Bruno Blotta Baptista

Transporte de cálcio em células isoladas de
hepatopâncreas do caranguejo dulcícola
Dilocarcinus pagei: efeitos do ATP e Ca^{2+}

São Paulo

2009

Bruno Blotta Baptista

Transporte de cálcio em células isoladas de
hepatopâncreas do caranguejo *Dilocarcinus*
pagei: efeitos do ATP e Ca^{2+}

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

Orientadora: Flavia P. Zanotto

São Paulo

2009

Ficha Catalográfica

Blotta-Baptista, Bruno
Transporte de cálcio em células
isoladas de hepatopâncreas do caranguejo
dulcícola *Dilocarcinus pagei*: efeito do
ATP e Ca^{2+}
94 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia.

1. Cálcio 2. Hepatopâncreas 3. ATP
I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a):

Prof(a). Dr(a):

Prof(a). Dr(a):

Prof(a). Dr(a):

Profa.. Dra. Flavia Pinheiro Zanotto
Orientadora

À Maria Regina Blotta Baptista (*in memoriam*)
e Maria Gewehr Blotta

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas
nada pode ser modificado até que seja enfrentado”

Albert Einstein

Agradecimentos

A minha orientadora, Profa. Dra. Flavia P. Zanotto por confiar e por tornar possível cada passo dessa jornada e pelos ensinamentos além da “bancada”.

Aos meus pais, Milton M. Baptista Filho e Maria Regina Blotta Baptista pelo exemplo de integridade, pelas lições ao longo da vida e principalmente por sempre me incentivarem a estudar e adquirir novos conhecimentos.

A minha segunda mãe (e avó) Maria Gewher Blotta pelo exemplo de perseverança e por propiciar um lar harmonioso.

A Silvana Aparecida da Costa, por sempre me apoiar.

Aos meus tios José Luiz Blotta Jr. e José Fernando Blotta por todo apoio nos momentos difíceis durante a adaptação em São Paulo.

A todos os amigos e funcionários do Departamento de Fisiologia, em especial Tiago Gabriel, João Gimenez, James Fernandes e Eduardo Tamura.

Aos amigos de laboratório e Mackenzie: Marina, Esther e Danilo.

A Universidade Presbiteriana Mackenzie na pessoa do Prof. Dr. Gustavo Augusto Schmidt de Melo Filho por ceder a infra-estrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao IBAMA pelas autorizações de coleta de caranguejos de nº 18/2006 e 144/2005

A CAPES / Departamento de Fisiologia na pessoa do Prof. Dr. Gilberto Xavier pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Sumário

I. Introdução	1
I.1. Homeostase do cálcio em células eucariontes	2
I.2. Receptores Purinérgicos	5
I.3. O ciclo da muda em crustáceos	7
I.4. Tecidos que armazenam e transportam cálcio	9
I.5. Organelas e a compartimentalização do cálcio	16
I.6. Mecanismos transportadores de cálcio em crustáceos e seus bloqueadores	18
II. Objetivos	21
III. Materiais e Métodos	22
III.1. Modelo Biológico	22
III.2. Coleta e manutenção dos animais	23
III.3. Obtenção das células de hepatopâncreas: uma nova metodologia	25
III.3.1. Células não depletadas na presença de 1mM de CaCl_2 externo	25
III.3.2. Células não depletadas na ausência de Ca^{2+} externo	25
III.3.3. Células depletadas na ausência de Ca^{2+} externo	25
III.4. Soluções	25
III.5. Contagem e viabilidade das células	26
III.6. Marcação com Fluo 3 AM	26
III.7. Calibração	26
III.8. Experimentos com pulsos de ATP	27
III.9. Experimentos com pulso de CaCl_2	28
III.10. Bloqueadores	28
III.11. Análise estatística	29
IV. Resultados	30
IV.1. Efeito do pulso de ATP (1mM)	30
IV.1.1 Efeito do ATP em células não depletadas na presença de Ca^{2+} externo	30
IV.1.2. Efeito do ATP em células não depletadas na ausência de Ca^{2+} externo	33
IV.1.3. Efeito do ATP em células depletadas na ausência de Ca^{2+} externo	36
IV.1.4. Comparação entre tratamentos: CND + Ca, CND – Ca e CD – Ca	39
IV.2 Efeito do pulso de CaCl_2 (1mM)	41
IV.2.1 Efeito do pulso de CaCl_2 (1mM) em células depletadas	41
IV.2.2. Efeito do pulso de CaCl_2 (10mM) em células depletadas	45
IV.2.3. Comparação entre tratamentos: Pulso de CaCl_2 1mM VS 10mM	49
V. Discussão	51
V.1. Efeito do ATP – Visão Geral	51
V.1.1. Efeito do Vanadato e participação da Ca-ATPase (PMCA)	53
V.1.2. Efeito do amiloride e participação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)	55
V.1.3 Efeito do verapamil e participação de canais para Ca^{2+}	62
V.1.4 Ausência de Ca^{2+} externo e participação dos estoques intracelulares	65
V.2. Efeito do pulso de Ca^{2+}	67
V.2.1 Efeito do pulso de Ca^{2+} 1mM	68
V.2.2 Efeito do pulso de Ca^{2+} 10mM	69
V.3. Modelo proposto para transporte de Ca^{2+} em hepatopâncreas de <i>D. paguei</i>	70
VI. Conclusões	71
VII. Referências Bibliográficas	73

Resumo

Todas as células eucarióticas apresentam mecanismos para controlar e operar o cálcio (Ca^{2+}). Apesar desse íon não ser importante para regulação osmótica e manutenção da concentração iônica da hemolinfa em crustáceos, ele é finamente regulado, pois desempenha papel fundamental no enrijecimento do exoesqueleto desses organismos. Dessa forma o crescimento e fisiologia desses organismos estão ligados ao massivo transporte de Ca^{2+} que ocorre através das células epiteliais durante o ciclo da muda. Para avaliar os mecanismos transportadores de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática, foram utilizadas células isoladas a partir de hepatopâncreas de *D. pagei*, um crustáceo dulcícola. Quando essas células foram submetidas a um pulso de 1mM de ATP externo, ocorreu uma queda rápida (50 s) na concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), que foi totalmente inibida por 10mM de vanadato e parcialmente por 2mM de amiloride, sugerindo que o efluxo ocorreu através de uma Ca-ATPase (PMCA) e de um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX ou NHE), respectivamente. Essa queda foi seguida de uma recuperação dos valores iniciais, que pode ter ocorrido via influxo de Ca^{2+} do meio externo, sensível ao verapamil (1mM), ou através da liberação de Ca^{2+} de estoque intracelulares. Células incubadas em meio livre de Ca^{2+} apresentam uma redução no $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e quando são submetidas a um pulso de Ca^{2+} externo ocorre um influxo imediato do íon, que é sensível tanto a 1mM de verapamil quanto a 2mM de amiloride, sugerindo que a entrada ocorra via canais para cálcio e via trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, respectivamente. Juntos esses resultados sugerem que o transporte de cálcio em células isoladas de hepatopâncreas de *D. pagei* parece ocorrer de maneira semelhante ao modelo proposto em outros crustáceos: efluxo via Ca-ATPase (PMCA) sensível ao vanadato e via trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) sensível ao amiloride; influxo via canais para Ca^{2+} sensíveis ao verapamil e modo de influxo de Ca^{2+} do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ou trocador Na^+/H^+ (NHE) operando como $\text{Ca}^{2+}/(n) \text{Na}^+$, sensíveis ao amiloride. Esses dados contribuem para um maior entendimento do transporte de cálcio em *D. pagei* (e outros crustáceos) e sua importância para a homeostase e o ciclo da muda.

Palavras-Chave: 1. Cálcio 2. ATP 3. Hepatopâncreas 4. Crustáceos 5. *Dilocarcinus pagei* 6. Bloqueadores

Abstract

All eukaryotic cells display several mechanisms to control and operate calcium (Ca^{2+}). Although there is no apparent importance for hemolymph osmo-ionic regulation, it plays an essential role on exoskeleton calcification (hardening). Crustaceans' growth and physiology are linked to massive calcium transport during molting cycle. The aim of this work was to evaluate calcium transport mechanisms in hepatopancreatic cells of the freshwater crab *D. pagei*. When these cells were exposed to external ATP pulse (1mM), it was observed a decrease in intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), inhibited by 10mM vanadate and partially by 2mM amiloride, suggesting the involvement of a Ca-ATPase (PMCA) and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX ou NHE), respectively. Recovery of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was inhibited by 1mM verapamil, a calcium channel blocker. The same was observed in calcium free environment and so, calcium must have been provided by intracellular stocks (endoplasmatic reticulum and/or mitochondria). When cells incubated in calcium free environment were exposed to calcium pulse (1mM or 10mM), a rapid rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed, suggesting calcium influx. This could be partially inhibited by 1mM verapamil or 2mM amiloride, suggesting the participation of calcium channels and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (Ca^{2+} influx mode), respectively. Calcium transport in these cell appears to be the same as described for other crustaceans: efflux occurs via a vanadate sensitive Ca-ATPase (PMCA) and by an amiloride sensitive $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX exchanger); influx is mediated by a verapamil sensitive calcium channel and by an amiloride sensitive $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ or Na^+/H^+ (NHE) operating as $\text{Ca}^{2+}/(n) \text{Na}^+$ exchanger. Taken together, these data contributes to a better understanding of *D. pagei* calcium homeostasis and the moult cycle.

