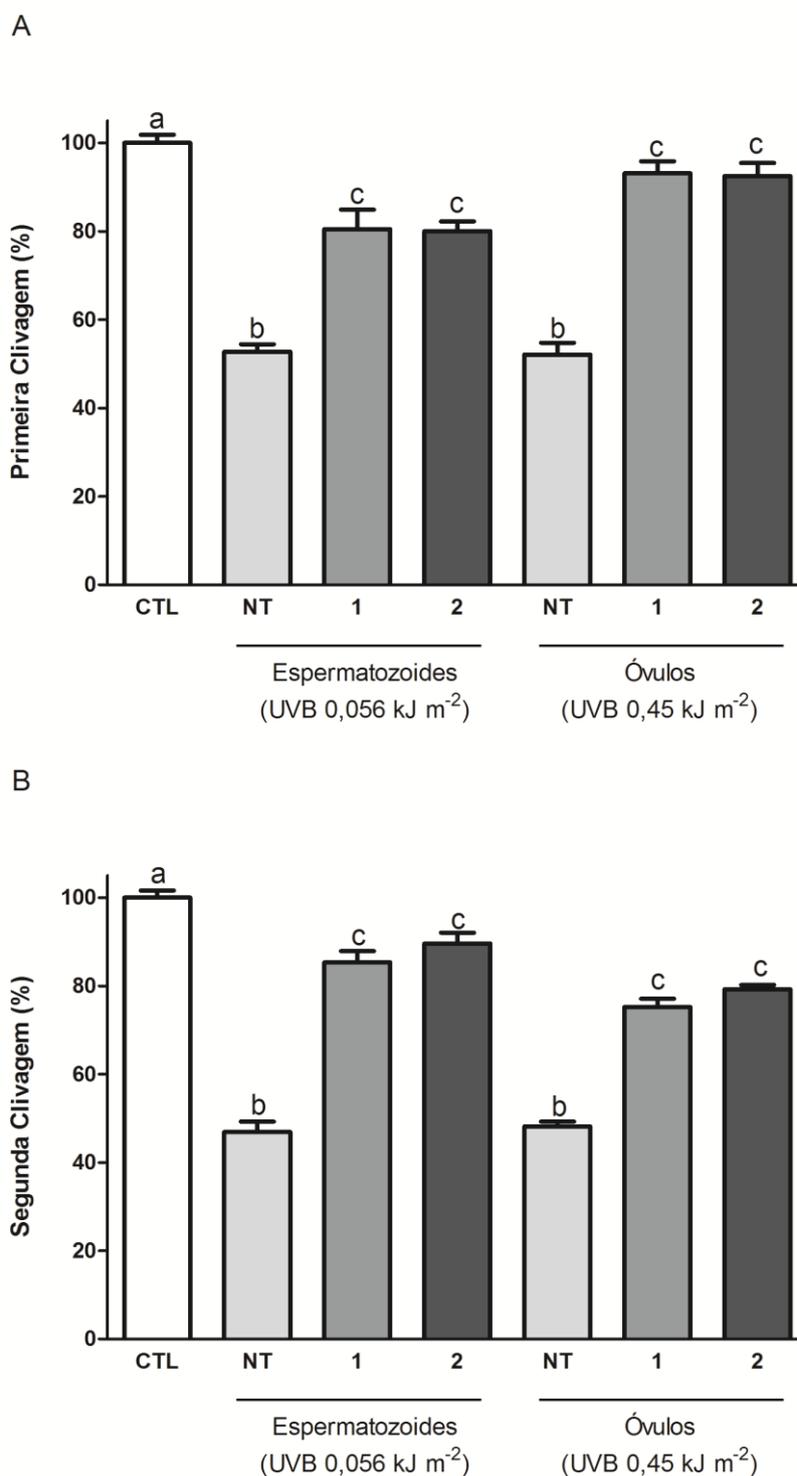


Gráfico 24: Efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxycumarina sobre gametas expostos à UVB: tratamento prévio à irradiação. O percentual de embriões que atingiram a primeira clivagem (A) e a segunda clivagem (B) é mostrado. Os dados foram expressos como média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$). (NT) Não tratado; (1) cumarina; (2) 3-hidroxycumarina;

4.25 Efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxicumarina sobre gametas expostos à UVB: Tratamento após à irradiação

Nesse ensaio, os espermatozoides ou os óvulos foram tratados com a cumarina (1) ou com a 3-hidroxicumarina (2) após a irradiação com a UVB. A progressão para a primeira clivagem foi inibida pela UVB em $46,4 \pm 1,2\%$ (espermatozoides irradiados - 0.056 kJ m^{-2}) e $44,8 + 1,4\%$ (óvulos irradiados - 0.45 kJ m^{-2}). O pós-tratamento com a cumarina (1, $1 \mu\text{M}$) não alterou os efeitos deletérios induzidos pela UVB em ambos os tipos celulares. De modo similar, o pós tratamento com a 3-hidroxicumarina (1, $1 \mu\text{M}$) também não diminuiu o efeito inibitório da UVB. Resultados similares foram obtidos na progressão para a segunda clivagem (gráfico 25).

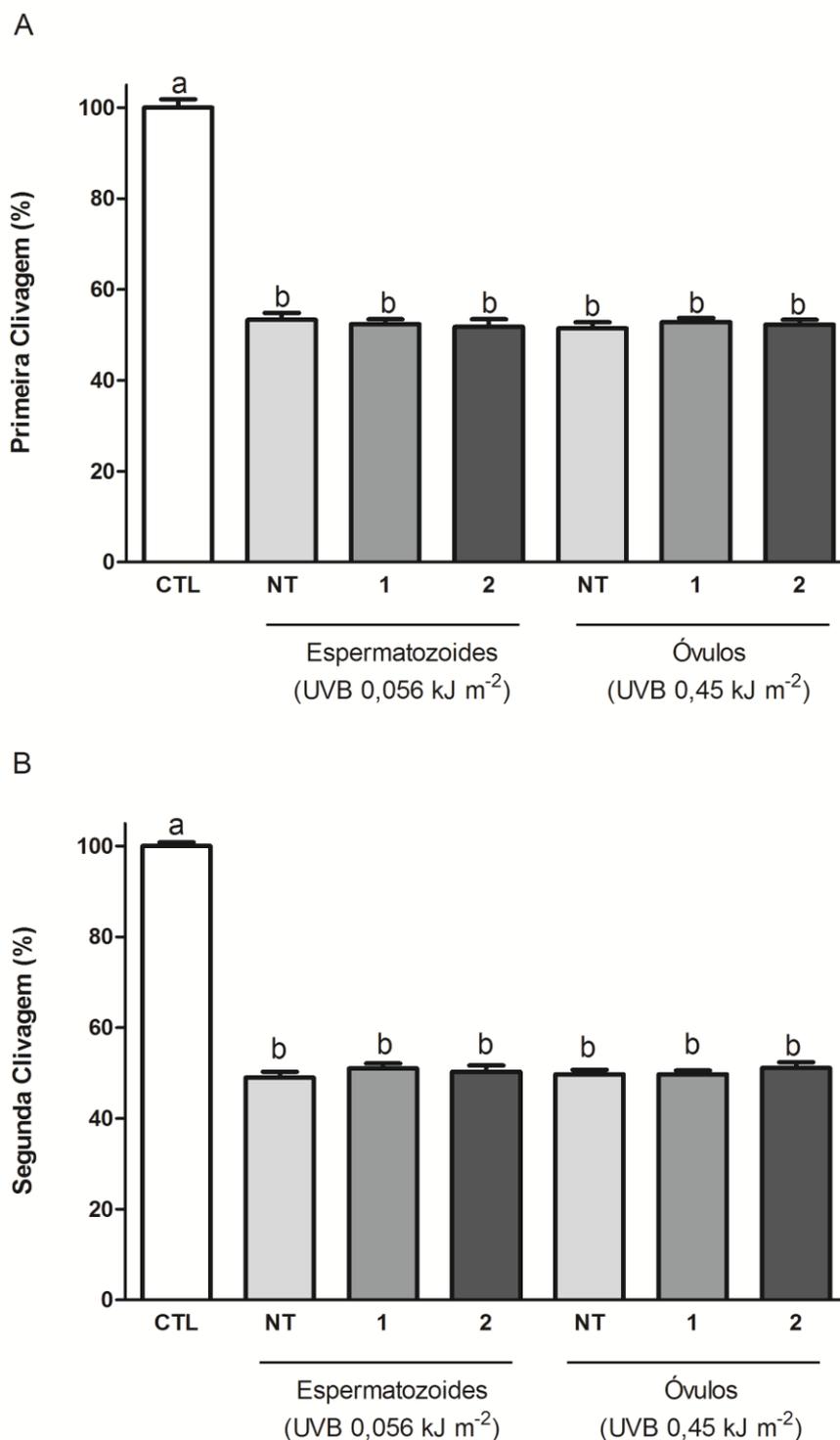


Gráfico 25: Efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxicumarina sobre gametas expostos à UVB: tratamento após a irradiação. O percentual de embriões que atingiram a primeira clivagem (A) e a segunda clivagem (B) é mostrado. Os dados foram expressos como média \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ($P < 0,05$). (NT) Não tratado; (1) cumarina; (2) 3-hidroxicumarina;

4.26 Efeito da cumarina e da 3-hidroxicumarina na atividade de transportadores ABC – Ensaio de acúmulo intracelular de C-AM

Em seguida, fomos investigar o efeito da cumarina e da 3-hidroxicumarina na atividade de transportadores ABC de zigotos, utilizando o ensaio de acúmulo intracelular de C-AM. A cumarina (1 μM) não aumentou a concentração intracelular de calceína fluorescente nos embriões de 2-4 células. A MIF nesse tratamento foi de $76,8 \pm 3,6$ comparado com o grupo controle, cuja MIF foi de $86,8 \pm 2,6$. Em contrapartida, a 3-hidroxicumarina aumentou a IMF para $132,4 \pm 5,7$, aproximadamente 1,4 vezes comparado com o grupo controle (gráfico 26). O VP (controle positivo, 10 μM) aumentou a IMF para $200,3 \pm 4,4$, o que corresponde a aproximadamente duas vezes quando comparado com o grupo controle. As fotomicrografias fluorescentes, representativas desse ensaio, são mostradas na figura 33.

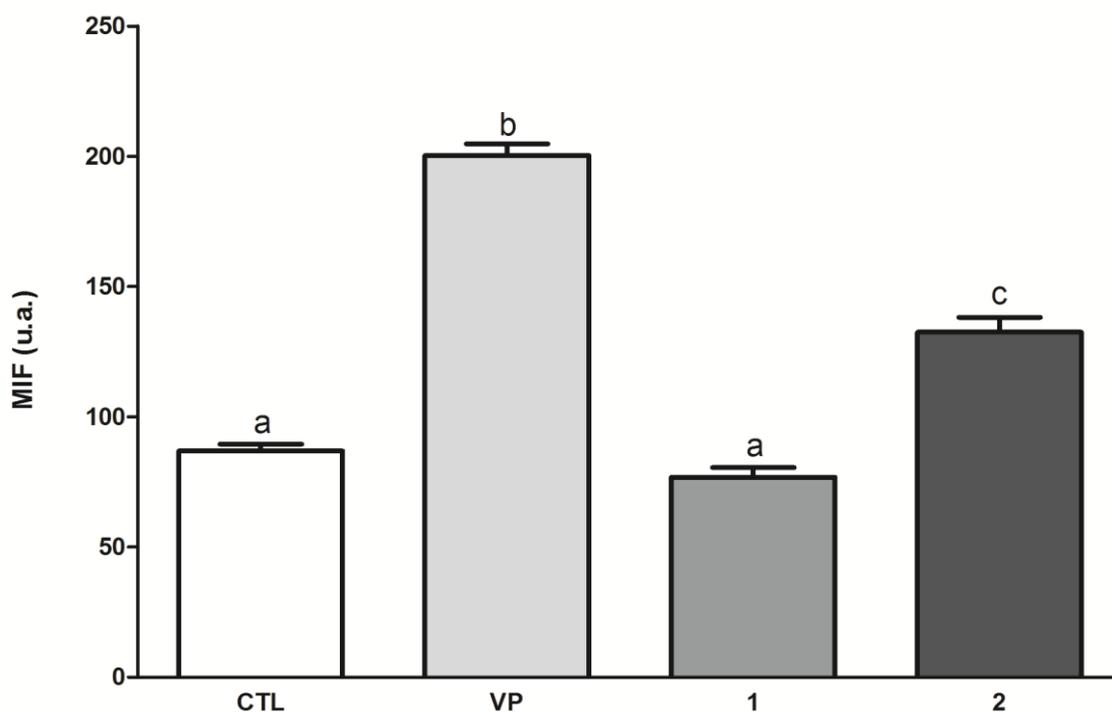


Gráfico 26: Efeito da cumarina e da 3-hidroxicumarina sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio de acúmulo da C-AM. Os dados foram expressos como intensidade média de fluorescência (IMF) \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$). u.a.: unidades arbitrárias de fluorescência; (1) cumarina; (2) 3-hidroxicumarina;

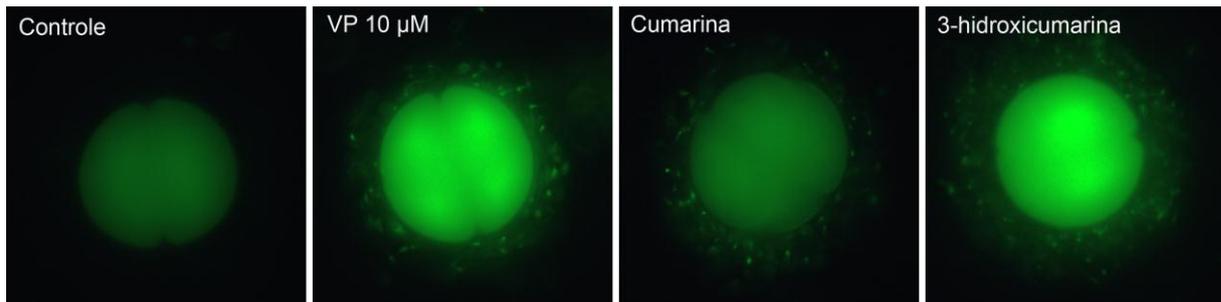


Figura 33: Fotomicrografias de embriões de 2-4 células tratados com VP, cumarina ou 3-hidroxicumarina e incubados com C-AM.