Keywords: 1.Calcium 2.ATP 3.Hepatopancreas 4. *Dilocarcinus pagei* 5. Crab. 6. Blocker

I. Introdução

Organismos que habitam água doce possuem um elevado gradiente osmótico em relação ao meio em que vivem (MANTEL & FARMER, 1983), e são constantemente desafiados a manter as concentrações iônicas dos seus fluídos corporais e meio intracelular a limites fisiológicos. Mecanismos evolutivos responsáveis pelo aumento da independência dos organismos em relação às flutuações das concentrações osmóticas do ambiente incluem a diminuição da permeabilidade das superfícies corporais a água e íons (SHAW, 1959; HARRIS, 1975; GREENAWAY, 1981) com conseqüente restrição na taxa de influxo de água e perda iônica, e o refinamento dos mecanismos transportadores de íons responsáveis por influxo ou efluxo. Entretanto, a perda urinária de sais obriga os organismos a estarem constantemente absorvendo íons do meio, especialmente Na^+ e Cl^- , que são os principais osmólitos dos fluídos extracelulares.

Um modelo proposto atualmente para a tomada de NaCl em crustáceos (para revisões veja PÉQUEX *et al.*; 1988; PÉQUEUX, 1995; ONKEN & RIESTENPATT, 1998) sugere que a tomada de Na^+ é independente de Cl^- e ocorre por canais apicais para Na^+ e Na^+/K^+ ATPase localizadas na membrana basolateral das células. Já a tomada de Cl^- , é independente de Na^+ , ocorre por canais para Cl^- e trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ influenciados pela atividade da anidrase carbônica, que pode gerar seus substratos. O alto nível de conservação de seqüências de aminoácidos da Na^+/K^+ ATPase em uma ampla escala de espécies sugere que mecanismos regulatórios como esses podem dar suporte à adaptação evolucionária com respeito à capacidade osmorregulatória dos

crustáceos, servindo como pré-requisitos para a conquista do ambiente estuarino e dulcícola (LUCU & TOWLE, 2003).

Outro mecanismo adaptativo para a invasão do ambiente dulcícola, observado em lagostins, é a capacidade que esses animais têm em produzir uma urina diluída, através da reabsorção de íons pelo canal nefridial das glândulas antenais, permitindo a eliminação de água sem o adjunto da perda de íons (WHEATLY & GAO, 2004). Dessa maneira, poderia existir uma economia de energia em contrapartida à reposição dos íons que seriam perdidos e teriam que ser repostos por tomada ativa nas brânquias, local onde o gradiente eletroquímico é mais amplo. Caranguejos de água doce apresentam uma baixa taxa de produção de urina isosmótica, e parecem não possuir a habilidade de ultrafiltração do fluido corporal. Essa pode ser uma estratégia para conservação de água, que permite a sobrevivência em ambientes terrestres, contrabalanceando a perda por difusão (HARRIS, 1975; GREENAWAY, 1981; MORRIS & VAN AARDT, 1998).

I.1. Homeostase do cálcio em células eucariontes

Todas as células eucarióticas apresentam diferentes mecanismos para controlar e operar o Ca^{2+} mantendo uma importante diferença de 4 ordens de grandeza entre a concentração intracelular ($10^{-7}/10^{-8}$ M) e extracelular ($10^{-3}/10^{-2}$ M). Isso parece ter ocorrido cedo na escala evolutiva porque o Ca^{2+} possui a tendência de formar precipitados insolúveis com o fosfato, que é muito abundante no citosol (BAGNARESI *et al.*, 2007). Além disso, apesar de o cálcio ser um osmólito pouco significativo para a variação/manutenção da osmolalidade da hemolinfa em crustáceos, ele é finamente regulado na hemolinfa a valores próximos de 12 mM. Essa acentuada regulação também ocorre com as concentrações intracelulares de cálcio e pode ser explicado

pelas diferentes funções que este íon desempenha como mensageiro intermediário na sinalização celular e ativação de enzimas intramitocondriais (consulte GUNTER *et al.*; 2004 para uma revisão).

Como maneira de manter o gradiente de concentração de Ca^{2+} através da membrana plasmática, existem mecanismos para a extrusão desse íon, como por exemplo, Ca-ATPases (PMCA) que bombeiam ativamente o Ca^{2+} para o meio extracelular com a energia proveniente da hidrólise do ATP e são reguladas por proteínas Ca^{2+} -ligantes, as calmodulinas (CARAFOLI *et al.*, 1996), e trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que utilizam os gradientes de íons monovalentes e potencial de membrana (para trocadores eletrogênicos $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). No citosol, várias proteínas agem como tampões de Ca^{2+} , sendo as mais conhecidas as calmodulinas, calbindinas, calretininas e parvalbumina (BAIMBRIDGE, 1992; BAIMBRIDGE *et al.*, 1992)

Por outro lado, o influxo de Ca^{2+} é mediado por uma variedade de canais que podem ser agrupados de acordo com o seu mecanismo de abertura: (1) operados por voltagem, ativados por despolarização da membrana (MORI *et al.*, 1993); (2) operados por receptores, modulados pela ligação de agonistas/antagonistas; (3) operados por segundos mensageiros, modulados pela variação de concentração de segundos mensageiros (por exemplo nucleotídeos, diacilglicerol, entre outros) e (4) operados por estoque que abrem-se em resposta a redução da concentração de Ca^{2+} intracelular mediada pela participação do retículo endoplasmático, mecanismo denominado entrada capacitiva de cálcio (PUTNEY & BIRD, 1994).

O retículo endoplasmático possui importante função na regulação do cálcio, estando envolvido na sua liberação e re-tomada (MELDOLESI, 1998; MELDOLESI &

POZZAN, 1998a,b). Uma Ca-ATPase de retículo sarco-endoplasmático (SERCA), altamente estudada e conservada em diversas espécies (WOLOSKE & DE MEIS, 1995), bombeia Ca^{2+} para o interior do lúmen do retículo utilizando a energia da hidrólise do ATP. A quantidade de Ca^{2+} que pode ser armazenada em seu interior é contraditória, sendo que MIYAWAKI e colaboradores (1997) calcularam que essa concentração varia de 60-400 μM , enquanto outros a estimaram em 2000 μM (TSE *et al.*, 1994; MONTERO *et al.*, 1995; KENDALL *et al.*, 1996; BYGRAVE & BENEDETTI, 1996). Algumas proteínas como calsequestrina (MACLENNAN & WONG, 1971; BEARD *et al.*, 2004) e calreticulina (FLIEGEL *et al.*, 1989; GELEBART *et al.*, 2005) podem agir como fatores ligantes de Ca^{2+} no lúmen do retículo. O retículo endoplasmático/sarcoplasmático libera Ca^{2+} armazenado através de canais receptores de IP_3 e receptores de rianodina, que são semelhantes estruturalmente e funcionalmente. Os canais para receptores IP_3 liberam Ca^{2+} quando hormônios e neurotransmissores ligados a proteína G ou tirosina quinase ativam fosfolipases ($\text{PLC}\beta$ e $\text{PLC}\gamma$), que hidrolisam o fosfatidilinositol, gerando IP_3 (BERRIDGE, 1993). A liberação de Ca^{2+} por essa via é auto-modulada e concentrações do íon até 300 nM ativam o receptor, enquanto concentrações acima disso o inibem (BEZPROZVANNY *et al.*, 1991). Os canais para receptores de rianodina estão estruturalmente ligados a outros canais voltagem dependentes com receptores para dihidropiridina, que sofrem uma alteração conformacional quando ocorre uma variação de voltagem, alterando também a estrutura dos canais para rianodina, que causa a abertura do canal e liberação do cálcio do retículo. Outro agonista, o ADP ribose cíclica (sintetizado a partir do NAD^+), também libera cálcio do retículo endoplasmático (GALIONE, 1994; GALIONE & WHITE, 1994; LEE *et al.*, 1994). Além disso, mitocôndrias são sensíveis ao Ca^{2+} liberado do retículo endo/sarcoplasmático e

podem armazená-lo momentaneamente, principalmente em regiões de microdomínios (RIZZUTO *et al.*, 1993).