4.27 Efeito da cumarina e da 3-hidroxicumarina na atividade de transportadores ABC – Ensaio da resistência à vimblastina

A menor concentração de vimblastina (100 nM) não inibiu o desenvolvimento embrionário inicial. No entanto, a progressão para a primeira clivagem foi fortemente bloqueada quando os zigotos foram tratados com a maior concentração de vimblastina (400 nM). O co-tratamento da vimblastina com o verapamil (10 μ M) bloqueou, de forma relevante, o desenvolvimento embrionário. O tratamento dos zigotos com a cumarina não reverteu a resistência à vimblastina. Em contraste, a 3-hidroxicumarina (1 μ M) potencializou os efeitos inibitórios da vimblastina (gráfico 27).

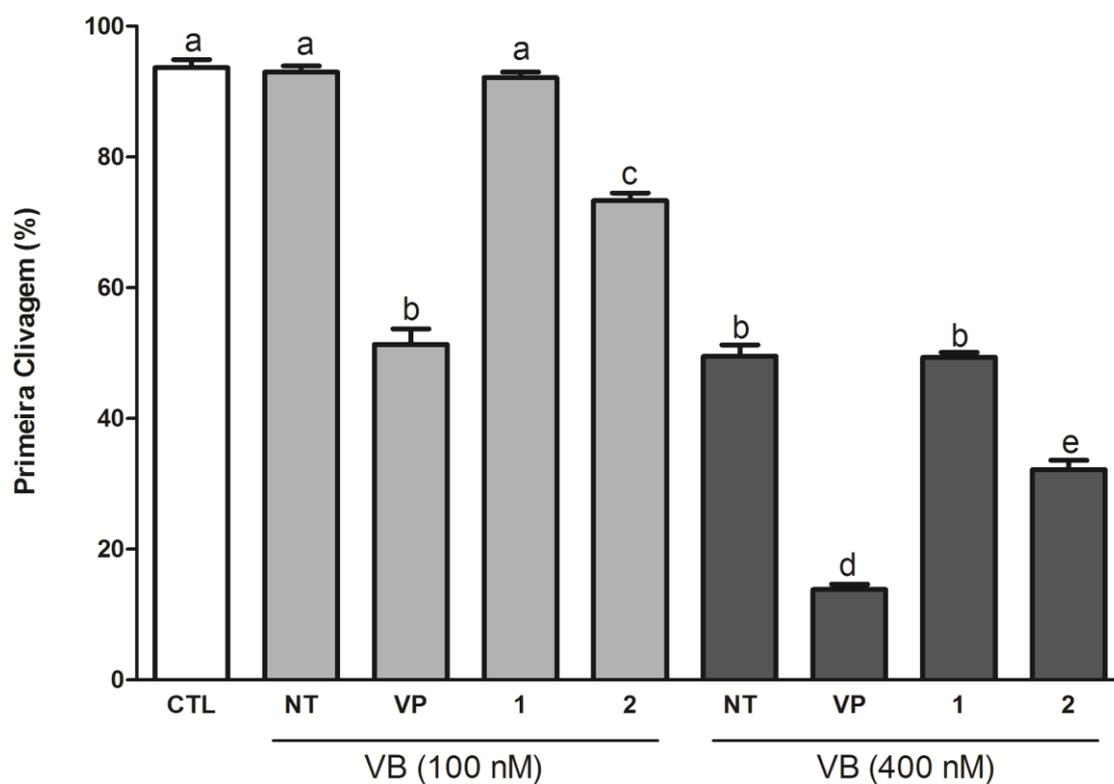


Gráfico 27: Efeito da cumarina e da 3-hidroxycumarina sobre a atividade de transportadores ABC – Ensaio de resistência à vimblastina. Os dados foram expressos como intensidade média de fluorescência (IMF) \pm EPM de 3 experimentos realizados em triplicata e de maneira independente. Os grupos representados com letras diferentes são significativamente diferentes, de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ($P < 0,05$). u.a.: unidades arbitrárias de fluorescência; NT: não tratado; (1) cumarina; (2) 3-hidroxycumarina;

Discussão

5 DISCUSSÃO

A radiação UV é um fator físico que induz efeitos diretos e indiretos no ecossistema e interações tróficas nos ambientes terrestres e aquáticos (CALDWELL et al., 1998; HADER et al., 2007). Os níveis ambientais de UVA e UVB variam de acordo com uma série de fatores, tais como: temperatura, velocidade do vento, cobertura de nuvens, latitude, longitude, altitude, posição diária e sazonal do sol, conteúdo do ozônio estratosférico e reflexão do solo (DIFFEY, 1991). Em ecossistemas marinhos, além dos fatores supracitados, a radiação UV é afetada também pela transparência da água, que depende principalmente das propriedades ópticas da água, do material dissolvido, da concentração de fitoplâncton, e da densidade de partículas suspensas (SOMMARUGA R;G, 2006).

Os ouriços-do-mar, por apresentarem um processo de fertilização e desenvolvimento embrionário externos, constituem um excelente modelo experimental para a investigação dos efeitos da radiação UV em organismos marinhos (BONAVENTURA et al., 2005), bem como para a prospecção de compostos com propriedades fotoativas. Além disso, a identificação da expressão e atividade de transportadores ABC (SAMANTA et al., 2006; DE SOUZA et al., 2010; GOKIRMAK et al., 2012) legitima a utilização de óvulos e embriões de ouriços-do-mar em estudos investigando o papel fotoprotetor dessas proteínas e em estudos que visam a prospecção de compostos com atividade moduladora de transportadores ABC.

No presente trabalho, demonstrou-se o envolvimento de transportadores ABC na resistência do desenvolvimento embrionário contra os efeitos danosos da radiação UVA e UVB. Foi demonstrado, ainda, o efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxycumarina contra a UVB, e a propriedade da 3-hidroxycumarina em bloquear a atividade de transportadores ABC em gametas e embriões de ouriço-do-mar.

O principal método de medição da radiação UV ambiental é realizado por satélite e é determinado em valores numéricos por meio do índice ultravioleta (IUV). O IUV é uma medida de intensidade da radiação UV solar ambiental total relevante aos efeitos sobre a pele humana e representa o valor máximo diário da UVA e UVB que atinge a superfície do planeta. De acordo com esses valores, no Brasil, a intensidade média diária de radiação UV total varia de 2,3 kJ m⁻² (29°4'S; 53°8'W) a

35,5 kJ m⁻² (5° 5'S; 35°1'W) (YAGURA et al., 2011; SCHUCH et al., 2012). A intensidade média de radiação UV na área de estudo (7°0'S, 34°4'W) é de aproximadamente 5,94 kJ m⁻², correspondendo a uma dose média de 5,643 kJ m⁻² de UVA e 0,297 kJ m⁻² de UVB (INPE).

A exposição de gametas e embriões de ouriços-do-mar à radiação UV pode induzir a formação de dímeros de pirimidina, e outros tipos de danos ao DNA (LESSER et al., 2001; LESSER;BARRY, 2003), além de um aumento na produção de ROS (LU;WU, 2005b). Outros efeitos secundários também são relacionados com a radiação UV, entre eles podemos destacar: as alterações na expressão de proteínas do ciclo celular, como a p53, a p21 e a cdc2 (LESSER et al., 2003); aumento na expressão de proteínas de resposta ao estresse, como a hsp70, a MAP cinase e a 14-3-3ε (BONAVENTURA et al., 2005; RUSSO et al., 2010); perda da integridade de membrana (PRUSKI et al., 2009); e perda da função mitocondrial (LU;WU, 2005a). Esses efeitos deletérios são capazes de inibir a fertilização e o desenvolvimento embrionário ou causar malformações nas larvas desses animais.

Os nossos dados demonstraram que os espermatozoides, os óvulos e os zigotos de *E. lucunter* são resistentes à doses de UVA de relevância ambiental (3,6 a 14,4 kJ m⁻²) (gráfico 1). Adams e Shick (2001), obtiveram resultados semelhantes onde mostraram que o desenvolvimento embrionário inicial e tardio do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus droebachiensis* não foi sensível à irradiação com UVA em doses até 152 kJ m⁻². Alguns estudos demonstraram que a PAR, também chamada de luz branca, e a radiação UVA ativam o fotorreparo mediado pela enzima fotoliase (AKIMOTO;SHIROYA, 1987a; b). Esses dados podem explicar a prevenção/reversão dos danos induzidos pela UVA em gametas e zigotos de *E. lucunter*. Além disso, a resistência à UVA, em gametas e embriões de ouriços-do-mar, também é atribuída à presença de pequenas moléculas antioxidantes, tais como: ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides, ovotióis e aminoácidos semelhantes à micosporina. Esses compostos previnem danos ao desenvolvimento embrionário induzidos pela geração de ROS (DUNLAP;YAMAMOTO, 1995; SHICK et al., 1996; ADAMS;SHICK, 2001).

De fato, a geração intracelular de ROS em espermatozoides, óvulos e zigotos expostos à UVA (3,6, 7,2 e 14,4 kJ m⁻²) foi a mesma comparada com o grupo não irradiado (gráficos 2 e 3). Hoerter e colaboradores (2008) obtiveram os mesmos resultados em pesquisas com fibroblastos humanos. Os autores observaram uma

elevação dos níveis intracelulares do ânion superóxido mitocondrial (O_2^-) apenas em doses de UVA superiores a 90 kJ m^{-2} , cerca de 6 vezes maiores que as doses utilizadas nesse estudo. De forma semelhante, Shorrocks e colaboradores (2008) demonstraram que queratinócitos humanos tinham seus níveis de ROS elevados somente em doses de UVA superiores a 100 kJ m^{-2} . Assim, esses dados sugerem que a exposição à UVA, nas doses analisadas, não altera os níveis intracelulares de ROS em gametas e zigotos de *E. lucunter*, provavelmente devido à presença de diversos mecanismos de depuração de ROS.

De modo diferente dos resultados obtidos com a UVA, os espermatozoides, óvulos e zigotos de *E. lucunter* foram sensíveis à exposição à UVB (gráficos 4, 5 e 6). Estudos têm demonstrado diferentes níveis de sensibilidade à UVB entre gametas e células embrionárias de diversas espécies de ouriços do mar. Au e colaboradores (2002) mostraram que a irradiação dos espermatozoides de *Anthocidaria crassispina* inibiu a fertilização na dose de $5,4 \text{ kJ m}^{-2}$ de UVB, demonstrando uma maior resistência dessa espécie de Peng Chau (Hong Kong) comparado com *E. lucunter*, cujo bloqueio da fertilização foi obtido em doses 1,5 vezes menores. Em contraste, os espermatozoides de *E. lucunter* foram mais resistentes à UVB que os espermatozoides de *Sphaerechinus granularis*. Os gametas masculinos dessa espécie da Baía de Banyuls (França) apresentaram alterações morfológicas e diminuição da capacidade de fertilização em doses de $2,218 \text{ kJ m}^{-2}$, 1,36 vezes menores que em *E. lucunter* (PRUSKI et al., 2009).

A exposição dos óvulos de *E. lucunter* à UVB não bloqueou a fertilização (dados não mostrados), mas atrasou o desenvolvimento embrionário a partir de doses de $0,112 \text{ kJ m}^{-2}$ (gráfico 5). Resultados semelhantes foram obtidos por Nahon e colaboradores (2009) em estudos com o ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus*. Os autores obtiveram um bloqueio de aproximadamente 80% na progressão para a primeira clivagem após a exposição dos óvulos a uma dose de $7,6 \text{ kJ m}^{-2}$. O mesmo percentual de bloqueio em *E. lucunter* foi obtido com uma dose 4 vezes menor. Esses dados demonstram uma maior sensibilidade dos óvulos de *E. lucunter* à UVB em comparação com o *S. purpuratus*. Uma possível explicação para essa diferença entre as duas espécies pode estar na expressão e atividade diferencial de proteínas de resposta ao estresse induzido por radiação UV. Em *S. purpuratus*, diversos mecanismos proteicos e não proteicos são responsáveis pela proteção contra os efeitos deletérios da UVB (CAMPANALE et al., 2011). Alguns

desses mecanismos podem estar ausentes em *E. lucunter* e estudos adicionais são necessários para um completo entendimento da sensibilidade dos óvulos de *E. lucunter* à UVB. De modo semelhante, diferenças nas respostas à UVB também foram relatadas em embriões de *zebra fish* (*Danio rerio*). Yang e colaboradores (2012) demonstraram que espécimes obtidos no aquário de Seul (Coreia-do-sul) apresentaram um aumento na produção de ROS e uma indução de apoptose quando os embriões foram expostos à dose de $0,5 \text{ kJ m}^{-2}$. Em contraste, Dong e colaboradores (2007), estudando espécimes obtidos na Flórida (EUA) verificaram malformações nos estágios mais tardios do desenvolvimento somente em embriões expostos à doses superiores a $9,3 \text{ kJ m}^{-2}$.