I.2. Receptores Purinérgicos

Algumas moléculas extracelulares como as purinas (adenosina: ADP e ATP) e pirimidinas (uracilas: UDP e UTP) são importantes sinalizadoras que mediam efeitos biológicos variados já identificados em mamíferos, como contração de músculo liso, neurotransmissão, secreção exócrina e endócrina, resposta imune, inflamação, agregação de plaquetas, modulação da função cardíaca através de receptores de superfície denominados receptores purinérgicos (BURNSTOCK & KENNEDY, 1986; GORDON, 1986; SEIFERT & SCHULTZ, 1989; BURNSTOCK, 1990; OLSSON & PEARSON, 1990; RALEVIC AND BURNSTOCK, 1991a,b; RALEVIC *et al.*, 1991; JACOBSON *et al.*, 1992b; DUBYAK & EL-MOATASSIM, 1993; DALZIEL & WESTFALL, 1994; FREDHOLM, 1995; BURNSTOCK & WOOD, 1996; ONGINI & FREDHOLM, 1996; SEBASTIÃO & RIBEIRO, 1996). Existem duas famílias principais desses receptores, P1 (ou receptores para adenosina) e P2 (BURNSTOCK, 1978). Os receptores P1 reconhecem primariamente ATP, ADP, UTP e UDP e estão todos relacionados com proteína G, sendo subdivididos em A1, A2a, A2b e A3. Uma das vias mais conhecidas para sinalização de receptores A1 é a inibição da adenilato ciclase, que causa a redução de AMP cíclico (cAMP), modulador de proteínas quinases responsáveis pela fosforilação de outras proteínas (VAN CALKER *et al.*, 1978; LONDOS *et al.*, 1980). Uma outra via de sinalização importante é a ativação de fosfolipase C (PLC) que aumenta a produção de IP3, estimulando a liberação de Ca^{2+} de estoque intracelulares através da interação com receptores específicos do retículo endoplasmático (conforme explicado acima) (AREND *et al.*, 1989; SCHIEMANN &

BUXTON, 1991a,b; SCHIEMANN *et al.*, 1991; GERWINS & FREDHOLM, 1992a,b; GALIETTA *et al.*, 1992; OLIVERA *et al.*, 1992; WHITE *et al.*, 1992; SCHOLZ *et al.*, 1993; IREDALE *et al.*, 1994; MEGSON *et al.*, 1995; PEAKMAN & HILL, 1995). Quando organismos são submetidos a hipóxia e isquemia, ocorre a liberação de adenosina, que reduz a atividade neuronal (liberação de neurotransmissores e hiperpolarização) e consumo de oxigênio, sendo essa resposta também mediada pelos receptores A1. Receptores A2a ativam a adenilato ciclase e estão relacionados com os receptores dopaminérgicos em neurônios (FERRE *et al.*, 1991, 1992, 1997; FINK *et al.*, 1992; SCHIFFMANN & VANDERHAEGHEN, 1993), facilitando a liberação de neurotransmissores; resposta imune, vasodilatação e efeitos mitogênicos em células endoteliais humanas (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Os receptores A2b estão ligados a ativação da adenilato ciclase, proteína G ligada a proteína quinase C e elevação da $[Ca^{2+}]_i$ ligada ao IP3, e estão presentes em quase todos os tecidos, desempenhando diferentes funções, entre elas ativação de mastócitos em humanos e vasodilatação. Os receptores A3 estão ligados à inibição da adenilato ciclase, mas suas funções fisiológicas ainda não são totalmente conhecidas, sendo relacionados com resposta inflamatória e cardioproteção durante a isquemia.

Já os receptores P2 são divididos em 2 subfamílias: P2X, canais iônicos operados por ligante, e P2Y, ligados a proteína G (BENHAM & TSIE, 1987; DUBYAK, 1991; ABBRACCHIO & BURNSTOCK, 1994; FREDHOLM *et al.*, 1996; RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Os receptores P2X são canais iônicos operados (abertos) por ATP que mediam uma rápida (10ms) e seletiva entrada de cátions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) e que têm ampla distribuição em células excitáveis (músculo liso, neurônios e glia) (BEAN, 1992; DUBYAK & EL-MOATASSIM, 1993; NORTH, 1996). De fato, o fluxo direto de

Ca^{2+} do meio extracelular através do canal constitui uma importante fonte de aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Receptores P2Y são receptores para purinas e pirimidinas ligados a proteína G, que atuam primariamente através da ativação da fosfolipase C, e conseqüente produção de IP3 e elevação do $[\text{Ca}^{2+}]_i$, estimulando diferentes vias de sinalização como proteína quinase C, fosfolipase A, canais para K^+ dependentes de Ca^{2+} e influxo de Ca^{2+} através de canais operados por voltagem. Uma outra maneira de sinalização por esses receptores é a inibição da adenilato ciclase, com efeitos ainda não esclarecidos (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998).

Além das funções celulares, o cálcio tem papel fundamental na biomineralização do rígido exoesqueleto dos crustáceos, também denominado de cutícula. Dessa maneira, o crescimento e a fisiologia desses animais estão intimamente ligados ao ciclo da muda e às diferentes estratégias para disponibilizar esse íon, principalmente em ambientes de baixas concentrações iônicas, como o dulcícola. Desse modo, crustáceos são modelos ideais para o estudo da homeostase do cálcio, pois o ciclo natural da muda envolve massivas flutuações na concentração desse íon (WHEATLY, 1997).

I.3. O ciclo da muda em crustáceos

Os crustáceos permanecem a maior parte da vida em intermuda. Durante essa fase, o balanço de cálcio é igual a zero e os fluxos são equivalentes à entrada e saída do cátion no animal, sugerindo trocas entre “pools” internos e externos (GREENAWAY, 1976). Durante a pré-muda o exoesqueleto é solubilizado da carapaça e o Ca^{2+} livre é transferido através do epitélio cuticular para a hemolinfa, sendo a maioria perdida para o meio e o restante armazenado em locais de estoque temporário (até 20% do

total de cálcio), constituindo um fluxo negativo de cálcio (efluxo de cálcio). No pós-muda, o Ca^{2+} que foi estocado temporariamente (endógeno) é direcionado para a hemolinfa através do epitélio, juntamente com o cálcio que provém de fontes externas (ambiente ou alimentos) e irão compor o novo exoesqueleto em enrijecimento, constituindo um fluxo positivo de cálcio (influxo de cálcio). O cálcio acumulado na pré-muda em tecidos é utilizado prioritariamente para enrijecimento de partes bucais, ossículos gástricos e dácilos das pernas. Adicionalmente às fontes endógenas, água e alimento (incluindo a exúvia que pode ser ingerida) são utilizados no pós-muda como fontes externas (LUQUET & MARIN, 2004.) Já WHEATLY (1996, 1997) e GREENAWAY (1985) concordam que a nova cutícula é mineralizada primariamente com cálcio exógeno.

Por algumas horas os crustáceos absorvem água do ambiente e o volume corporal pode aumentar em até 20%, podendo causar uma diminuição nas concentrações iônicas da hemolinfa que são rapidamente restauradas pela absorção ativa de íons da água (ZANOTTO & WHEATLY, 1993). Para isso, um aumento de ATPases é esperado. Em lagostins (*Procambarus clarkii*), os mecanismos de tomada ativa de cálcio estão silenciados na intermuda, e quando expostos a ambientes livres de cálcio, a concentração na hemolinfa é diminuída, uma vez que estão impossibilitados de absorver ativamente o cálcio. No entanto, os níveis de cálcio na hemolinfa de *Cherax destructor* são fortemente regulados (ELLIS & MORRIS, 1995).

Quatro epitélios são especializados para a troca bidirecional de cálcio em crustáceos (WHEATLY, 1999). As brânquias (1) são o local de perda passiva de cálcio e tomada ativa nas espécies aquáticas, podendo modificar o conteúdo pós-renal do

cátion na urina de espécies terrestres (WOLCOTT & WOLCOTT, 1985, 1991; WOLCOTT, 1992; GREENAWAY & MORRIS, 1989; GREENAWAY *et al.*, 1990; MORRIS *et al.*, 1991; MORRIS, 2001; TAYLOR *et al.*, 1993; TAYLOR & GREENAWAY, 2002). O epitélio digestório (2) efetua a tomada de cálcio do alimento, incluindo a ingestão da exúvia, e de regiões de armazenamento do tubo digestório, como a região cárdica do estômago (2a) de lagostins e caranguejos da família Gecarcinidae (BLISS, 1968; MC CARTHY, 1977; TAKAGI *et al.*, 2000) e através do hepatopâncreas (2b). As glândulas antenais (3) podem estar envolvidas na reabsorção pós-filtracional da urina. A hipoderme cuticular (4) é efetiva na mineralização/desmineralização da cutícula durante os estágios da muda. Já a hemolinfa é utilizada para aumentar a conservação do cátion (SPARKES & GREENAWAY, 1984), estocado na forma de pequenos grânulos de CaCO_3 (0,26 μm), contribuindo para um aumento de 150 vezes deste, alcançando concentrações de até 2M (SPARKS & GREENAWAY, 1984; GREENAWAY & FARRELLY, 1991; GREENAWAY, 1993).

I.4. Tecidos que armazenam e transportam cálcio

O epitélio branquial (1) de caranguejos possui células especializadas para absorção de NaCl (PÉQUEX *et al.*, 1988; PÉQUEUX, 1995), associadas a um elevado número de mitocôndrias, sendo rico em Na^+/K^+ ATPase, sensíveis a ouabaína (FLIK *et al.*, 1994; TOWLE, 1990) que alimenta os processos transportadores de cálcio dependentes de Na^+ (FLIK *et al.*, 1994), bem como os trocadores Na^+/H^+ e co-transporte $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (RIESTENPATT *et al.*, 1994). Em *Carcinus maenas*, o influxo de cálcio através do epitélio branquial é em maior parte dependente da Na^+/K^+ ATPase (LUCU & FLIK, 1999). Espécies aquáticas dependem primariamente das

brânquias para a tomada do cálcio, enquanto em espécies terrestres há predominância do epitélio digestório, uma vez que a dieta proporciona cálcio ambiental.