Os zigotos de *E. lucunter* também foram mais sensíveis à UVB que os zigotos de *Strongylocentrotus droebachiensis* das Ilhas de Shoals (Golfo do Maine, EUA). A exposição à UVB (45 kJ m^{-2}) induziu uma redução da viabilidade celular, além promover danos no DNA e superexpressão de genes regulatórios do ciclo celular, tais como p53 e p21 (LESSER;BARRY, 2003; LESSER et al., 2003). No entanto, zigotos de *E. lucunter* foram mais resistentes à UVB em comparação com outras espécies. A irradiação de embriões de *Hemicentrotus pulcherrimus*, na dose de $0,05 \text{ kJ m}^{-2}$, induziu anormalidades morfológicas em embriões de 8 ou 16 células (AKIMOTO et al., 1983). A exposição de embriões de 16 células de *Paracentrotus lividus* à $0,4 \text{ kJ m}^{-2}$ inibiu a gastrulação e induziu um aumento na expressão de diversos genes envolvidos nas respostas ao estresse (RUSSO et al., 2010; RUSSO et al., 2014). Todos os trabalhos supracitados foram conduzidos em espécies que habitam águas temperadas e são adaptadas a temperaturas na faixa de 4 a 18°C . Um dos poucos trabalhos que investigou o efeito da radiação UV em ouriços-do-mar de águas tropicais, adaptados a temperaturas entre 26 a 30°C , é o de Lister e colaboradores (2010). Os autores realizaram um estudo *in situ* e demonstraram que as larvas do ouriço-do-mar *Tripneutes gratilla*, coletado nas Ilhas Cook, Nova Zelândia ($18^{\circ}85' \text{ S}$, $159^{\circ}75' \text{ L}$), não apresentaram anormalidades morfológicas, nem danos oxidativos em lipídios ou proteínas, quando expostas à UVA ($970,9 \text{ kJ m}^{-2}$). No entanto, a exposição de larvas à UVB induziu malformações, além de danos oxidativos em proteínas e superexpressão de enzimas de resposta ao estresse. Esses dados corroboram com os obtidos em *E. Lucunter*, demonstrando resistência à UVA e sensibilidade à UVB em espécies de ouriços-do-mar de águas tropicais.

De modo semelhante aos resultados obtidos com a UVA, a exposição à UVB não alterou os níveis intracelulares de ROS em gametas e zigotos de *E. lucunter* (gráficos 8 e 9). Assim, o atraso/bloqueio no desenvolvimento embrionário, induzido pela UVB, não pode ser atribuído a um aumento nos níveis intracelulares de ROS. Lu e Wu (2005b) demonstraram um aumento nos níveis intracelulares de ROS em espermatozoides do ouriço-do-mar *Anthocidaris crassispina* expostos à doses acima de 10 kJ m^{-2} de UVB. Nessas doses, a integridade de membrana e a capacidade de fertilização dos espermatozoides foram afetadas. No presente trabalho, não foram analisadas doses superiores à $3,6 \text{ kJ m}^{-2}$, uma vez que estas doses inibem o processo de fertilização (dados não mostrados) e o objetivo do estudo era analisar a consequência da exposição dos espermatozoides à UVB no desenvolvimento embrionário.

Não há relatos na literatura sobre estudos avaliando a exposição de óvulos e zigotos de ouriços-do-mar à UVB e os níveis de ROS. No entanto, a elevada atividade antioxidante nesses tipos celulares tem sido extensivamente avaliada (LESSER et al., 2003; AGCA et al., 2009; LISTER et al., 2010; RUSSO et al., 2010; RUSSO et al., 2014). Adicionalmente, Hideg e colaboradores (2013) sugerem que doses baixas de UVB induzem uma resposta ao estresse, estimulando a expressão e atividade de várias enzimas depuradoras de ROS que protegem as células vegetais do estresse oxidativo. Dessa forma, sugerimos que os níveis intracelulares de ROS em óvulos ou zigotos de *E. lucunter* expostos à UVB permaneçam em níveis basais devido a uma elevada capacidade de depuração de ROS.

Os efeitos deletérios da UVB em gametas e embriões de *E. lucunter* foram atenuados quando o desenvolvimento embrionário foi conduzido sob a luz visível (gráficos 10, 11 e 12). Estudos anteriores também relataram que o efeito inibitório da UVB sobre a gastrulação é completamente revertido pela subsequente exposição à luz visível (AMEMIYA et al., 1986). Esses dados podem ser explicados pelo mecanismo de fotorreparo que utiliza a energia da luz, com comprimento de onda entre 320 e 500 nm, para reparar o DNA em uma reação conhecida por ser completamente livre de erro (SANCAR, 2003). Esse processo é mediado pela fotoliase, uma enzima amplamente conservada entre procariotos e eucariotos (ESSEN;KLAR, 2006). Isely e colaboradores (2009) demonstraram que o mRNA da fotoliase estava presente em níveis elevados nas gônadas, óvulos fertilizados, blástula, prisma e no estágio larval do ouriço-do-mar *Sterechinus neumayeri*. Esses

autores sugeriram que a expressão da fotoliase em ouriços-do-mar é induzida pela exposição à UVB, sendo dependente da profundidade da coluna de água. Até o presente momento, não há relatos na literatura sobre a expressão ou a atividade da fotoliase em *E. lucunter*. Entretanto, o presente trabalho sugere, fortemente, a presença de um mecanismo de fotorreparo; mecanismo, este, responsável pela resistência de espermatozoides, óvulos e zigotos de *E. Lucunter* à exposição à UVB.

Adicionalmente, investigou se os danos no desenvolvimento embrionário inicial, induzidos pela exposição de gametas e zigotos à UVB, persistiam até o desenvolvimento da larva plúteos. Apenas o desenvolvimento larval derivado de espermatozoides irradiados foi sensível à UVB. As larvas submetidas a esse tratamento apresentaram malformações nas espículas e no trato gastrointestinal (dose de $1,8 \text{ kJ m}^{-2}$) ou tiveram o desenvolvimento embrionário interrompido durante a gastrulação (dose de $1,8 \text{ kJ m}^{-2}$) (figura 30). Não há relato na literatura de trabalhos investigando a consequência da exposição de espermatozoides à UVB no desenvolvimento larval de ouriços-do-mar. No entanto, os efeitos deletérios nas larvas de *E. Lucunter*, submetidas a esse tratamento, foram os mesmos observados no estudo de Bonaventura e colaboradores (2005). Estes autores observaram malformações no esqueleto e no intestino das larvas, quando embriões de *Paracentrotus lividus* - no estágio de blástula - foram irradiados com doses de UVB acima de $0,3 \text{ kJ m}^{-2}$. Além disso, foi verificada uma redução, induzida pela UVB, da expressão do gene SM-30, um gene codificador de proteínas esqueléticas. Resultados semelhantes foram obtidos por Nahon e colaboradores (2009) em larvas do ouriço-do-mar *Sphaerechinus granularis* derivadas de embriões irradiados no estágio de prisma ($0,045 \text{ kJ m}^{-2}$). Lesser e colaboradores (2003) também demonstraram uma diminuição da sobrevivência de larvas do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus droebachiensis* e da bolacha da praia *Echinarachnius parma* derivados de zigotos, blástulas, gástrulas e prismas expostos à UVB. As informações sobre o efeito da UVA ou UVB nos diferentes tipos celulares de diversas espécies de ouriços-do-mar são sumarizadas no quadro 2.

Os trabalhos citados anteriormente são diferentes dos obtidos nesse estudo, onde a exposição de zigotos e prismas à UVB não induziu efeitos deletérios e nem atrasou o desenvolvimento larval de *E. lucunter*. Esses dados sugerem uma maior resistência de embriões dessa espécie em relação à *P. lividus*, *S. granularis*, *S. droebachiensis* e *E. parma*, o que pode ser atribuído à maior expressão e atividade

de proteínas de resposta ao estresse, como, por exemplo, os transportadores ABC. No entanto, não há relatos na literatura acerca da expressão ou atividade de transportadores ABC em *S. granularis*, *S. droebachiensis* ou *E. parma*. Assim, estudos devem ser conduzidos nestas espécies para uma elucidação do papel dos transportadores ABC e o grau de sensibilidade à UVB nas mesmas.

Quadro 2: Comparação entre a sensibilidade à radiação UV em diversas espécies de ouriços-do-mar.

Espécie	Dose	Amostra irradiada	Efeito	Referência
<i>S. droebachiensis</i>	UVA (152 kJ m ⁻²)	Zigotos	Resistência à UVA	ADAMS;SHICK (2001)
<i>A. crassispina</i>	UVB (5,4 kJ m ⁻²)	Espermatozoides	Inibição da fertilização	AU et al. (2002)
<i>S. granularis</i>	UVB (2,2 kJ m ⁻²)	Espermatozoides	Inibição da fertilização	PRUSKI et al. (2009)
<i>A. crassispina</i>	UVB (10 kJ m ⁻²)	Espermatozoides	Inibição da fertilização	LU;WU (2005b)
<i>S. purpuratus</i>	UVB (7,6 kJ m ⁻²)	Óvulos	Inibição da 1ª clivagem	NAHON et al. (2009)
<i>S. droebachiensis</i>	UVB (45 kJ m ⁻²)	Zigotos, blástulas e gástrulas	Redução da viabilidade celular	LESSER et al. (2003)
<i>H. pulcherrimus</i>	UVB (0,05 kJ m ⁻²)	Embriões de 8 ou 16 células	Malformações na gastrulação	AKIMOTO et al. (1983)
<i>P. lividus</i>	UVB (0,4 kJ m ⁻²)	Embriões de 16 células	Inibição da gastrulação	RUSSO et al. (2014)
<i>P. lividus</i>	UVB (0,3 kJ m ⁻²)	Blástulas	Malformações nas larvas	BONAVENTURA et al. (2005)
<i>P. lividus</i>	UVB (0,045 kJ m ⁻²)	Prismas	Malformações nas larvas	NAHON et al. (2009)
<i>T. gratilla</i>	UVB (32,2 kJ m ⁻²)	Larvas	Anormalidades morfológicas	LISTER et al. (2010)

Os nossos dados também demonstram uma maior resistência de óvulos e embriões em relação aos espermatozoides de *E. lucunter*, uma vez que o desenvolvimento larval foi prejudicado apenas quando os gametas masculinos foram expostos à UVB. Além disso, nos experimentos onde avaliamos a consequência da irradiação de gametas e zigotos no desenvolvimento embrionário inicial,

demonstramos uma maior sensibilidade dos espermatozoides à UVB em relação aos óvulos e zigotos. De acordo com os valores da DE_{50} apresentados na tabela 1, todos os estágios do desenvolvimento embrionário monitorados foram inibidos em menores doses quando os espermatozoides foram expostos à UVB. De acordo com a mesma tabela, verificamos que os óvulos foram mais sensíveis à UVB em comparação com os zigotos, uma vez que os valores da DE_{50} são menores para os gametas femininos, em relação aos zigotos. Resultados semelhantes foram obtidos por Nahon e colaboradores (2009), cujo trabalho demonstrou que os espermatozoides de *S. granularis* foram 6 vezes mais sensíveis à UVB em comparação com os óvulos, e os gametas femininos foram 1,42 vezes mais sensíveis à UVB que os embriões.

Diversos fatores podem explicar a maior sensibilidade dos gametas masculinos à UVB em comparação aos gametas femininos e aos zigotos: a ausência de uma proteção bioquímica contra UVB nos espermatozoides, tais como os aminoácidos semelhantes à micosporina; um limitado potencial antioxidante devido ao seu reduzido volume citoplasmático; uma baixa capacidade de reparo de DNA; e elevada sensibilidade à peroxidação de lipídios (AITKEN et al., 1998; DONNELLY et al., 2000; ADAMS;SHICK, 2001).

Em contraste, os óvulos apresentam mecanismos de defesa bioquímicos que previnem os efeitos deletérios da radiação UV. Entre esses mecanismos podemos citar: elevada concentração de aminoácidos semelhantes à micosporina; mecanismos de fotorreparo e reparo por excisão de bases; e presença de enzimas depuradoras de ROS (DAHMS;LEE, 2010). Alguns trabalhos sugerem que os embriões adquirem resistência à UVB conforme o progresso no desenvolvimento embrionário. Amemiya e colaboradores (1986) demonstraram que a gastrulação de *H. pulcherrimus* é inibida de forma mais eficiente pela UVB quando a irradiação é realizada nos estágios iniciais do desenvolvimento. A exposição de embriões de *P. lividus* à UVB induziu mais alterações morfológicas em mórulas irradiadas, em comparação com blástulas irradiadas (BONAVENTURA et al., 2006).

Além dos mecanismos intracelulares, citados no parágrafo anterior, um fator relevante, e que é considerado como a primeira linha de defesa contra estresses químicos, físicos, e biológicos, principalmente em organismos cuja fertilização e o desenvolvimento embrionário são externos, é a atividade de bombas de efluxo, também conhecidas como transportadores ABC (DEAN et al., 2001). A expressão e

atividade dos transportadores ABC tem sido descritas em óvulos, espermatozoides e embriões de invertebrados marinhos. De Souza e colaboradores (2010) demonstraram a atividade de transportadores ABC em óvulos de *E. lucunter*. Silva-Neta e colaboradores (2012) mostraram que a atividade dos transportadores ABCB1 e ABCC1 também ocorre em espermatozoides de *E. Lucunter*, sendo, no entanto, menor do que a observada em óvulos da mesma espécie; porém, a atividade destes transportadores, no gameta masculino, é crucial para o sucesso da fertilização. Entretanto, os estudos demonstram que a atividade dos transportadores ABC é nitidamente maior durante a embriogênese. Alguns autores relataram uma expressiva elevação na atividade dessas proteínas nos primeiros 25 minutos após a fertilização (HAMDOUN, A. M. et al., 2004; DE SOUZA et al., 2010). Esse aumento é dependente da polimerização dos filamentos de actina e fusão dos grânulos corticais com a membrana do zigoto (WHALEN et al., 2012). Estudos realizados ao longo de três dias de desenvolvimento embrionário, desde o zigoto até estágio de prisma, demonstraram a expressão de 20 tipos de transportadores ABC (SHIPP;HAMDOUN, 2012). Os autores verificaram que a expressão de 7 genes, de um total de 20, não se encontrava presente durante o estágio inicial do desenvolvimento, e somente era elevada após o estágio de blástula.

Sabendo do papel relevante destes transportadores como barreiras bioquímicas contra agentes estressores (HAMDOUN;EPEL, 2007; EPEL et al., 2008; BOSNJAK et al., 2009), foi levantada a hipótese de que a maior resistência à UVB nos embriões, em relação aos gametas, poderia estar relacionada ao aumento na atividade dos transportadores ABCB1 e ABCC1 após a fertilização. Assim, decidiu-se investigar o envolvimento dos transportadores ABC na proteção de gametas e embriões de *E. lucunter* contra os efeitos deletérios da UVB, utilizando como ferramentas farmacológicas a REV205, um bloqueador do transportador ABCB1 (SHAROM et al., 1999), e o MK571, um bloqueador do transportador ABCC1 (GEKELER et al., 1995).

Os bloqueadores de transportadores ABC *per si* não inibiram o desenvolvimento embrionário inicial e não induziram alterações morfológicas nos embriões de *E. lucunter* (gráfico 13). No entanto, o tratamento de espermatozoides com os bloqueadores REV205 (10 μ M) ou MK571 (10 μ M), e a sua posterior irradiação com UVA, comprometeu o desenvolvimento embrionário dos zigotos formados com estes gametas, reduzindo o percentual do desenvolvimento (gráficos

14A-B). O mesmo não foi observado para o tratamento de óvulos ou zigotos com REV205 (10 μ M) ou MK571 (10 μ M), e a posterior exposição à UVA (gráficos 15A-B e 16A-B). A ausência de efeito inibitório para esses tratamentos pode ser relacionada com o fato dos óvulos e zigotos apresentarem uma maior atividade de ABCB1 e ABCC1 em relação aos espermatozoides (DE SOUZA et al., 2010; SILVA-NETA et al., 2012; TORREZAN et al., 2012) e, por isso, o bloqueio completo desses transportadores requer uma maior concentração dos bloqueadores. No entanto, trabalhos anteriores, realizados pelo nosso grupo, demonstraram que a REV205 (1 ou 10 μ M) aumentou (cerca de 3 a 4 vezes) a fluorescência intracelular da calceína em óvulos e embriões e reverteu a resistência dos embriões à VB em quase 100%. Esses dados sugerem que uma quantidade relevante de transportadores ABC em óvulos e zigotos é inibida pela ação dos bloqueadores nas concentrações utilizadas, o que nos permite descartar a hipótese supracitada. Assim, os nossos resultados mostram que a atividade dos transportadores ABCB1 e ABCC1 é essencial para a proteção dos gametas masculinos contra os efeitos deletérios da UVA, ao mesmo tempo em que sugerem que mecanismos adicionais de proteção contra a UVA estejam presentes em óvulos ou zigotos, uma vez que o bloqueio da sua atividade não afetou a resistência destas células. De modo semelhante aos nossos dados, Trindade e colaboradores (1999) mostraram que os bloqueadores do transportador ABCB1 não alteraram a resistência à UVA na linhagem leucêmica resistente à múltiplas drogas (Lucena-1). Os autores atribuíram a resistência à UVA dessa linhagem ao aumento na atividade da enzima catalase.

Em contraste com os dados obtidos nos experimentos de irradiação com UVA, o bloqueio dos transportadores ABCB1 ou ABCC1, em espermatozoides exposto à UVB, não alterou o desenvolvimento embrionário inicial nos estágios monitorados, sugerindo que os transportadores ABC não estejam envolvidos na proteção dos gametas masculinos contra os efeitos deletérios da UVB (gráficos 14C-D). No entanto, o tratamento de óvulos ou zigotos com os bloqueadores, e a posterior exposição à UVB, inibiu o desenvolvimento embrionário. O tratamento com MK571 aumentou a sensibilidade dos óvulos a todas as doses de UVB analisadas. Este efeito foi maior quando comparado ao efeito promovido pelo tratamento com REV205, destacando o papel do transportador ABCC1 na proteção contra os efeitos deletérios da UVB em óvulos (gráficos 15C-D). De maneira oposta, o tratamento de zigotos com REV205 foi mais eficiente na reversão da resistência à UVB,

demonstrando que a proteína ABCB1 apresenta um papel protetor mais relevante do que a proteína ABCC1 contra os efeitos deletérios da UVB em células embrionárias (gráficos 16C-D)

Em resumo, esses dados mostram um papel protetor diferencial dos transportadores ABC entre óvulos e zigotos de *E. lucunter*. Esse resultado pode ser explicado por uma provável expressão diferencial dos transportadores ABCB1 e ABCC1 em óvulos e zigotos, onde os óvulos apresentariam uma predominância do transportador ABCC1 enquanto que os zigotos apresentariam uma maior predominância do transportador ABCB1.

Adicionalmente, avaliamos o efeito fotoprotetor dos transportadores ABC sobre o desenvolvimento larval. O tratamento com REV205 ou MK571 induziu atrasos e malformações no desenvolvimento das larvas derivadas de espermatozoides expostos à UVB (figura 34). Esse resultado mostra que, embora o bloqueio da atividade dos transportadores ABCB1 e ABCC1 em espermatozoides não comprometa o desenvolvimento embrionário inicial, os prováveis danos provocados por este bloqueio repercutem tardiamente no desenvolvimento. Efeitos semelhantes foram obtidos quando os óvulos foram tratados com REV205 ou MK571 e posteriormente expostos à UVB. Em contraste, o tratamento de zigotos com ambos os bloqueadores e a exposição à UVB não afetou o desenvolvimento larval, demonstrando que apesar do transportador ABCB1 apresentar uma ação fotoprotetora para o desenvolvimento embrionário inicial, esse papel não é relevante para o desenvolvimento tardio. O mesmo resultado foi obtido no desenvolvimento larval derivado de embriões no estágio de prisma submetidos ao tratamento com os bloqueadores de transportadores ABC e à irradiação com UVB.

Um mecanismo que pode explicar o efeito fotoprotetor de transportadores ABC de gametas e embriões sobre o desenvolvimento embrionário inicial e larval de *E. lucunter* é a via da esfingomielinase. A radiação ultravioleta pode promover a morte celular por apoptose ao induzir a ativação da esfingomielinase, enzima responsável pela conversão da esfingomielina em ceramida, um lipídio pró-apoptótico (ZHANG et al., 2001). Os transportadores ABC estão envolvidos na translocação da esfingomielina da monocamada citosólica para a monocamada exoplasmática da membrana, diminuindo, assim, os níveis de esfingomielina disponíveis para reação enzimática mediada pela esfingomielinase citosólica (AYE et al., 2009), e prevenindo, desta forma, a indução da apoptose (VAN HELVOORT et

al., 1997; RAGGERS et al., 1999; ECKFORD;SHAROM, 2005). A geração de ceramida tem, como consequência, a ativação da caspase-3, uma protease que é um dos principais agentes efetores da apoptose (PETTUS et al., 2002). Johnstone e colaboradores (1999) demonstraram que o transportador ABCB1 protege células leucêmicas da linhagem CEM-CCRF da apoptose dependente de caspase.

No entanto, alguns trabalhos mostram que a apoptose não ocorre durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Thurber e Epel (2007) demonstraram que, durante o desenvolvimento embrionário, a apoptose raramente ocorre até os estágios de blástula e gástrula de *S. purpuratus*. Adicionalmente, Veja e Epel (2004) mostraram que a apoptose também não ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar submetidos a estresse químico. Em contraste, Voronina e Wessel (2001) relataram o processo de apoptose em oócitos, óvulos e embriões no estágio inicial do desenvolvimento embrionário de *L. Variegatus* sob condições de estresse químico. Devido a essa contradição na literatura, estudos posteriores precisam ser realizados para investigar se os efeitos deletérios da radiação UV e o mecanismo protetor dos transportadores ABC estão relacionados com a indução da apoptose em *E. lucunter*. Além disso, estudos adicionais precisam ser conduzidos para investigar a participação da via da esfingomielina/ceramida nesse processo.

A atividade de transportadores ABC em embriões de ouriços-do-mar aumenta, expressivamente, a partir de 25 minutos após a fertilização (HAMDOUN, A. M. et al., 2004; DE SOUZA et al., 2010). Portanto, para confirmar o envolvimento dos transportadores ABC na proteção contra os efeitos deletérios da UVB, os zigotos foram irradiados 10 ou 40 minutos após a fertilização. A UVB inibiu a progressão para a primeira clivagem apenas quando os zigotos foram irradiados 10 minutos após a fertilização. Os efeitos negativos sobre o estágio de primeira clivagem não foram observados quando os zigotos foram irradiados após o estabelecimento da atividade máxima dos transportadores ABC (gráfico 17). Entretanto, quando os zigotos foram tratados com REV205 e MK571 e irradiados, 40 minutos após a fertilização, a resistência à UVB diminuiu, uma vez que a progressão para os estágios de primeira e segunda clivagem foi parcialmente bloqueada (gráfico 18). O conjunto desses resultados demonstra que a REV205 e o MK571 podem reverter a resistência dos zigotos, à UVB, até mesmo quando os transportadores ABC estão plenamente ativos. Portanto, os dados aqui apresentados sugerem que a

resistência aos efeitos deletérios da UVB em óvulos e zigotos de *E. lucunter* está fortemente associada à atividade dos transportadores ABC, ressaltando a relevância biológica desta família de proteínas para o desenvolvimento embrionário.

A partir do ensaio de acúmulo intracelular de calceína (gráfico 20) e da investigação da resistência à vimblastina, mediada pelos transportadores ABC (gráfico 21), foi demonstrada que a atividade dessas proteínas não é afetada pela UVB. Não houve alterações nos níveis de fluorescência intracelular de calceína das células embrionárias irradiadas, independente do protocolo de irradiação (irradiação dos óvulos ou irradiação dos zigotos). A exposição dos óvulos ou zigotos à UVB também não reverteu a resistência à vimblastina. Esses resultados divergem dos obtidos por Dumitriu e colaboradores (2004), que relataram a inibição da atividade dos transportadores ABC em células mononucleares sanguíneas expostas a doses de UVB a partir de $0,6 \text{ kJ m}^{-2}$. Os autores investigaram a atividade dos transportadores ABC por meio do ensaio de acúmulo intracelular da carboxifluoresceína succinimida, um substrato fluorescente aniônico que é transportado por diversas proteínas. Portanto, a divergência nos resultados pode ser explicada pela inespecificidade da sonda utilizada, uma vez que a carboxifluoresceína succinimida, ao contrário da C-AM, que é transportada especificamente pelos transportadores ABCB1 e ABCC1, reflete a atividade de vários tipos de transportadores (HOMOLYA et al., 1993; HOLLO et al., 1994).

O fato de gametas e células embrionárias de *E. lucunter* serem sensíveis à UVB, além de apresentarem uma marcante atividade de transportadores ABC, abre a possibilidade da utilização desses animais como modelo biológico para a prospecção de fármacos fotoativos, assim como moduladores de proteínas ABC, e, conseqüentemente, do fenótipo MDR.

A exposição excessiva à radiação UV pode causar graves patologias, tais como: câncer de pele (SETLOW et al., 1993), imunossupressão (HALLIDAY et al., 1998), e cegueira (VERHOEFF, 1916), entre outras. Nas últimas décadas, tem surgido um grande interesse na utilização de substâncias que podem ser empregadas na prevenção dos danos provocados pelo contato excessivo com a radiação UV. A busca por novos fármacos com propriedades fotoativas e que desenvolvam menos efeitos tóxicos é constante, e os produtos de origem natural são as principais opções nessa linha de pesquisa (NICHOLS;KATIYAR, 2010).

O fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) é um fator limitante para o desenvolvimento de novos fármacos na área de oncofarmacologia e antimicrobianos, tendo em vista que esse fenômeno é o principal responsável pela falência terapêutica no tratamento de tumores e infecções por microrganismos (JAEGER, 2009). Os transportadores ABCB1 e ABCC1 são as principais proteínas relacionadas ao fenótipo MDR (JULIANO;LING, 1976; COLE et al., 1992). Durante as últimas décadas houve uma incessante busca pela descoberta ou síntese de bloqueadores de transportadores ABC que possam ser utilizados na clínica (PONTE-SUCRE, 2007). Infelizmente, o progresso nessa área tem sido lento e os compostos descobertos ou sintetizados não foram inseridos no uso clínico, pois apresentaram uma elevada toxicidade em células normais durante os ensaios clínicos (SHEPS;LING, 2007).

Com base no exposto acima, o próximo passo do presente trabalho foi investigar a fotoatividade e a atividade moduladora de transportadores ABC da cumarina e alguns de seus derivados sintéticos (1-7). Os compostos cumarínicos são metabólitos secundários amplamente encontrados em plantas, bactérias e fungos (HOULT;PAYA, 1996; KAWASE et al., 2001; KANEKO et al., 2003). As propriedades fotoativas de alguns derivados cumarínicos já foram relatadas. É o caso das furanocumarinas que apresentaram uma atividade fotoprotetora em linhagens de *Staphylococcus aureus* expostas à UVC (BARRETO;SIQUEIRA-JUNIOR, 1998). No entanto, não há relatos na literatura de trabalhos investigando a fotoproteção nem a atividade bloqueadora de transportadores ABC dos compostos 1-7.

Todos os compostos apresentaram uma marcante embriotoxicidade, uma vez que inibiram as primeiras divisões celulares, e a progressão para o estágio de mórula, em concentrações a partir 5 μM (gráfico 21). De acordo com nossa pesquisa bibliográfica, não há relatos sobre o efeito embriotóxico dos compostos 2-7. Em contraste, Weigt e colaboradores (2012) demonstraram que a cumarina apresentou um efeito letal e teratogênico em embriões de *zebrafish*, onde a CE_{50} foi de 314 μM . Fort e colaboradores (1998) também demonstraram uma atividade embriotóxica da cumarina em *Xenopus laevis*, com uma CE_{50} de 547 μM . O desenvolvimento embrionário de *E. lucunter* foi marcadamente mais sensível à cumarina que o desenvolvimento de *zebrafish* ou de *X. laevis*, uma vez que os valores de CE_{50} para a inibição do estágio de primeira clivagem foi de 52,9 μM . A cumarina já foi objeto de

estudos clínicos para o tratamento de melanomas devido às suas propriedades citotóxicas (PEDERSEN et al., 1987).

Os derivados cumarínicos (**2-7**) bloquearam a primeira divisão celular de forma mais efetiva que a cumarina, apresentando valores de CE_{50} cerca de dez vezes menores. Análises da relação estrutura-atividade dos compostos **1-7** revelaram que a adição de uma hidroxila nas posições 3, 4, 6 ou 7 aumentou o efeito antimitótico dessa classe. A posição da hidroxila nos isômeros posicionais não influenciou a atividade farmacológica dos compostos. Além disso, a adição de duas hidroxilas nas posições 6 e 7 (**6** – dihidroxicumarina) ou a adição de um grupo metoxi e uma hidroxila nas posições 6 e 7, respectivamente (**7** – 6-metoxi-7-hidroxicumarina) também aumentou o efeito antimitótico comparado com a cumarina (**1**). Esses dados são corroborados pelo estudo de Arora e colaboradores (1963) que demonstraram que os grupos substituintes no anel cumarínico modificam notavelmente a reatividade química da molécula. Jimenez-Orozco e colaboradores (2011) também verificaram que a presença de grupos substituintes é importante para a potência da atividade citotóxica. Diante dessas informações nós sugerimos que a hidroxila ou o grupo metoxi aumentou a afinidade da cumarina a seu alvo molecular, aumentando assim o efeito citotóxico.

Os derivados **3-7** não apresentaram fotoatividade em zigotos de *E. lucunter* expostos à UVB. Em contraste, a cumarina e a 3-hidroxicumarina apresentaram uma relevante atividade fotoprotetora sobre espermatozoides, óvulos e zigotos expostos à UVB (gráfico 22). O tratamento de gametas e zigotos com ambos os compostos restaurou o percentual de primeira clivagem em relação ao grupo irradiado e não tratado (gráficos 22 e 24). No entanto, o efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxicumarina só foi observado quando o tratamento com ambos os compostos foi realizado previamente à irradiação (gráficos 22 e 24 versus gráficos 23 e 25). Esses dados são de grande relevância farmacológica, uma vez que constitui o primeiro relato direto sobre a atividade fotoprotetora da cumarina e da 3-hidroxicumarina sobre os efeitos deletérios da UVB. Esses dados despertam, também, um grande interesse clínico e terapêutico, pois compostos com tais propriedades podem ser empregados tanto no tratamento contra carcinomas de pele dos tipos melanomas e não melanomas, quanto na prevenção dos efeitos danosos da radiação solar.

Apesar de não haver, na literatura científica, relatos da atividade fotoprotetora dos compostos supracitados, outros compostos de origem natural tiveram suas

fotoatividades investigadas. Pérez-Sánchez e colaboradores (2014) demonstraram a atividade fotoprotetora de flavonoides em queratinócitos humanos expostos à UVB (0,8 ou 1,2 kJ m⁻²), relacionado tal efeito com a atividade antioxidante e a consequente diminuição nos níveis de ROS. Fernández-garcia (2014) demonstrou a atividade fotoprotetora de carotenoides e flavonoides em fibroblastos humanos expostos à UVA, atribuindo a atividade fotoprotetora à diminuição do estresse oxidativo.

O efeito fotoprotetor da cumarina e da 3-hidroxicumarina não parece estar relacionado à depuração de ROS, pois a fotoproteção não é obtida quando o tratamento com os compostos é realizado após a irradiação com a UVB.

Uma vez que a cumarina e a 3-hidroxicumarina apresentaram um efeito fotoprotetor contra os danos induzidos pela UVB e que os transportadores ABC estão envolvidos na fotoproteção, decidimos investigar se o efeito fotoprotetor dos compostos supracitados estaria relacionado com o bloqueio da atividade dos transportadores. A cumarina não apresentou efeito sobre a atividade dos transportadores ABC; entretanto, a 3-hidroxicumarina bloqueou a atividade dos transportadores ABC, uma vez que o composto, na concentração de 1 µM, aumentou o nível de fluorescência intracelular da calceína e diminuiu a resistência à vimblastina, comparado ao grupo controle (gráfico 26).

A caracterização do bloqueio da atividade dos transportadores ABC pela 3-hidroxicumarina representa um grande achado farmacológico, uma vez que esse composto pode ser utilizado, em associação com drogas antitumorais ou antibacterianas, para a reversão do fenótipo MDR, principalmente pelo mesmo ter apresentado efeito inibitório sobre o desenvolvimento embrionário, o que pode estar correlacionado a uma potencial atividade antimitótica.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o efeito fotoprotetor dos compostos cumarínicos não está correlacionado ao bloqueio dos transportadores ABCB1 e ABCC1, uma vez que a cumarina reverteu os efeitos deletérios da UVB, apesar de não inibir a atividade dos transportadores supracitados. Entretanto, não podemos descartar o efeito da cumarina sobre outros tipos de transportadores ABC. Apesar da 3-hidroxicumarina bloquear a atividade dos transportadores ABC, como a REV 205 e o MK571, esse composto apresentou um efeito fotoprotetor e isto pode ser atribuído ao predomínio da sua capacidade de absorção da radiação UV, conforme demonstrado pelo estudo de Goodwin e Pollock

(1954). Esses autores publicaram uma lista de 29 compostos cumarínicos, entre eles a cumarina e a 3-hidroxicumarina, que apresentam a propriedade de absorver a radiação ultravioleta na faixa da UVB. Essa hipótese ainda é reforçada por outros trabalhos mais recentes. Donovalová e colaboradores (2012) identificaram o espectro de absorção de UVB de oito derivados cumarínicos. Bai e colaboradores (2014) mostraram que o derivado 6-fluorcumarina absorve radiação UV no comprimento de onda de 319 nm, correspondente ao espectro da UVB.

Em resumo, o presente trabalho descreve, de forma inédita, o papel fotoprotetor de transportadores ABC em gametas e células embrionárias de ouriço-do-mar. Esse estudo contribui para a elucidação do papel biológico dessas proteínas, que tem sido alvo de estudos desde o final do século passado. Além disso, relatamos, aqui, um importante papel da 3-hidroxicumarina na inibição de transportadores ABC, além da atividade fotoprotetora da cumarina e da 3-hidroxicumarina contra os efeitos deletérios da UVB. Esses resultados contribuem para o conhecimento a cerca das propriedades farmacológicas desses compostos e legitima o desenvolvimento embrionário de ouriços-do-mar como um excelente modelo experimental para prospecção de produtos, naturais ou sintéticos, com atividade fotoativas ou bloqueadoras de transportadores ABC.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que: os transportadores ABC apresentaram um relevante papel fotoprotetor contra os efeitos deletérios da UVB e por isso constituem um importante alvo molecular para estudos sobre o efeito da radiação UVB em diversos modelos biológicos; a cumarina e a 3-hidroxycumarina exibiram um importante efeito fotoprotetor contra os danos induzidos pela UVB em gametas e zigotos de ouriços-do-mar, tornando-se alternativas terapêuticas para o tratamento de diversas patologias relacionadas à exposição excessiva à UVB; e a 3-hidroxycumarina apresentou uma atividade bloqueadora de transportadores ABC oferecendo, assim, uma alternativa farmacológica para a reversão clínica do fenótipo MDR.

Referências

- ADAMS, N. L. ; SHICK, J. M. Mycosporine-like amino acids prevent UVB-induced abnormalities during early development of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Biology* **2**:267-280, 2001.
- AFAQ, F.; ADHAMI, V. M. ; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res* **1-2**:153-73, 2005.
- AGCA, C.; KLEIN, W. H. ; VENUTI, J. M. Reduced O₂ and elevated ROS in sea urchin embryos leads to defects in ectoderm differentiation. *Dev Dyn* **7**:1777-87, 2009.
- AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D. et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology Reproduction* 1037–1046, 1998.
- AKIMOTO, Y. ; SHIROYA, T. Photoreversal of Abnormal Morphogenesis in Sea-Urchin Embryos Caused by Uv-Irradiation. *Photochemistry and Photobiology* **3**:407-412, 1987a.
- AKIMOTO, Y. ; SHIROYA, T. Photoreversibility of Uv-Induced Thymine Dimers and Abnormal Morphogenesis in Sea-Urchin Embryos. *Photochemistry and Photobiology* **3**:403-406, 1987b.
- AKIMOTO, Y.; SHIROYA, T. ; EGAMI, N. Abnormal morphogenesis of sea urchin embryo induced by UV partial irradiation given at cleavage stage. *Journal of Radiation Research* **3**:197-202, 1983.
- ALLER, S. G.; YU, J.; WARD, A. et al. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **323**:1718-1722, 2009.
- AMANO, Y.; KOMIYAMA, K. ; MAKISHIMA, M. Vitamin D and periodontal disease. *J Oral Sci* **1**:11-20, 2009.
- AMEMIYA, S.; YONEMURA, S.; KINOSHITA, S. et al. Biphasic stage sensitivity to UV suppression of gastrulation in sea urchin embryos. *Cell Differentiation*:45-49, 1986.
- ARORA, R. B. ; MATHUR, C. N. Relationship between structure and anticoagulant activity of coumarin derivatives. *Br J Pharmacol Chemother* **1**:29-35, 1963.
- AU, D. W. T.; CHIANG, M. W. L.; TANG, J. Y. M. et al. Impairment of sea urchin sperm quality by UV-B radiation: Predicting fertilization success from sperm motility. *Marine Pollution Bulletin* **7**:583-589, 2002.
- AUBERT, C.; VOS, M. H.; MATHIS, P. et al. Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* **6786**:586-90, 2000.
- AUDISIO, D.; MESSAOUDI, S.; IJJAALI, I. et al. Assessing the chemical diversity of an hsp90 database. *Eur J Med Chem* **5**:2000-9, 2010.
- AYE, I. L.; SINGH, A. T. ; KEELAN, J. A. Transport of lipids by ABC proteins: interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. *Chem Biol Interact* **3**:327-39, 2009.