O epitélio digestório (**2a**) é responsável pela formação de gastrólitos, que são concreções de CaCO_3 formados pelos discos gástricos na região cárdica do estômago até 40 dias antes da ecdise e compreendem até 85% do cálcio endógeno (WHEATLY & AYERS, 1995) , podendo ser solubilizados rapidamente (24 h) e utilizados preferencialmente para enrijecimento de partes bucais, ossículos gástricos e dácilos das pernas. O hepatopâncreas (**2b**) é um divertículo multilobado conectado ao intestino médio, composto de diversos túbulos com “fundo cego” (100 μm de diâmetros, comprimento variável) contendo uma camada epitelial única. Cada túbulo esvazia em uma série de dutos coletores, que se agrupam para formar um ou dois dutos que se ligam em ambos os lados do intestino anterior. Começando do lúmen e seguindo para a periferia, cada túbulo digestório possui um epitélio, uma membrana basal, células contráteis e uma túnica própria. Elementos não epiteliais formam uma extensa rede conectiva, no qual os túbulos estão ligados e suspensos, que contém veias, sinus hemais e miofilamentos. A função primária do hepatopâncreas é a secreção: as células tubulares liberam enzimas e emulsificantes nos dutos coletores, que passam pelo intestino posterior e se misturam com os componentes da dieta (YONGE, 1924; VAN WEEL, 1955, 1960; VONK, 1960; BLANDAMER & BEECHEY, 1964; KOOIMAN, 1964; DEVILLEZ & BUSCHLEN, 1967; SATHER, 1969; VAN WEEL, 1970, 1974; LESTER *et al.*, 1975). Outro papel é a absorção de nutrientes e outros componentes da dieta (YONGE, 1924; LOIZZI, 1971; LOIZZI & PETERSON, 1971; GIBSON & BARKER, 1979; JOHNSON, 1980). O hepatopâncreas também é responsável pelo armazenamento de cálcio e fosfato do exoesqueleto durante o ciclo da muda

(BECKER *et al.*, 1974; CHEN *et al.*, 1974; LORET & DEVOS, 1992) e glicogênio e lipídeos durante períodos de abundância de alimentos (YONGE, 1924; VAN WEEL, 1974; GIBSON & BARKER, 1979; JOHNSON, 1980). Pelo menos 4 tipos celulares são reconhecidos nesse órgão e foram classificadas de acordo com JACOBS em (1928): (1) células “E” (embrionárias), que se originam por mitose na região distal do túbulo e se diferenciam quando migram proximalmente; (2) “F” (fibrilares), que possuem um citoplasma granular e um vacúolo supranuclear que se expande conforme a maturação da célula; (3) “R” (absortivas), que contém gotículas de glicogênio e lipídeos; e (4) “B” (*blister*, vesiculares), que contém um único e grande vacúolo enzimático cercado por um fino citoplasma. Alguns autores acreditam que as células F, R e B são derivadas originalmente das células E e que ocorre diferenciação de uma linhagem para a outra conforme ocorre maturação (VAN WEEL, 1955; TRAVIS, 1957; DAVIS & BURNETT, 1964; BUNT, 1968; STANIER *et al.*, 1968; LOIZZI, 1971; JOHNSON, 1980).

As células embriônicas são as menores e pouco numerosas, possuindo organelas típicas de células indiferenciadas: poucos retículos endoplasmáticos lisos e rugosos, pequenas mitocôndrias esféricas e com poucas cristas e numerosas vesículas simples ligadas a membrana e Golgi (STRAINER *et al.*, 1968), sendo as únicas capazes de realizar mitose nesse órgão.

As células R são as mais abundantes e morfologicamente similares as F, mas diferem por apresentarem vacúolos abundantes de lipídeos, onde também são encontrados esterases e lípases, sugerindo que os vacúolos podem ser originados e aumentar de volume em função da alta atividade enzimática hidrolítica na membrana apical sob gorduras localizadas no lúmen e posterior transporte para o interior dessas

células (LOIZZ, 1971; MOMIN & RANGNEKER, 1975). Também apresentam atividade glicogenopoiética e pequenas partículas de glicogênio no citoplasma (BARKER & GIBSON, 1977). Durante sua diferenciação armazenam glicogênio e posteriormente iniciam o processo de lipogênese, sendo que as células mais maduras apresentam pouco ou nenhum grânulo de glicogênio, mas são ricas em lipídeos e corpos residuais, resultantes de material não digerido (LOIZZ, 1966, 1971). Fosfatase alcalina e ácida foram localizadas na borda em escova e podem estar envolvidas na digestão e absorção de outras moléculas (MOMIN & RANGNEKER, 1974; BARKER & GIBSON, 1977, 1978). Esferas de cálcio durante algumas fases da muda e grânulos de glicogênio durante abundância alimentar sugerem que essas células estão envolvidas na troca de cálcio (e outros íons divalentes) e carboidratos, entre hemolinfa e epitélios. (LOIZZ, 1966; JOHSON, 1980; AL-MOHANNA & NOTT, 1985, 1986, 1987, 1989). A membrana apical apresenta microvilosidades recobertas por uma fina camada de mucopolissacarídeos que parece promover a digestão e transporte de nutrientes para o meio intracelular (PLAQUET *et al.*, 1993; CONKLIN, 1995). Os mucopolissacarídeos na membrana apical e diversas invaginações na membrana basolateral estão relacionadas com o processo de endocitose (MONIN & RANGNEKER, 1974; PLAQUET *et al.*, 1993).

As células F e B parecem estar ligadas ao processo de síntese protéica e secreção enzimática (LOIZZ, 1971; GIBSON & BARKER, 1979; JOHNSON, 1980). Células F apresentam uma grande quantidade de retículo endoplasmático, que produzem enzimas digestivas e são direcionadas para o Golgi para “empacotamento” e armazenamento (Loizzi, 1971; Al-Mohanna & Nott, 1986). São alongadas e apresentam uma borda em escova na região apical, mas não vesículas de endocitose

(PLAQUET *et al.*, 1993). Possuem um ou mais vacúolos supranucleares que se expandem e fundem-se conforme a maturação, que apresentam enzimas hidrolíticas como α -amilase (LOIZZI & PETERSON, 1971; TOULLEC *et al.*, 1992).

As células B são caracterizadas por uma membrana em escova bem desenvolvida com diversas invaginações, que levam a formação de vacúolos de endocitose, que fundem-se, formando um único vacúolo que ocupa ~90% do citoplasma, sugerindo que essas células tem capacidade de incorporar nutrientes direto do lúmen. Estão também envolvidas na síntese de enzimas digestivas, como α -amilase e “enzima semelhante a tripsina” (DE VILLEZ & FYLER, 1985; LORET & DEVOS, 1990). Existem controvérsias a respeito da função das células B: a maioria dos autores acredita que elas provêem enzimas digestivas para a hidrólise extracelular, por secreção merócrina, apócrina e holócrina (VAN WELL, 1955; LOIZZI, 1971; GIBSON & BARLER, 1979; JOHSON, 1980) enquanto alguns sugerem que elas são responsáveis pela absorção e digestão de nutrientes e acúmulo de materiais não digeridos (HOPKIN & NOTT, 1980; AL-MOHANNA & NOTT, 1986).

No início do túbulo existe uma zônula germinativa, na qual as células migram para a região proximal, diferenciando-se em outros tipos celulares. De acordo com HIRSCH & JACOBS (1930) o esquema abaixo é comumente aceito:

Entretanto, outros estágios foram descritos (VAN WEEL, 1955; DAVIS & BURNETT, 1964; STANIER *et al.*, 1968; BUNT, 1968; GIBSON & BARKER, 1979). Na região distal dos túbulos existe uma zona onde as células não apresentam morfologia nem de células F ou R (PLAQUET, 1991). Essa zona de transição, que fica próxima ao local no qual realmente ocorre a diferenciação, apresenta células em desenvolvimento que possuem características em comum de células R e F, sendo então denominadas R/F. Dessa maneira, sugere-se que as células E originam um único tipo celular, as R/F, e estando em um estágio indiferenciado podem secretar diversas enzimas digestivas, e no momento de ingestão de alimentos algumas se transformam em F, nas quais ocorre intensa secreção, ou então em R, capazes de realizar endocitose (PLAQUET *et al.*, 1993). Dessa maneira sugere-se o seguinte esquema para maturação:

A hipoderme (3) é constituída por três camadas abaixo da carapaça. A camada mais externa é responsável pela elaboração do novo exoesqueleto, denominado cutícula, que por sua vez é composta por mais 4 camadas (da mais externa para a mais interna): epicutícula, exocutícula, endocutícula e camada membranosa. Com exceção da última, todas são mineralizadas por precipitado de CaCO_3 e uma matriz colestérica de proteínas quitina misturadas com fosfato de cálcio. Poros das células epiteliais invadem a cutícula e são responsáveis pelo transporte de elementos para calcificação na pós-muda, como quinonas, cálcio, anidrase carbônica, e elementos para descalcificação, como quitinases e proteases. A

nova cutícula sintetizada no pré-muda pela hipoderme nunca é mineralizada até que a antiga seja reabsorvida, uma vez que uma parte do cálcio será reutilizado (LUQUET & MARIN, 2004).