- BABAKHANI, K.; BENDAYAN, M.; BENDAYAN, R. Localization of P-glycoprotein at the nuclear envelope of rat brain cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2**:301-6, 2007.
- BACCARD, N.; MECHICHE, H.; NAZEYROLLAS, P. et al. Effects of 7-hydroxycoumarin (umbelliferone) on isolated perfused and ischemic-reperfused rat heart. *Arzneimittelforschung* **10**:890-6, 2000.
- BAI, Y.; DU, J.; WENG, X. Synthesis, characterization, optical properties and theoretical calculations of 6-fluoro coumarin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*:14-20, 2014.
- BAILLY, F.; MAURIN, C.; TEISSIER, E. et al. Antioxidant properties of 3-hydroxycoumarin derivatives. *Bioorg Med Chem* **21**:5611-8, 2004.
- BARRETO, H. M.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P. Uma breve revisão sobre a reação das furocumarinas com o DNA na presença de luz ultravioleta longa. *Paradigmas* **11**:25-43, 1998.
- BEILLEROT, A.; DOMINGUEZ, J. C.; KIRSCH, G. et al. Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **3**:1102-5, 2008.
- BIANCIOTTO, O. A.; PINEDO, L. B.; SAN ROMAN, N. A. et al. The effect of natural UV-B radiation on a perennial Salicornia salt-marsh in Bahia San Sebastian, Tierra del Fuego, Argentina: a 3-year field study. *J Photochem Photobiol B* **3**:177-85, 2003.
- BIEDLER, J. L.; RIEHM, H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res* **4**:1174-84, 1970.
- BIGGS, L.; YU, C.; FEDORIC, B. et al. Evidence that vitamin D(3) promotes mast cell-dependent reduction of chronic UVB-induced skin pathology in mice. *J Exp Med* **3**:455-63, 2010.
- BISCHOF, K.; GOMEZ, I.; MOLIS, M. et al. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Rev Environ Sci Biotechnol* **5**:141-166, 2006.
- BONAVENTURA, R.; POMA, V.; COSTA, C. et al. UVB radiation prevents skeleton growth and stimulates the expression of stress markers in sea urchin embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1**:150-157, 2005.
- BONAVENTURA, R.; POMA, V.; RUSSO, R. et al. Effects of UV-B radiation on development and hsp70 expression in sea urchin cleavage embryos. *Marine Biology* **1**:79-86, 2006.
- BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M. et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **16**:1295-302, 2000.

- BOSNJAK, I.; UHLINGER, K. R.; HEIM, W. et al. Multidrug efflux transporters limit accumulation of inorganic, but not organic, mercury in sea urchin embryos. *Environ Sci Technol* **21**:8374-80, 2009.
- BOSSI, O.; GARTSBEIN, M.; LEITGES, M. et al. UV irradiation increases ROS production via PKCdelta signaling in primary murine fibroblasts. *J Cell Biochem* **1**:194-207, 2008.
- BRIGGS, E. ; WESSEL, G. M. In the beginning...animal fertilization and sea urchin development. *Dev Biol* **1**:15-26, 2006.
- BUCOLO, C.; MALTESE, A.; MAUGERI, F. et al. New coumarin-based anti-inflammatory drug: putative antagonist of the integrins alphaLbeta2 and alphaMbeta2. *J Pharm Pharmacol* **11**:1473-9, 2008.
- BURKE, M. A. ; ARDEHALI, H. Mitochondrial ATP-binding cassette proteins. *Transl Res* **2**:73-80, 2007.
- CALDWELL, M. M.; BJÖRN, L. O.; BORNMAN, J. F. et al. Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1-3**:40-52, 1998.
- CALDWELL, M. M.; TERAMURA, A. H. ; TEVINI, M. The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends Ecol Evol* **12**:363-7, 1989.
- CAMPANALE, J. P.; TOMANEK, L. ; ADAMS, N. L. Exposure to ultraviolet radiation causes proteomic changes in embryos of the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **2**:106-120, 2011.
- CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M. et al. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *Farmaco* **8**:526-34, 2000.
- 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* **8**:168-171, 2008.
- CHALMERS, A. H.; LAVIN, M.; ATISOONTORNKUL, S. et al. Resistance of human melanoma cells to ultraviolet radiation. *Cancer Res* **6**:1930-4, 1976.
- CHAO, C. C. ; SUN, N. K. Overexpression of a UV-damage recognition protein in a UV-sensitive human colon cancer cell line that features multidrug-resistant phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* **3**:1252-60, 1993.
- CHILDS, S. ; LING, V. The MDR superfamily of genes and its biological implications. *Important Adv Oncol*:21-36, 1994.
- COLE, S. P.; BHARDWAJ, G.; GERLACH, J. H. et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **5088**:1650-4, 1992.

COLWIN, L. H. ; COLWIN, A. L. Role of the Gamete Membranes in Fertilization in *Saccoglossus Kowalevskii* (Enteropneusta). Ii. Zygote Formation by Gamete Membrane Fusion. *Journal of Cell Biology*:501-18, 1963.

CONWAY, C. M.; IGELSRUD, D. ; CONWAY, A. F. Sea urchin Development *Tested studies for laboratory teaching*. New York, 1981. Cap.4.

COOPER, K. L.; LIU, K. J. ; HUDSON, L. G. Enhanced ROS production and redox signaling with combined arsenite and UVA exposure: contribution of NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med* **4**:381-8, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V.; FERREIRA, M. A.; LEMOS, T. L. et al. Toxicity to sea urchin egg development of the quinone fraction obtained from *Auxemma oncocalyx*. *Braz J Med Biol Res* **8**:927-30, 2002.

DAHMS, H. U. ; LEE, J. S. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology* **1**:3-14, 2010.

DAN-SOHWAKAWA, M. ; FUJISAWA, H. Cell dynamics of the blastulation process in the starfish, *Asterina pectinifera*. *Dev Biol* **2**:328-39, 1980.

DAN, J. C. Studies on the acrosome. I. Reaction to egg-water and other stimuli. *Biol Bull* **103**:335-349, 1952.

DANTZIG, A. H.; DE ALWIS, D. P. ; BURGESS, M. Considerations in the design and development of transport inhibitors as adjuncts to drug therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **1**:133-50, 2003.

DAVID, C.; HALLIWELL, J. ; WHITAKER, M. Some properties of the membrane currents underlying the fertilization potential in sea urchin eggs. *J Physiol*:139-54, 1988.

DE FARIA, M. T. ; DA SILVA, J. R. Innate immune response in the sea urchin *Echinometra lucunter* (Echinodermata). *J Invertebr Pathol* **1**:58-62, 2008.

DE SOUZA, M. Q.; BARROS, T. V.; TORREZAN, E. et al. Characterization of functional activity of ABCB1 and ABCC1 proteins in eggs and embryonic cells of the sea urchin *Echinometra lucunter*. *Biosci Rep* **4**:257-65, 2010.

DEAN, M.; RZHETSKY, A. ; ALLIKMETS, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **7**:1156-66, 2001.

DEY, S.; RAMACHANDRA, M.; PASTAN, I. et al. Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **20**:10594-9, 1997.

DIAZ, S.; CAMILION, C.; DEFERRARI, G. et al. Ozone and UV radiation over southern South America: climatology and anomalies. *Photochemistry and Photobiology* **4**:834-43, 2006.

DIFFEY, B. L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Phys Med Biol* **3**:299-328, 1991.

DIFFEY, B. L. What is light? *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **2**:68-74, 2002.

DONG, Q.; SVOBODA, K.; TIERSCH, T. R. et al. Photobiological effects of UVA and UVB light in zebrafish embryos: evidence for a competent photorepair system. *J Photochem Photobiol B* **2-3**:137-46, 2007.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N. ; LEWIS, S. E. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis* **1**:61-8, 2000.

DONOVALOVA, J.; CIGAN, M.; STANKOVICOVA, H. et al. Spectral properties of substituted coumarins in solution and polymer matrices. *Molecules* **3**:3259-76, 2012.

DU, L.; LI, M.; ZHENG, S. et al. Rational Design of a Fluorescent Hydrogen Peroxide Probe Based on the Umbelliferone Fluorophore. *Tetrahedron Letters* **19**:3045-3048, 2008.

DUMITRIU, I. E.; VOLL, R. E.; KOLOWOS, W. et al. UV irradiation inhibits ABC transporters via generation of ADP-ribose by concerted action of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and glycohydrolase. *Cell Death Differ* **3**:314-20, 2004.

DUNLAP, W. C. ; YAMAMOTO, Y. Small-Molecule Antioxidants in Marine Organisms - Antioxidant Activity of Mycosporine-Glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **1**:105-114, 1995.

ECKFORD, P. D. ; SHAROM, F. J. The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids. *Biochem J* **Pt 2**:517-26, 2005.

EPEL, D.; LUCKENBACH, T.; STEVENSON, C. N. et al. Efflux transporters: Newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environ Sci Technol* **11**:3914-3920, 2008.

EPEL, D.; PATTON, C.; WALLACE, R. W. et al. Calmodulin activates NAD kinase of sea urchin eggs: an early event of fertilization. *Cell* **2**:543-9, 1981.

ERNST, S. G. A century of sea urchin development. *American Zoologist* **37**:250-259, 1997.

ESSEN, L. O. ; KLAR, T. Light-driven DNA repair by photolyases. *Cell Mol Life Sci* **11**:1266-77, 2006.

ESSODAIGUI, M.; BROXTERMAN, H. J. ; GARNIER-SUILLEROT, A. Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein. *Biochemistry* **8**:2243-50, 1998.

EVANS, T.; ROSENTHAL, E. T.; YOUNGBLOM, J. et al. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **2**:389-96, 1983.

FARIA, M.; NAVARRO, A.; LUCKENBACH, T. et al. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel

- (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquatic Toxicology* **1**:78-87, 2011.
- FARMAN, J. C.; GARDINER, B. G. ; SHANKLIN, J. B. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. *Nature*:207-210, 1985.
- FELTER, S. P.; VASSALLO, J. D.; CARLTON, B. D. et al. A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. *Food Chem Toxicol* **4**:462-75, 2006.
- FERNANDEZ-GARCIA, E. Photoprotection of human dermal fibroblasts against ultraviolet light by antioxidant combinations present in tomato. *Food Funct* **2**:285-90, 2014.
- FISCHER, S.; KLUVER, N.; BURKHARDT-MEDICKE, K. et al. Abcb4 acts as multixenobiotic transporter and active barrier against chemical uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *BMC Biol*:69, 2013.
- FOJO, A.; LEBO, R.; SHIMIZU, N. et al. Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7. *Somat Cell Mol Genet* **4**:415-20, 1986.
- FORT, D. J.; STOVER, E. L.; PROPST, T. et al. Evaluation of the developmental toxicities of coumarin, 4-hydroxycoumarin, and 7-hydroxycoumarin using FETAX. *Drug Chem Toxicol* **1**:15-26, 1998.
- FREDERICK, J. E.; SNELL, H. E. ; HAYWOOD, E. K. Solar ultraviolet radiation at the earth's surface. *Photochemistry and Photobiology* **4**:443 - 447, 1989.
- 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. *Br J Pharmacol* **6**:1327-34, 1996.
- FUJIHASHI, M.; NUMOTO, N.; KOBAYASHI, Y. et al. Crystal structure of archaeal photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with two FAD molecules: implication of a novel light-harvesting cofactor. *J Mol Biol* **4**:903-10, 2007.
- FYLAKTAKIDOU, K. C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; LITINAS, K. E. et al. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Curr Pharm Des* **30**:3813-33, 2004.
- GEKELER, V.; ISE, W.; SANDERS, K. H. et al. The leukotriene LTD₄ receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* **1**:345-52, 1995.
- GERHART, J.; WU, M. ; KIRSCHNER, M. Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *Journal of Cell Biology* **4**:1247-55, 1984.
- GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; VEITCH, N. C. et al. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*. *Phytochemistry* **1**:83-7, 2003.

GILBERT, S. F. Fertilization: Beginning a new organism. In: GILBERT, S. F. (Ed.). *Developmental Biology*. Sunderland, MA: 6^a ed, 2000. Cap.7.

GLABE, C. G. ; LENNARZ, W. J. Species-specific sperm adhesion in sea urchins. A quantitative investigation of bindin-mediated egg agglutination. *Journal of Cell Biology* **3**:595-604, 1979.

GLABE, C. G. ; VACQUIER, V. D. Egg surface glycoprotein receptor for sea urchin sperm bindin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2**:881-5, 1978.

GOKIRMAK, T.; CAMPANALE, J. P.; SHIPP, L. E. et al. Localization and substrate selectivity of sea urchin multidrug (MDR) efflux transporters. *J Biol Chem* **52**:43876-83, 2012.

GOLDSTONE, J. V.; HAMDOUN, A.; COLE, B. J. et al. The chemical defensome: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Dev Biol* **1**:366-84, 2006.

GOODWIN, R. H. ; POLLOCK, B. M. Ultraviolet absorption spectra of coumarin derivatives. *Arch Biochem Biophys* **1**:1-6, 1954.

GOTOH, T.; SHIGEMOTO, N. ; KISHIMOTO, T. Cyclin E2 is required for embryogenesis in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* **2**:341-7, 2007.

GOTTESMAN, M. M. ; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*:385-427, 1993.

GRAINGER, J. L.; WINKLER, M. M.; SHEN, S. S. et al. Intracellular pH controls protein synthesis rate in the sea urchine egg and early embryo. *Dev Biol* **2**:396-406, 1979.

HADER, D. P.; KUMAR, H. D.; SMITH, R. C. et al. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences* **3**:267-285, 2007.

HALLIDAY, G. M.; BESTAK, R.; YUEN, K. S. et al. UVA-induced immunosuppression. *Mutat Res* **1**:139-45, 1998.

HAMDOUN, A. ; EPEL, D. Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proc Natl Acad Sci U S A* **6**:1745-1750, 2007.

HAMDOUN, A.; HODIN, J.; SMITAL, T. et al. Developmental regulation of multidrug efflux transporter activity in echinoderm embryos. *Integrative and Comparative Biology* **6**:703-703, 2004.

HAMDOUN, A. M.; CHERR, G. N.; ROEPKE, T. A. et al. Activation of multidrug efflux transporter activity at fertilization in sea urchin embryos (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Dev Biol* **2**:452-462, 2004.

HASEGAWA, T.; KANEKO, F. ; NIWA, Y. Changes in lipid peroxide levels and activity of reactive oxygen scavenging enzymes in skin, serum and liver following UVB irradiation in mice. *Life Sciences* **24**:1893-903, 1992.

HE, Y. Y.; KLISCH, M. ; HADER, D. P. Adaptation of cyanobacteria to UV-B stress correlated with oxidative stress and oxidative damage. *Photochemistry and Photobiology* **2**:188-96, 2002.

HERTWING, O. Beitrilge zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies. *Morph JB* **1**:347-432, 1876.

HIDEG, E.; JANSEN, M. A. ; STRID, A. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? *Trends Plant Sci* **2**:107-15, 2013.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*:67-113, 1992.

HIGGINS, C. F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **7137**:749-57, 2007.

HILL, H. Z.; HILL, G. J.; CIESZKA, K. et al. A multitherapy resistance factor from melanoma reveals that killing by near UV is different from genotoxic agents. *Photochemistry and Photobiology* **5**:479-83, 1995.

HINEGARDNER, R. T. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *Biological Bulletin* **3**:465-75, 1969.

HOCKBERGER, P. E. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. *Photochemistry and Photobiology* **6**:561-79, 2002.

HOERTER, J. D.; WARD, C. S.; BALE, K. D. et al. Effect of UVA fluence rate on indicators of oxidative stress in human dermal fibroblasts. *Int J Biol Sci* **2**:63-70, 2008.

HOLLO, Z.; HOMOLYA, L.; DAVIS, C. W. et al. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta* **2**:384-8, 1994.

HOLLOSY, F. Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* **2**:179-97, 2002.

HOMOLYA, L.; HOLLO, Z.; GERMANN, U. A. et al. Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. *J Biol Chem* **29**:21493-6, 1993.

HOULT, J. R. ; PAYA, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol* **4**:713-22, 1996.

HU, Z.; JIN, S. ; SCOTTO, K. W. Transcriptional activation of the MDR1 gene by UV irradiation. Role of NF-Y and Sp1. *J Biol Chem* **4**:2979-85, 2000.

INCA. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>. acessado em 25/06/2014.

INPE. www.inpe.br. Acessado em 15/05/2014.

- ISELY, N.; LAMARE, M.; MARSHALL, C. et al. Expression of the DNA Repair Enzyme, Photolyase, in Developmental Tissues and Larvae, and in Response to Ambient UV-R in the Antarctic Sea Urchin *Sterechinus neumayeri*. *Photochemistry and Photobiology* **5**:1168-1176, 2009.
- JAEGER, W. Classical resistance mechanisms. *Int J Clin Pharmacol Ther* **1**:46-8, 2009.
- JEDLITSCHKY, G.; LEIER, I.; BUCHHOLZ, U. et al. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J*:305-10, 1997.
- JIMENEZ-OROZCO, F. A.; ROSALES, A. A.; VEGA-LOPEZ, A. et al. Differential effects of esculetin and daphnetin on in vitro cell proliferation and in vivo estrogenicity. *Eur J Pharmacol* **1-2**:35-41, 2011.
- JOHANSSON, G. ; SNOEIJIS, P. Macroalgal photosynthetic responses to light in relation to thallus morphology and depth zonation. *Mar Ecol: Prog Ser* **244**:63-72, 2002.
- JOHNSTONE, R. W.; CRETNEY, E. ; SMYTH, M. J. P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood* **3**:1075-85, 1999.
- JULIANO, R. L. ; LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **1**:152-62, 1976.
- KADOKAWA, Y.; DAN-SOHKAWA, M. ; EGUCHI, G. Studies on the mechanism of blastula formation in starfish embryos denuded of fertilization membrane. *Cell Differ* **2**:79-88, 1986.
- KAIDBEY, K. H. ; KLIGMAN, A. M. Photosensitization by coumarin derivatives. *Arch Dermatol* **5**:258-63, 1981.
- KANEKO, T.; BABA, N. ; MATSUO, M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Chem Biol Interact* **3**:239-54, 2003.
- KAWASE, M.; VARU, B.; SHAH, A. et al. Antimicrobial activity of new coumarin derivatives. *Arzneimittelforschung* **1**:67-71, 2001.
- KIM, S. T. ; SANCAR, A. Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Photochemistry and Photobiology* **5**:895-904, 1993.
- KOFINAS, C.; CHINO, I.; LOUKIS, A. et al. Cytotoxic coumarins from the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line. *Planta Med* **2**:174-6, 1998.
- KUO, M. T. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* **1**:99-133, 2009.

KUSS, B. J.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. et al. Deletion of gene for multidrug resistance in acute myeloid leukaemia with inversion in chromosome 16: prognostic implications. *Lancet* **8912**:1531-4, 1994.

LAGE, H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents* **3**:188-99, 2003.

LEECH, D. M.; PADELETTI, A. ; WILLIAMSON, C. E. Zooplankton behavioral responses to solar UV radiation vary within and among lakes. *J Plankton Res* **27**:461-471, 2005.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U. et al. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem J*:433-7, 1996.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U. et al. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *J Biol Chem* **45**:27807-10, 1994.

LESSER, M. P. Depth-dependent Effects of Ultraviolet Radiation on Survivorship, Oxidative Stress and DNA Damage in Sea Urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) Embryos from the Gulf of Maine. *Photochemistry and Photobiology* **2**:382-388, 2010.

LESSER, M. P. ; BARRY, T. M. Survivorship, development, and DNA damage in echinoderm embryos and larvae exposed to ultraviolet radiation (290-400 nm). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1**:75-91, 2003.

LESSER, M. P.; FARRELL, J. H. ; WALKER, C. W. Oxidative stress, DNA damage and p53 expression in the larvae of atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to ultraviolet (290-400 nm) radiation. *Journal of Experimental Biology* **Pt 1**:157-64, 2001.

LESSER, M. P.; KRUSE, V. A. ; BARRY, T. M. Exposure to ultraviolet radiation causes apoptosis in developing sea urchin embryos. *Journal of Experimental Biology* **22**:4097-4103, 2003.

LEVY, O.; DUBINSKY, Z. ; ACHITUV, Y. Photobehavior of stony corals: responses to light spectra and intensity. *Journal of Experimental Biology* **Pt 22**:4041-9, 2003.

LI, J.; JAIMES, K. F. ; ALLER, S. G. Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Sci* **1**:34-46, 2014.

LI, J.; OU-LEE, T. M.; RABA, R. et al. Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell* **2**:171-179, 1993.

LIMA, E. J.; GOMES, P. B. ; SOUZA, J. R. Reproductive biology of *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) in a northeast Brazilian sandstone reef. *An Acad Bras Cienc* **1**:51-9, 2009.

LISTER, K. N.; LAMARE, M. D. ; BURRITT, D. J. Oxidative damage in response to natural levels of UV-B radiation in larvae of the tropical sea urchin *Tripneustes gratilla*. *Photochemistry and Photobiology* **5**:1091-8, 2010.

- LOO, T. W. ; CLARKE, D. M. Mutational analysis of ABC proteins. *Arch Biochem Biophys* **1**:51-64, 2008.
- LOPES, J. N.; NASI, A. M.; BARROS, D. A. et al. Molluscicidal activity of synthetic derivatives of 2-hydroxyethylphthalimide. *Rev Bras Biol* **3**:635-7, 1980.
- LOPEZ-ONGIL, S.; HERNANDEZ-PERERA, O.; NAVARRO-ANTOLIN, J. et al. Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* **3**:447-54, 1998.
- LU, X. Y. ; WU, R. S. S. Ultraviolet damages sperm mitochondrial function and membrane integrity in the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1**:53-59, 2005a.
- LU, X. Y. ; WU, R. S. S. UV induces reactive oxygen species, damages sperm, and impairs fertilisation in the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *Marine Biology* **1**:51-57, 2005b.
- MARIANTE, F. L. F.; LEMOS, G.; EUTRÓPIO, F. J. et al. Biologia reprodutiva de *Echinometra lucunter* (Echinodermata:echinoidea) na Praia da Costa, Vila Velha, Espírito Santo. *Zoologia* **26**:641-646, 2009.
- MARKO, L.; PARAGH, G.; UGOCSAI, P. et al. Keratinocyte ATP binding cassette transporter expression is regulated by ultraviolet light. *J Photochem Photobiol B*:79-88, 2012.
- MARZOLINI, C.; PAUS, E.; BUCLIN, T. et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* **1**:13-33, 2004.
- MCCULLOH, D. H. ; CHAMBERS, E. L. Fusion of membranes during fertilization. *J Gen Physiol* **99**:137-175, 1999.
- MCKENZIE, R. L.; BJORN, L. O.; BAIS, A. et al. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem Photobiol Sci* **1**:5-15, 2003.
- MENGERINK, K. J. ; VACQUIER, V. D. An ATP-binding cassette transporter is a major glycoprotein of sea urchin sperm membranes. *J Biol Chem* **43**:40729-34, 2002.
- MEVES, F. Verfolgung des sogenannten Mittelstückes des Echinidenspermiums im befruchteten Ei bis zum Ende der ersten Furchungstheilung. . *Arch mikrosk Anat* **80**:81-123, 1912.
- MILITAO, G. C.; PINHEIRO, S. M.; DANTAS, I. N. et al. Bioassay-guided fractionation of pterocarpanes from roots of *Harpalyce brasiliensis* Benth. *Bioorg Med Chem* **21**:6687-91, 2007.
- MIN, Z.; KANG, L.; LIN, L. et al. Resveratrol restores lysophosphatidylcholine-induced loss of endothelium-dependent relaxation in rat aorta tissue coinciding with inhibition of extracellular-signal-regulated protein kinase activation. *Phytother Res* **12**:1762-8, 2010.

- MOLINA, M. J.; TSO, T. L.; MOLINA, L. T. et al. Antarctic stratospheric chemistry of chlorine nitrate, hydrogen chloride, and ice: release of active chlorine. *Science* **4831**:1253-7, 1987.
- MONROY, A. A centennial debt of developmental biology to the sea urchin. *Biol Bull* **171**:509-519, 1986.
- MONTENEGRO, R. C.; JIMENEZ, P. C.; FEIO FARIAS, R. A. et al. Cytotoxic activity of pisosterol, a triterpene isolated from *Pisolithus tinctorius* (Mich.: Pers.) Coker & Couch, 1928. *Z Naturforsch C* **7-8**:519-22, 2004.
- MOREDOCK, S.; NAIRN, R. S.; JOHNSTON, D. A. et al. Mechanisms underlying DNA damage resistance in a *Xiphophorus* melanoma cell line. *Carcinogenesis* **12**:1967-75, 2003.
- NAHON, S.; PORRAS, V. A. C.; PRUSKI, A. M. et al. Sensitivity to UV radiation in early life stages of the Mediterranean sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck). *Science of the Total Environment* **6**:1892-1900, 2009.
- NICHOLS, J. A. ; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res* **2**:71-83, 2010.
- NIES, A. T.; KONIG, J.; PFANNSCHMIDT, M. et al. Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **4**:492-9, 2001.
- NORBERG, B. Cytoplasmic microtubules and radial-segmented nuclei (Rieder cells). Effects of vinblastine, sulfhydryl reagents, heparin and caffeine. *Scand J Haematol* **5**:312-8, 1969.
- ORLOWSKI, S.; MIR, L. M.; BELEHRADEK, J., JR. et al. Effects of steroids and verapamil on P-glycoprotein ATPase activity: progesterone, desoxycorticosterone, corticosterone and verapamil are mutually non-exclusive modulators. *Biochem J*:515-22, 1996.
- OSMAN-PONCHET, H.; BOULAI, A.; KOUIDHI, M. et al. Characterization of ABC transporters in human skin. *Drug Metabol Drug Interact* **2**:91-100, 2014.
- PEDERSEN, L.; ROSE, C. ; LANGVAD, E. Combined treatment of advanced malignant melanoma with coumarin and cimetidine. A phase II study. *Cancer Immunol Immunother* **2**:178-9, 1987.
- PEREZ-SANCHEZ, A.; BARRAJON-CATALAN, E.; CATURLA, N. et al. Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. *J Photochem Photobiol B*:12-8, 2014.
- PEREZ-VICTORIA, J. M.; DI PIETRO, A.; BARRON, D. et al. Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. *Curr Drug Targets* **4**:311-33, 2002.
- PETTUS, B. J.; CHALFANT, C. E. ; HANNUN, Y. A. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta* **2-3**:114-25, 2002.

PONTE-SUCRE, A. Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporter blockers. *Appl Microbiol Biotechnol* **2**:279-86, 2007.

PRUSKI, A. M.; NAHON, S.; ESCANDE, M. L. et al. Ultraviolet radiation induces structural and chromatin damage in Mediterranean sea-urchin spermatozoa. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **1**:67-73, 2009.