As glândulas antenais (4) são macroscopicamente divididas em 4 regiões: coelomosaco, que filtra a hemolinfa derivada da artéria antenal; labirinto, um túbulo com muitas anastomoses, constituído de células com membrana apical com borda em escova e membrana basolateral associada a mitocôndrias; tubo distal, com função de reabsorção de água e finalmente a bexiga que estoca a urina (BEHNKE *et al.*, 1990). Nos decápodos marinhos a glândula antenal está envolvida no controle de volume da hemolinfa, hiporregulação do magnésio e sulfatos na hemolinfa, excreção de compostos orgânicos, reabsorção de fluídos, açúcares e aminoácidos do filtrado primário da urina (RIEGEL & COOK, 1975; MANTEL & FARMER, 1983). Por outro lado os lagostins, que são crustáceos de água doce, hiperregulam na intermuda o cálcio extracelular primariamente pela reabsorção de 95% do cátion do filtrado urinário (WHEATLY & TOOP 1989). A capacidade de produzir urina diluída está relacionada com a morfologia da suas glândulas antenais, que apresentam um canal nefridial, local onde ocorrem a reabsorção ativa de sódio, cloreto e cálcio (WHEATLY *et al.*, 2004). Em contraste, a urina de caranguejos é primariamente isosmótica à hemolinfa, constituindo-se de uma importante rota para a perda de íons. Espécies de braquiúros, como os caranguejos, são capazes de direcionar a urina dos nefróporos para a câmara branquial, onde ocorre a reabsorção de sais pelas brânquias, sendo assim produzido um filtrado diluído (WOLCOTT & WOLCOTT, 1985, 1991; WOLCOTT, 1992; GREENAWAY & MORRIS, 1989; GREENAWAY *et al.*, 1990; MORRIS *et al.*, 1991; MORRIS, 2001; TAYLOR *et al.*, 1993; TAYLOR & GREENAWAY, 2002).

O principal ponto para a compreensão dos movimentos transcelulares de cálcio está focado em como as células epiteliais mantêm a concentração de cálcio citosólico em face ao massivo trânsito do cátion. As células epiteliais devem manter mecanismos para utilização rotineira do cálcio (“housekeeping”) e ao mesmo tempo devem ser capazes de lidar com grandes fluxos de entrada e saída, que elevam sua concentração rapidamente durante o ciclo da muda.

I.5. Organelas e a compartimentalização do cálcio

Em estudos realizados por CHAVEZ-CROOKER e colaboradores (2001, 2003b), utilizando células do hepatopâncreas retiradas na intermuda e pré-muda marcadas com Fluo-3, e analisadas por microscopia confocal, observou-se que as células retiradas na intermuda mostravam pouca ou nenhuma região de acúmulo de cálcio; nessas células o citoplasma exibia distribuição baixa e uniforme de cálcio. Nas células retiradas na pós-muda, exibiam claramente intensas concentrações de cálcio em estruturas compartimentalizadas, que eram muito grandes para serem mitocôndrias, núcleo ou lisossomos, sugerindo tratar-se de acumulações de cálcio nos retículos endoplasmáticos. A interpretação desses resultados sugere que o retículo endoplasmático das células epiteliais do hepatopâncreas compartimentalizam cálcio durante a pré-muda. Posteriormente descobriu-se que a membrana do retículo endoplasmático possui uma ATPase (SERCA), sensível a tapsigargina que transporta o cálcio para o seu interior e um canal com receptor sensível a rianodina, responsável pelo efluxo do cálcio (YOUNG & STROKES, 2004)

Mitocôndrias localizadas estrategicamente contribuem para a dissipação de microdomínios de cálcio próximos a regiões de influxo do cátion por canais

transmembrânicos ou liberação pelo retículo endoplasmático, modulando suas atividades e contra-atuando na propagação do sinal citosólico de cálcio, sendo consideradas como tampões pontuais de cálcio (BRINI, 2003). O influxo de cálcio para a mitocôndria pode ocorrer por uniporte, que é insensível a baixas concentrações citosólicas de cálcio (abaixo de 200-300 nM), podendo ser inibido por “ruthenium red” (GUNTER & PFEITTER, 1990) ou por metais pesados como zinco e cobre (KLEIN & AHEARN, 1999; CHAVEZ-CROOKER *et al.*, 2002; BRINI, 2003). O efluxo de cálcio da mitocôndria ocorre por trocadores eletrogênicos Na^+ dependentes, $3\text{Na}^+/1\text{Ca}^+$, que são inibidos por diltiazem, verapamil e amiloride (GUNTER *et al.*, 2004) e também por cátions divalentes (Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} e Mg^{2+}) (BRINI, 2003). O potencial negativo na membrana interna (-180mV), gerado pela cadeia respiratória, direciona o cálcio através de um uniporte que o distribui na matriz mitocondrial de acordo com um gradiente eletroquímico. O equilíbrio eletroquímico não é estabelecido devido à atividade de trocadores que transportam o cálcio para fora da matriz mitocondrial em troca de H^+ ou Na^+ . O efluxo dependente de Na^+ ($2\text{Na}^+/1\text{Ca}^{2+}$) é considerado o mecanismo de controle fisiológico do ciclo do cálcio intramitocondrial. Apesar do uniporte possuir baixa afinidade, as mitocôndrias acumulam cálcio de maneira eficiente, uma vez que estão localizadas preferencialmente em microdomínios de altas concentrações de cálcio, como próximos a canais e locais de liberação de retículos endoplasmático (BRINI, 2003). As mitocôndrias podem inibir através de “feedback” negativo canais liberadores de cálcio estimulados por cálcio, sequestrando-o rapidamente. Dissipando os microdomínios de cálcio, as mitocôndrias podem tamponar a entrada/liberação do cálcio, sequestrando-o rapidamente e liberando-o lentamente (HOTT *et al.*, 1997).

I.6. Mecanismos transportadores de cálcio em crustáceos e seus bloqueadores

Um modelo proposto por WHEATLY e colaboradores (2002a, b) para o transporte epitelial de cálcio nos epitélios das brânquias, intestino e glândulas antenais sintetiza o transporte de cálcio da água/lúmen para o meio intracelular (através da membrana apical) e do meio intracelular para a hemolinfa (através da membrana basolateral). O influxo unidirecional (apical para basolateral) de cálcio (brânquias e hepatopâncreas na pós-muda, hipoderme na pré-muda e glândulas antenais no intermuda) ocorre passivamente em favor do gradiente de concentração por difusão facilitada mediada por trocador $\text{Ca}^{2+}/n\text{Na}^{+}$ (ou H^{+}), eletroneutros ou eletrogênicos, e via difusão simples por um canal para cálcio sensível a verapamil e nifedipina. O efluxo ativo basolateral envolve uma cálcio ATPase dependente de calmodulina e sensível a vanadato (PMCA) de alta afinidade e baixa capacidade e um trocador (NCX) $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$, eletroneutro ou eletrogênico, sensível a amiloride, de baixa afinidade e alta capacidade, mantida pela $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPase. O efluxo unidirecional (basolateral para apical) de cálcio (hepatopâncreas na pré-muda e hipoderme na pós-muda) pode envolver um canal para cálcio sensível a verapamil e o reverso dos mecanismos já descritos e potencialmente processos ativos de mudança de posição, como PMCA na membrana apical.

O transportador eletrogênico $1\text{Na}^{+}/2\text{H}^{+}$ possui uma alta afinidade pelo cálcio e de fato ele compete pelos sítios ligantes do trocador, servindo primariamente para regulação do cálcio (AHEARN & ZHUANG, 1996; ZHUANG & AHEARN, 1996, 1998). Está presente na borda em escovas de membranas de vesículas de brânquias, epitélio gastro-intestinal e glândula antenal de crustáceos (AHEARN & CLAY, 1989; AHEARN & FRANCO, 1990, 1991; AHEARN *et al.*, 1990). Pelo menos 4 funções pode ser citadas

para esse trocador: acidificação luminal, transporte transcelular de cálcio e sódio, tomada e seqüestro de cálcio e desintoxicação de metais pesados (AHEARN *et al.*, 2001). Utilizando inibidores derivados do amiloride, que interagem especificamente no trocador, agindo não competitivamente com o cálcio e competitivamente com sódio e previamente utilizados em estudos com vesículas de membranas basolateral de *Artemia* (CHEON & REEVES, 1988), WHEATLY e colaboradores (2002b) observaram que na glândula antenal o benzamil foi inibitório abaixo de concentrações de 100 μM e acima disso foi estimulatória e não apresentou efeito no hepatopâncreas. Já a quinacrina foi inibitória no hepatopâncreas em baixas concentrações e estimulatória em altas e não apresentou efeito na glândula antenal. Esses resultados sugerem que a inibição da NCX pode ser tecido e/ou membrana específicos.

Quando WHEATLY (1999) comparou diferentes espécies de crustáceos em relação aos transportadores presentes na membrana basolateral, verificou que a PMCA apresenta maior afinidade pelo cálcio em todos os tecidos em relação ao NCX, que por sua vez apresenta uma maior capacidade (velocidade máxima de transporte), demonstrando que em baixas concentrações de cálcio intracelular ($< 100\text{-}250\text{ nM}$), a PMCA predomina no efluxo, estando totalmente saturada a $1\mu\text{M}$ de Ca^{2+} , enquanto em altas concentrações de cálcio intracelular ($> 250\text{ nM}$) há predomínio do NCX, sugerindo que a ATPase atua principalmente na manutenção rotineira das concentrações de cálcio, enquanto o trocador participa efetivamente do transporte de altas concentrações de cálcio durante a muda.