RAGGERS, R. J.; VAN HELVOORT, A.; EVERS, R. et al. The human multidrug resistance protein MRP1 translocates sphingolipid analogs across the plasma membrane. *J Cell Sci*:415-22, 1999.

RAMESH, B. ; PUGALENDI, K. V. Antioxidant role of Umbelliferone in STZ-diabetic rats. *Life Sciences* **3**:306-10, 2006.

RAMESH, B.; VISWANATHAN, P. ; PUGALENDI, K. V. Protective effect of Umbelliferone on membranous fatty acid composition in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* **1-3**:231-9, 2007.

REINHECKEL, T.; BOHNE, M.; HALANGK, W. et al. Evaluation of UVA-mediated oxidative damage to proteins and lipids in extracorporeal photoimmunotherapy. *Photochemistry and Photobiology* **5**:566-70, 1999.

RIGATO, I.; PASCOLO, L.; FERNETTI, C. et al. The human multidrug-resistance-associated protein MRP1 mediates ATP-dependent transport of unconjugated bilirubin. *Biochem J Pt* **2**:335-41, 2004.

RINDE, E.; CHRISTIE, H.; FAGERLI, C. W. et al. The Influence of Physical Factors on Kelp and Sea Urchin Distribution in Previously and Still Grazed Areas in the NE Atlantic. *PLoS One* **6**:e100222, 2014.

ROBERT, J. ; JARRY, C. Multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem* **23**:4805-17, 2003.

ROEPKE, T. A.; HAMDOUN, A. M. ; CHERR, G. N. Increase in multidrug transport activity is associated with oocyte maturation in sea stars. *Dev Growth Differ* **9**:559-73, 2006.

RUSSO, R.; BONAVENTURA, R. ; MATRANGA, V. Time- and dose-dependent gene expression in sea urchin embryos exposed to UVB. *Marine Environmental Research*:85-92, 2014.

RUSSO, R.; ZITO, F.; COSTA, C. et al. Transcriptional increase and misexpression of 14-3-3 epsilon in sea urchin embryos exposed to UV-B. *Cell Stress & Chaperones* **6**:993-1001, 2010.

SAMANTA, M. P.; TONGPRASIT, W.; ISTRAIL, S. et al. The transcriptome of the sea urchin embryo. *Science* **5801**:960-2, 2006.

SANCAR, A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* **6**:2203-37, 2003.

SCHUCH, A. P.; YAGURA, T.; MAKITA, K. et al. DNA damage profiles induced by sunlight at different latitudes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2012.

SEMENOVA, M. N.; KISELYOV, A. ; SEMENOV, V. V. Sea urchin embryo as a model organism for the rapid functional screening of tubulin modulators. *Biotechniques* **6**:765-74, 2006.

SETLOW, R. B.; GRIST, E.; THOMPSON, K. et al. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **14**:6666-70, 1993.

SHAROM, F. J.; YU, X.; LU, P. et al. Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells. *Biochem Pharmacol* **4**:571-86, 1999.

SHELLY, K.; HERAUD, P. ; BEARDALL, J. Interactive effects of PAR and UV-B radiation on PSII electron transport in the marine alga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J Phycol* **39**:509-512, 2003.

SHEPS, J. A. ; LING, V. Preface: the concept and consequences of multidrug resistance. *Pflugers Arch* **5**:545-53, 2007.

SHICK, J. M.; LESSER, M. P. ; JOKIEL, P. L. Effects of ultraviolet radiation on corals and other coral reef organisms. *Global Change Biology* **6**:527-545, 1996.

SHIPP, L. E. ; HAMDOUN, A. ATP-binding cassette (ABC) transporter expression and localization in sea urchin development. *Dev Dyn* **6**:1111-24, 2012.

SHORROCKS, J.; PAUL, N. D. ; MCMILLAN, T. J. The dose rate of UVA treatment influences the cellular response of HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* **3**:685-93, 2008.

SIDDIQUI, A. A.; RAJESH, R.; ALAGARSAMY, V. et al. Synthesis, antiviral, antituberculosic, and antibacterial activities of some novel, 4-(4-substituted phenyl)-6-(4-nitrophenyl)-2-(substituted imino)pyrimidines. *Arch Pharm (Weinheim)* **2**:95-102, 2007.

SILVA-NETA, H. L.; TORREZAN, E.; DE ARAUJO LEITE, J. C. et al. Involvement of ABCB1 and ABCC1 transporters in sea urchin *Echinometra lucunter* fertilization. *Mol Reprod Dev* **12**:861-9, 2012.

SINGH, S.; PRASAD, N. R.; CHUFAN, E. E. et al. Design and Synthesis of Human ABCB1 (P-Glycoprotein) Inhibitors by Peptide Coupling of Diverse Chemical Scaffolds on Carboxyl and Amino Termini of (S)-Valine-Derived Thiazole Amino Acid. *J Med Chem* **10**:4058-72, 2014.

SINGH, S.; PRASAD, N. R.; KAPOOR, K. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of (S)-valine thiazole-derived cyclic and noncyclic peptidomimetic oligomers as modulators of human P-glycoprotein (ABCB1). *Chembiochem* **1**:157-69, 2014.

SMITH, M. J.; ARNDT, A.; GORSKI, S. et al. The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. *J Mol Evol* **6**:545-54, 1993.

SMITH, R. C.; PREZELIN, B. B.; BAKER, K. S. et al. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in antarctic waters. *Science* **5047**:952-9, 1992.

SOMMARUGA R ; G, A. Seasonality in UV transparency of an alpine lake is associated to changes in phytoplankton biomass. *Aquatic Science*:129-144, 2006.

STANCHEV, S.; HADJIMITOVA, V.; TRAYKOV, T. et al. Investigation of the antioxidant properties of some new 4-hydroxycoumarin derivatives. *Eur J Med Chem* **7**:3077-82, 2009.

STEPHENS, R. H.; O'NEILL, C. A.; WARHURST, A. et al. Kinetic profiling of P-glycoprotein-mediated drug efflux in rat and human intestinal epithelia. *J Pharmacol Exp Ther* **2**:584-91, 2001.

STOLARSKI, R. S. The antarctic ozone hole. *Scientific American*:30-36, 1988.

STRICKER, S. A. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol* **2**:157-76, 1999.

STROGYLOUDI, E.; PANCUCCI-PAPADOPOULOU, M. A. ; PAPADOPOULOS, G. L. Metal and metallothionein concentrations in *Paracentrotus lividus* from Amvrakikos gulf (Ionian Sea-Greece). *Environ Monit Assess*, 2014.

SUMMERS, R. G.; MORRILL, J. B.; LEITH, A. et al. A stereometric analysis of karyogenesis, cytokinesis, and cell arrangements during and following fourth cleavage period in the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. *Dev Growth Differ* **35**:41-58, 1993.

SVOBODOVA, A.; PSOTOVA, J. ; WALTEROVA, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **2**:137-45, 2003.

THOMAS, L.; PIGNEUX, J.; CHAUVERGNE, J. et al. Evaluation of whole abdominal irradiation in ovarian carcinoma with a four orthogonal fields technique. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **5**:1083-90, 1994.

THUONG, P. T.; POKHAREL, Y. R.; LEE, M. Y. et al. Dual anti-oxidative effects of fraxetin isolated from *Fraxinus rhynchophylla*. *Biol Pharm Bull* **9**:1527-32, 2009.

THURBER, R. V. ; EPEL, D. Apoptosis in early development of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* **1**:336-346, 2007.

TILNEY, L. G.; KIEHART, D. P.; SARDET, C. et al. Polymerization of actin. IV. Role of Ca⁺⁺ and H⁺ in the assembly of actin and in membrane fusion in the acrosomal reaction of echinoderm sperm. *Journal of Cell Biology* **2**:536-50, 1978.

TORREZAN, E.; FIGUEIREDO, R. C. ; MARQUES-SANTOS, L. F. Differential distribution of ABCB1 and ABCC1 transporters in sea urchin *pluteus* larvae. *Mol Reprod Dev* **8**:501, 2012.

- TRINDADE, G. S.; CAPELLA, M. A.; CAPELLA, L. S. et al. Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. *Photochemistry and Photobiology* **6**:694-9, 1999.
- TSURUO, T.; IIDA, H.; TSUKAGOSHI, S. et al. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* **5**:1967-72, 1981.
- UEDA, K.; CARDARELLI, C.; GOTTESMAN, M. M. et al. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **9**:3004-8, 1987.
- VAN HELVOORT, A.; GIUDICI, M. L.; THIELEMANS, M. et al. Transport of sphingomyelin to the cell surface is inhibited by brefeldin A and in mitosis, where C6-NBD-sphingomyelin is translocated across the plasma membrane by a multidrug transporter activity. *J Cell Sci*:75-83, 1997.
- VARMA, M. V.; ASHOKRAJ, Y.; DEY, C. S. et al. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res* **4**:347-59, 2003.
- VAUTIER, S.; FERNANDEZ, C.; MILANE, A. et al. ABCB1 (P-glycoprotéine) et barrière hémato-encéphalique: implication dans les maladies neurologiques et leurs traitements. *J Pharm Clin* **25**:225-235, 2006.
- VEGA, R. L. ; EPEL, D. Stress-induced apoptosis in sea urchin embryogenesis. *Marine Environmental Research* **2-5**:799-802, 2004.
- VERHOEFF, F. H. A Case of Syphilitic Retinochoroiditis Juxtapapillaris, with Microscopic Examination. *Trans Am Ophthalmol Soc* **Pt 2**:568-77, 1916.
- VESELINOVIC, J. B.; VESELINOVIC, A. M.; VITNIK, Z. J. et al. Antioxidant properties of selected 4-phenyl hydroxycoumarins: Integrated in vitro and computational studies. *Chem Biol Interact*:49-56, 2014.
- VORONINA, E. ; WESSEL, G. M. Apoptosis in sea urchin oocytes, eggs, and early embryos. *Mol Reprod Dev* **4**:553-61, 2001.
- WADA, H. ; SATOH, N. Phylogenetic relationships among extant classes of echinoderms, as inferred from sequences of 18S rDNA, coincide with relationships deduced from the fossil record. *J Mol Evol* **1**:41-9, 1994.
- WALKER, J. E.; SARASTE, M.; RUNSWICK, M. J. et al. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **8**:945-51, 1982.
- WANG, H. ; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* **5-6**:612-6, 1999.
- WEATHERHEAD, E. C. ; ANDERSEN, S. B. The search for signs of recovery of the ozone layer. *Nature* **7089**:39-45, 2006.

WEIGT, S.; HUEBLER, N.; STRECKER, R. et al. Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod Toxicol* **2**:133-41, 2012.

WHALEN, K.; REITZEL, A. ; HAMDOUN, A. Actin polymerization controls the activation of multidrug efflux at fertilization by translocation and fine-scale positioning of ABCB1a on microvilli. *Mol Biol Cell*, 2012.

WILT, F. H. Determination and morphogenesis in the sea urchin embryo. *Development* **4**:559-76, 1987.

WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; DA SILVEIRA CHAGAS, A. et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine* **3**:240-6, 2014.

WMO. Scientific Assessment of Ozone Depletion Global. *Ozone Research and Monitoring Project-Report* 2011.

WOLFGER, H.; MAMNUN, Y. M. ; KUCHLER, K. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res Microbiol* **3-4**:375-89, 2001.

XU, C. ; SULLIVAN, J. H. Reviewing the technical designs for experiments with ultraviolet-B radiation and impact on photosynthesis, DNA and secondary metabolism. *J Integr Plant Biol* **4**:377-87, 2010.

XU, Y. ; FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. *Journal of Dermatological Science Supplement* **1**:S1-S8, 2005.

YAGURA, T.; MAKITA, K.; YAMAMOTO, H. et al. Biological sensors for solar ultraviolet radiation. *Sensors (Basel)* **4**:4277-94, 2011.

YANG, H. M.; HAM, Y. M.; YOON, W. J. et al. Quercitrin protects against ultraviolet B-induced cell death in vitro and in an in vivo zebrafish model. *J Photochem Photobiol B*:126-31, 2012.

YASARAWAN, N.; THIPYAPONG, K. ; RUANGPORNVISUTI, V. Exploring molecular structures, orbital interactions, intramolecular proton-transfer reaction kinetics, electronic transitions and complexation of 3-hydroxycoumarin species using DFT methods. *J Mol Graph Model*:13-26, 2014.

YASUI, H. ; SAKURAI, H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochem Biophys Res Commun* **1**:131-6, 2000.

ZHANG, X.; ROSENSTEIN, B. S.; WANG, Y. et al. Identification of possible reactive oxygen species involved in ultraviolet radiation-induced oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* **7**:980-5, 1997.

ZHANG, Y.; MATTJUS, P.; SCHMID, P. C. et al. Involvement of the acid sphingomyelinase pathway in uva-induced apoptosis. *J Biol Chem* **15**:11775-82, 2001.

ZHAO, C.; JI, N.; ZHANG, B. et al. Effects of Covering Behavior and Exposure to a Predatory Crab *Charybdis japonica* on Survival and HSP70 Expression of Juvenile Sea Urchins *Strongylocentrotus intermedius*. *PLoS One* **5**:e97840, 2014.