Os modelos utilizados para osmorregulação e transporte de Ca^{2+} através de membranas celulares em água doce empregam outros crustáceos, principalmente lagostim (WHEATLY, 1999; WHEATLY *et al.*, 2001; GREENAWAY, 1974) e utilizam principalmente vesículas. Poucos estudos abordando regulação osmo-iônica de caranguejos verdadeiramente dulcícolas estão disponíveis (PEQUEUX & GILLES, 1977; SPARKS & GREENAWAY, 1984; GREENAWAY, 1981; SILVESTRE *et al.*, 2002; SILVESTRE *et al.*, 2004; SILVESTRE *et al.*, 2005) e são ainda mais escassos trabalhos abordando osmorregulação de *D. pagei* (ONKEN & MCNAMARA, 2002; WEIHRAUCH *e. al.*, 2004; MCNAMARA *et al.*, 2005; AMADO *et al.*, 2006; AUGUSTO *et al.*, 2007). Por tratar-se de um organismo ainda não estudado em relação ao transporte de Ca^{2+} através de membrana e possuir a particularidade de habitar um meio com baixa concentração osmótica ($\sim 0,5 \text{ mOsm.Kg}^{-1}$), estes devem apresentar estratégias adaptativas para tomada e conservação de íons, constituindo-se, portanto, de um excelente modelo para a abordagem dos mecanismos transportadores de cálcio.

II. Objetivos

1. Avaliar o fluxo de cálcio em células isoladas de hepatopâncreas de *D. pagei*, enfocando os mecanismos transportadores transmembrânicos.
2. Verificar o efeito do ATP extracelular na concentração intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) e uso de inibidores.
3. Verificar o efeito do pulso de Ca^{2+} em células depletadas de Ca^{2+} .
4. Verificar a resposta de células isoladas de hepatopâncreas a estímulos externos de Ca^{2+} , ATP e incubação em meio livre de Ca^{2+} .

III. Materiais e Métodos

III.1. Modelo Biológico

O caranguejo dulcícola *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 (DECAPODA, TRICHODACTYLIDAE) distribui-se na América do Sul e Central desde o sul do México até a Argentina, com a maioria das espécies ocorrendo no Brasil (MAGALHÃES, 1991). O ciclo de vida do caranguejo *D. pagei* é caracterizado por um desenvolvimento larval abreviado, eclodindo juvenis muito parecidos com os adultos, mostrando que esses animais são antigos invasores da água doce, visto que apresentam independência reprodutiva de água do mar ou salobra (AUGUSTO, 2005). Essas características são muito similares aos crustáceos de água doce mais estudados até agora, o lagostim.

Dilocarcinus pagei, assim como outros crustáceos de água doce, é um hiperosmorregulador (PÉQUEUX, 1995) mantendo a osmolalidade da hemolinfa em torno de 390 mOsm.Kg⁻¹ e concentrações de cálcio próximas a 10mmol.L⁻¹ (ONKEN & MCNAMARA, 2002). Os mecanismos fisiológicos de regulação osmótica nesses animais foram estudados somente por Onken e McNamara (2002) e WEIHRAUCH e colaboradores (2004). Em geral, estes animais possuem a osmolalidade da hemolinfa bastante reduzida, e mantem valores baixos da concentração do íon Na⁺ (190 mM), comparando-se com outros caranguejos dulcícolas (veja tabela em ONKEN E MCNAMARA, 2002). Estes resultados demonstram que esses animais se encontram bem adaptados à água doce, pois desse modo diminuem o gradiente osmótico e iônico em relação ao ambiente externo, diminuindo gastos energéticos com a captura de íons. Os animais também apresentam assimetria nas lamelas branquiais (ONKEN E

MCNAMARA, 2002), onde o transporte de Na^+ e Cl^- ocorre nas lamelas proximais e distais, respectivamente. Essa assimetria e independência entre os dois transportadores para a retirada dos principais osmólitos da hemolinfa desses animais, demonstra mais uma característica desses animais que sugerem ser antigos invasores da água doce, pois a osmorregulação de cada íon é feita independentemente.

III.2. Coleta e manutenção dos animais

Machos de *D. pagei* foram adquiridos de um vendedor na cidade Nova Granada-SP, coletados com auxílio de peneiras no Rio Tietê ao redor do município de Mendonça-SP e transportados em sacos úmidos contendo “aguapés” (*Eichornia crassipes*).

Os animais foram aclimatados no biotério do Instituto Presbiteriano Mackenzie em tanques contendo água doce com aeração constante e acesso livre ao ambiente seco, com fotoperíodo e temperatura natural, onde permaneceram por no mínimo uma semana antes da realização dos experimentos. Foi ofertado alimento uma vez ao dia no período da manhã (ração para Goldfish Plus Color®, Hai Feng), inclusive durante a realização dos experimentos.

III.3. Obtenção das células de hepatopâncreas: uma nova metodologia

O principal método descrito na literatura para a o isolamento de células de hepatopâncreas de crustáceos (AHEARN *et al.*, 2001)(AHEARN *et al.*, 2001) são utilizados para a obtenção de vesículas e mostram-se demasiadamente agressivos para as células de hepatopâncreas de *D. pagei*., que apresentaram baixa viabilidade (<40%) quando testou-se essa metodologia. Então, desenvolveu-se uma nova metodologia para essa finalidade.

Machos com pelo menos 4,50 cm de largura de carapaça foram anestesiados por resfriamento (0° C por 10 minutos). A carapaça foi removida para expor os órgãos e com o auxílio de uma pinça todo o hepatopâncreas foi retirado (2-2,5 g de tecido úmido) e colocado em um béquer de 80mL contendo 40mL de tampão fisiológico livre de cálcio e magnésio (TAMPÃO 1), sendo lavado por 2 vezes. Então, em 40mL do tampão 1 foram adicionados 400µL de PSMF estoque 100mM (em etanol 100%, concentração final de 1mM). O béquer contendo o tecido foi colocado em outro béquer de 1000mL com gelo e com o auxílio de uma barra magnética (3,5 cm de comprimento) e um agitador magnético (Cimarec 2 Barnstead modelo SP46925 – velocidade 2) foi suavemente agitado por 30 minutos. O material foi filtrado em malha de 200 µm com o auxílio de um funil em um tubo de 50mL (BD Falcon) e mantido em gelo. O mesmo procedimento foi adotado por mais duas vezes consecutivas com o material que ficou retido na malha. Uma parte das células precipitou naturalmente, sendo coletadas com pipetas de transferência e armazenadas em tubos de 15 mL (BD Falcon) mantidos em gelo. O sobrenadante foi centrifugado (0°C) a 30g por 4 minutos (Eppendorf 5804R). O pellet foi coletado com pipetas de transferência e armazenado no tubo de 15 mL mantido em gelo. Com isso, obtém-se células viáveis para os experimentos, sendo possível variar o tampão utilizado.

III.3.1. Células não depletadas na presença de 1mM de CaCl₂ externo (CND + Ca).

Após a extração em tampão fisiológico livre de cálcio e magnésio (Tampão 1), as células foram marcadas e mantidas em tampão fisiológico com 1mM de CaCl₂ (TAMPÃO 2), o qual também serviu para realização dos experimentos.

III.3.2. Células não depletadas na ausência de Ca²⁺ externo (CND - Ca).

Após a extração em tampão fisiológico livre de cálcio e magnésio (Tampão 1) as células foram marcadas em tampão fisiológico com 1mM de CaCl₂ (Tampão 2), mantidas em tampão fisiológico livre de cálcio e magnésio (Tampão 1), o qual serviu para a realização dos experimentos.

III.3.3. Células depletadas na ausência de Ca²⁺ externo (CD - Ca)

As células foram isoladas, mantidas e os experimentos foram realizados em tampão fisiológico livre de cálcio e magnésio (Tampão 1)

III.4. Soluções

Tampão 1: NaCl 190mM, KCl 10mM, NaHCO₃ 2mM, Na₂HPO₄ 2,5mM, Hepes 5mM, Glicose 5mM e EGTA 0,1mM.

Tampão 2: NaCl 190mM, KCl 10mM, NaHCO₃ 2mM, Na₂HPO₄ 2,5mM, Hepes 5mM, Glicose 5mM, MgCl₂ 2,5mM e CaCl₂ 1mM.

Todos os reagentes Sigma-Aldrich ou Amresco.

III.5. Contagem e viabilidade das células

A quantidade de células foi contada com o auxílio de um microscópio óptico de luz convencional (Zeiss) no aumento de 400 vezes em uma câmara de Neubauer. A viabilidade foi avaliada através da exclusão por Triplan Blue. Para tanto, em uma amostra de 200µL de células foram adicionados 20µL de “triplan blue” a 4%.(Sigma-Aldrich), sendo consideradas inviáveis as células coradas internamente.

III.6. Marcação com Fluo 3 AM

A uma alíquota de 3mL de suspensão de células ($1-2 \times 10^6$), foram adicionados 15 µL do marcador fluorescente Fluo 3 AM-éster (Molecular Probes), estoque 1mM em DMSO (concentração final de ~5µM), juntamente com 150uL do inibidor de mecanismos de extrusão de ânions orgânicos (em especial derivados do ácido úrico), o *Probenecid* (estoque 100mM; concentração final de 1mM), para assegurar que mesmo em sua forma ativa e pouco permeável à membrana (ácido carboxílico) este permaneça no meio intracelular. Os tubos foram suavemente agitados por 45 minutos a 25 °C, protegidos da luz. A suspensão foi então centrifugada (25 °C) a 30g por 4 minutos. O pellet foi lavado por 2 vezes em tampão desejado para retirar o marcador que não penetrou nas células e ressuspenso em 3mL, sendo adicionados 150µL de probenecid estoque 100mM (concentração final de 1mM).

III.7. Calibração

Em um poço da placa de 96 poços com fundo transparente e laterais pretas (Corning Coaster) foram adicionados 200µL de suspensão de células (CND+Ca,

CND-Ca e CD-Ca) marcadas com Fluo-3. Para obter-se o a fluorescência mínima, as células foram lisadas com 5 µL do detergente Triton X-100 (Sigma-Aldrich), estoque 20% (concentração final de 0,25%) e então foram injetados 5 µL de EGTA (Sigma-Aldrich), estoque 200mM por 2 vezes. Em outro poço contendo 200 µL de suspensão de células (CND+Ca, CND-Ca e CD-Ca), foram adicionados 5 µL de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) estoque 20% (concentração final de 0,25%) e esperou-se 300 segundos até que a fluorescência atingisse valores máximos. Seguindo a recomendação do fabricante, a concentração de cálcio intracelular foi calculada de acordo com a fórmula:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \left(\frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \right)$$

Onde: $[Ca^{2+}]_i$: concentração de cálcio livre intracelular (µM)

Kd: constante de dissociação intracelular do marcador (0,39)

F: fluorescência medida em determinado tempo

F_{min}: fluorescência mínima (quando todo o marcador está livre)

F_{max}: fluorescência máxima (quando todo marcador está saturado, ligado ao Ca^{2+})

III.8. Experimentos com pulsos de ATP

Em um poço da placa de 96 poços com fundo transparente e laterais pretas (Corning Costar) foram adicionados 200µL de células (CND+Ca, CND-Ca e CD-Ca) marcadas com Fluo-3. As medidas de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro (FLX 800, Biotek) com excitação a 510 nm e emissão a 530 nm.

A intensidade de fluorescência foi obtida a cada segundo, sendo que nos primeiros trinta segundos foi obtida a fluorescência inicial. Então foram injetados 5 μ L de ATP (Sigma-Aldrich) estoque 40mM (concentração final de 1mM), sendo obtidos dados por mais 270 segundos (tempo total de 300 segundos). Os bloqueadores foram utilizados de acordo com III.10.

III.9. Experimentos com pulso de CaCl_2

Em um poço da placa de 96 poços com fundo transparente e laterais pretas (Corning Costar), foram adicionados 200 μ L de células depletadas (CD-Ca) marcadas com Fluo-3. As medidas de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro (FLX 800, Biotek) com excitação a 510 nm e emissão a 530 nm. A intensidade de fluorescência foi obtida a cada segundo, sendo que nos primeiros trinta segundos foi obtida a fluorescência inicial. Então foram injetados 5 μ L de CaCl_2 (Sigma-Aldrich) estoque 40mM (concentração final de 1mM) ou estoque 400mM (concentração final de 10mM), sendo obtidos dados por mais 150 segundos (tempo total de 180 segundos). Os bloqueadores foram utilizados de acordo com III.10.

III.10. Bloqueadores

Para os experimentos com Vanadato (Ortovanadato de Sódio, Sigma-Aldrich), 10 μ L do estoque 200mM em água ultra pura (concentração final 10mM) foram adicionados antes do início do experimento ao poço contendo 200 μ L de suspensão de células..

Para os experimentos com Amiloride (Sigma-Aldrich) 2 μ L do estoque 200mM em DMSO (concentração final 2mM) foram adicionados antes do início do experimento ao poço contendo 200 μ L de suspensão de células .

Para os experimentos com Verapamil (Sigma-Aldrich), 2 μ L do estoque 100mM em água ultra pura (concentração final 1mM) foram adicionados antes do início do experimento ao poço contendo 200 μ L de suspensão de células.

III.11. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos a um teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), sendo considerados com distribuição normal. Então ANOVA paramétrica foi utilizada para comparar 3 ou mais grupos e teste t para comparação entre 2 grupos. O testes foram realizados através do software SigmaStat versão 3.1 (Systat).

IV. Resultados

IV.1 Efeito do Pulso de ATP

IV.1.1 Grupo 1 – Efeito do ATP (1mM) em células não depletadas isoladas de hepatopâncreas na presença de 1mM de CaCl_2 externo (CND + Ca).

Figura 1. Efeito do pulso de ATP (1mM) na variação da concentração de cálcio intracelular (ΔCa_i – ηM) em relação ao tempo (s), na presença de 1mM de CaCl_2 externo em células isoladas de hepatopâncreas, não depletadas de Ca^{2+} . (A) Controle (n=10); (B) Efeito do ATP na presença de 10mM de Vanadato (n=7); (C) Efeito do ATP na presença de 2mM de Amiloride (n=8); (D) Efeito do ATP na presença de 1mM de Verapamil (n=7). Os símbolos * e + denotam diferenças significativas ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,005$, respectivamente) em relação ao tempo inicial (0s) (ANOVA).

A Figura 1A demonstra que o pulso de 1mM de ATP na presença de 1mM de CaCl_2 externo causou uma queda de $11,04 \pm 1,24 \text{ } \eta\text{M}$ (média $\pm$ e.p.m) (n=10) na concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}]_i$), que foi recuperada após 15 segundos. Vanadato (10mM) inibiu completamente a queda na concentração de cálcio intracelular e após 195 segundos a elevou para valores acima da concentração inicial, atingindo um máximo de $11,81 \pm 1,83 \text{ } \eta\text{M}$ (n=7; **Figura 1B**). Não houve diferença significativa na concentração de cálcio intracelular quando na presença de 2mM de Amiloride (n=8) (**Figura 1C**). A **Figura 1D** demonstra que na presença de 1mM de Verapamil ocorreu uma queda de $12,94 \pm 1,73 \text{ } \eta\text{M}$ na concentração de cálcio intracelular e que o inibidor retardou a recuperação do valor inicial até o tempo de 135 segundos (n=7).

Figura 2. Comparação do efeito do pulso de ATP (1mM) na variação da concentração de cálcio intracelular (ΔCa_i – nM) em relação ao tempo (s), na presença de 1mM de CaCl_2 externo em células não depletadas isoladas de hepatopâncreas nos diferentes tratamentos (controle, 10mM de Vanadato, 2mM de Amiloride, 1mM de Verapamil). Os * denotam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA). As barras de erro foram omitidas para melhor visualização. Para comparação entre os grupos foram escolhidos os tempos de 0, 15, 31, 45, 90, 150, 210 e 300s.

A **Figura 2** demonstra que o pulso de ATP (1mM) na presença de 1mM de CaCl_2 externo apresentou diferenças significativas de acordo com os diferentes tratamentos. Quando comparados ao controle, vanadato e amiloride inibiram completamente a queda na concentração de cálcio intracelular. A concentração de cálcio intracelular na presença de vanadato se manteve sempre elevada em relação ao controle. Verapamil exibiu uma queda na concentração de cálcio intracelular semelhante ao controle, porém, essa concentração se manteve abaixo da concentração do grupo controle até 150 segundos. D

IV.1.2. Grupo 2 – Efeito do ATP (1mM) em células não depletadas isoladas de hepatopâncreas na ausência de Ca^{2+} externo (CND - Ca).

Figura 3. Efeito do pulso de ATP (1mM) na variação da concentração de cálcio intracelular ($\Delta \text{Cai} - \eta \text{M}$) em relação ao tempo (s), na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) em células não depletadas isoladas de hepatopâncreas. (A) Controle (n=4); (B) Efeito do ATP na presença de 10mM de Vanadato (n=4); (C) Efeito do ATP na presença de 2mM de Amiloride (n=9); (D) Efeito do ATP na presença de 1mM de Verapamil (n=4). Os símbolos *, + e # denotam diferenças significativas ($p \leq 0,001$, $p \leq 0,005$ e $p \leq 0,05$, respectivamente) em relação ao tempo inicial (0s) (ANOVA).

A **Figura 3A** demonstra que o pulso de 1mM de ATP na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) em células isoladas de hepatopâncreas causou uma queda de $16.72 \pm 1,44 \text{ } \eta\text{M}$ na concentração de cálcio intracelular, que foi recuperada após 30 segundos (n=4). Na presença de 10mM de vanadato a queda foi de $5,09 \pm 0,57 \text{ } \eta\text{M}$ e na presença de amiloride a queda foi de $3.37 \pm 0,87 \text{ } \eta\text{M}$ (n=4 e n=9, respectivamente). A recuperação do valor inicial na concentração de cálcio intracelular ocorre após 15 segundos ao pulso de ATP para o vanadato, e imediatamente após ao pulso de ATP para o amiloride (**Figuras 3B e 3C**). A **Figura 3D** mostra que a queda na concentração de cálcio intracelular na presença de 1mM de Verapamil foi de $15,02 \pm 1,78 \text{ } \eta\text{M}$ (n=4) e que a concentração inicial de cálcio foi recuperada imediatamente após a queda.

Figura 4. Comparação do efeito do pulso de ATP (1mM) na variação da concentração de cálcio intracelular (ΔCa^{2+}_i – nM) em relação ao tempo (s) na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) em células não depletadas isoladas de hepatopâncreas nos diferentes tratamentos (controle, 10mM de Vanadato, 2mM de Amiloride, 1mM de Verapamil). Os * denotam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA). As barras de erro foram omitidas para melhor visualização. Para comparação entre os grupos foram escolhidos os tempos de 0, 15, 31, 45, 90, 150, 210 e 300s.

A **Figura 4** demonstra que o pulso de ATP (1mM) na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) apresentou diferenças significativas de acordo com os diferentes tratamentos. Vanadato e Amiloride inibiram a queda na concentração intracelular de cálcio em ~ 70% e ~80%, respectivamente. Porém na presença de amiloride a concentração intracelular de cálcio se manteve acima do concentração controle até os 90 segundos. Verapamil não apresentou efeito quando comparado ao controle.

IV.1.3. Grupo 3 – Efeito do ATP (1mM) em células depletadas isoladas de hepatopâncreas na ausência de Ca^{2+} externo (CD - Ca).

Figura 5. Efeito do pulso de ATP (1mM) na variação da concentração de cálcio intracelular (ΔCa_i – nM) em relação ao tempo (s) na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) em células depletadas isoladas de hepatopâncreas. (A) Controle (n=5); (B) Efeito do ATP na presença de 10mM de Vanadato (n=4); (C) Efeito do ATP na presença de 2mM de Amiloride (n=6); (D) Efeito do ATP na presença de 1mM de Verapamil (n=5). Os símbolos * e # denotam diferenças significativas ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,05$, respectivamente) em relação ao tempo inicial (0s) (ANOVA).

A **Figura 5A** demonstra que o pulso de 1mM de ATP na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) em células depletadas isoladas de hepatopâncreas causou

uma queda de $4,83 \pm 0,68 \text{ } \eta\text{M}$ na concentração de cálcio intracelular, que foi recuperada após 75 segundos (n=5). Vanadato (10mM) inibiu a queda causada pelo ATP (n=4) (**Figura 5B**). Na presença de 2mM de Amiloride ocorreu uma queda de $2,16 \pm 0,43 \text{ } \eta\text{M}$ na concentração de cálcio intracelular, que foi recuperada em seguida ao pulso (n=6) (**Figura 5C**). A **Figura 5D** mostra que na presença de 1mM de Verapamil a queda na concentração de cálcio intracelular foi de $4,98 \pm 0,46 \text{ } \eta\text{M}$, recuperada logo após ao pulso.

Figura 6. Comparação do efeito do pulso de ATP (1mM) na variação da concentração de cálcio intracelular ($\Delta\text{Ca}_i - \eta\text{M}$) em relação ao tempo (s) na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) em células depletadas isoladas de hepatopâncreas nos diferentes tratamentos (controle, 10mM de Vanadato, 2mM de Amiloride, 1mM de Verapamil). Os * denotam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA). As barras de erro foram omitidas para melhor visualização. Para comparação entre os grupos foram escolhidos os tempos de 0, 15, 31, 45, 90, 150, 210 e 300s.

A **Figura 6** demonstra que o pulso de ATP (1mM) na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) em células depletadas extraídas de hepatopâncreas apresentou diferenças significativas de acordo com os diferentes tratamentos. Vanadato inibiu completamente a queda na concentração intracelular de cálcio, enquanto o amiloride inibiu em 55% em relação ao controle. Para ambos, as concentrações se mantiveram diferentes do controle após 15 segundos ao pulso. Verapamil não apresentou efeito nas células depletadas.

IV.1.4 Comparação entre tratamentos: CND + Ca, CND - Ca e CD - Ca

Figura 7. Comparação entre o pulso de ATP (1mM) na variação da concentração de cálcio intracelular ($\Delta[Ca]_i$ – nM) em relação ao tempo (s) nos tratamentos dos diferentes grupos experimentais: células não depletadas com 1mM $CaCl_2$ externo (CND + Ca), células não depletadas – ausência de Ca^{2+} externo (CND - Ca) e células depletadas – ausência de Ca^{2+} (CD - Ca). **A.** Controle, **B.** Vanadato, **C.** Amiloride e **D.** Verapamil. * representa diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação a CND + Ca e # indica diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação a CND - Ca (ANOVA). Para comparação entre os tratamentos foram escolhidos os tempos de 0, 15, 31, 45, 90, 150, 210 e 300s.

A **Figura 7A** mostra que o pulso de ATP (1mM) em células não depletadas na ausência de Ca externo (Grupo 2) causou uma queda ~34% maior na concentração de cálcio intracelular quando comparadas as células não depletadas com Ca externo (grupo 1). Células depletadas apresentaram uma queda menor quando comparadas as células não depletadas (Grupos 1 e 2). A **Figura 7B** demonstra que quando na presença de 10mM de Vanadato, a queda na concentração de cálcio intracelular nas células não depletadas com Ca externo (grupo 1) foi totalmente inibida, enquanto em células não depletadas sem Ca externo (grupo 2) ocorreu um queda de ~5 η M e nas células depletadas ~1,5 η M. A **Figura 7C** demonstra que na presença de 2mM de Amiloride, o ATP (1mM) causou uma queda maior mas células não depletadas com Ca^{2+} externo (grupo 1) quando comparadas com as células não depletadas sem Ca^{2+} externo. As células depletadas (grupo 3) apresentaram uma queda significativamente menor que as não depletadas (Grupos 1 e 2). A **Figura 7D** mostra que na presença de Verapamil não há diferença estatística significativa na queda da concentração intracelular de cálcio entre células não depletadas sem Ca^{2+} externo (Grupo 1) e com Ca^{2+} externo (Grupo 2). No entanto ambos diferem das células depletadas, que apresentam uma queda da concentração de cálcio intracelular ~66% menor.

IV.2. Efeito do Pulso de CaCl_2

IV.2.1 Efeito do pulso de CaCl_2 (1mM) em células depletadas isoladas de hepatopâncreas.

Figura 8. Efeito do pulso de CaCl_2 (1mM) na variação da concentração de cálcio intracelular ($\Delta\text{Ca}_i - \text{nM}$) em relação ao tempo (s), na ausência de Ca^{2+} externo em células depletadas isoladas de hepatopâncreas, (A) Controle (n=6); (B) Efeito do pulso de Ca na presença de 10mM de Vanadato (n=4); (C) Efeito do pulso de Ca na presença de 2mM de Amiloride (n=4); (D) Efeito do pulso de Ca na presença de 1mM de Verapamil (n=6); (E) Efeito do pulso de Ca na presença de 10mM de Vanadato + 2mM de Amiloride + 1mM de Verapamil (n=4). Os * e # denotam diferenças significativas ($p \leq 0,001$ e $p \leq 0,05$), respectivamente, em relação ao tempo inicial (0s) (ANOVA).

A **Figura 8A** demonstra que o pulso de CaCl_2 (1mM) na ausência de Ca^{2+} externo (0,1 mM EGTA) em células depletadas extraídas de hepatopâncreas elevou a concentração de cálcio intracelular em $9,36 \pm 1,97 \text{ nM}$, mantendo-se elevada até o final do experimento (180s). Na presença de 10mM de Vanadato a concentração de cálcio intracelular elevou-se em $6,89 \pm 1,30 \text{ nM}$ (**Figura 8B**). A **Figura 8C** mostra que na presença de 2mM de Amiloride não ocorreu variação na concentração intracelular de cálcio até o tempo 130s, quando elevou-se em $6,62 \pm 1,45 \text{ nM}$, mantendo-se elevada até o final do experimento. A **Figura 8D** demonstra que na presença de 1mM de Verapamil, o pulso de 1mM de Ca causou um aumento imediato na concentração intracelular de cálcio de $5,88 \pm 1,2 \text{ nM}$, atingindo um máximo de $12,99 \pm 0,59 \text{ nM}$ ao final do experimento. Na combinação de 10mM de Vanadato + 2mM de Amiloride + 1mM de Verapamil, o pulso de 1mM de Ca não causou efeito até o tempo de 70 segundos, quando a concentração intracelular de cálcio elevou-se $7,77 \pm 0,16 \text{ nM}$ até o final do experimento (**Figura 8E**).

Figura 9. Comparação do efeito do pulso de CaCl_2 (1mM) na variação da concentração de cálcio intracelular (ΔCa_i – nM) em relação ao tempo (s) na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) em células depletadas isoladas de hepatopâncreas nos diferentes tratamentos (controle, 10mM de Vanadato, 2mM de Amiloride, 1mM de Verapamil, 10 mM de Vanadato + 2mM de Amiloride + 1mM de Verapamil). Os * denotam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA). As barras de erro foram omitidas para melhor visualização. Para comparação entre os grupos foram escolhidos os tempos de 0, 31, 40, 60, 90, 120 e 180s.

A **Figura 9** demonstra que o pulso de CaCl_2 (1mM) na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) em células depletadas extraídas de hepatopâncreas apresentou diferenças significativas de acordo com os diferentes tratamentos. Imediatamente após o pulso de 1mM de Ca (tempo 31s), Vanadato (10mM) e Amiloride (2mM) não apresentaram efeito na concentração de cálcio intracelular (semelhante ao controle), porém manteve-se ~47% abaixo em relação a concentração do controle até final do experimento. Verapamil não apresentou efeito imediatamente após o pulso de 1mM de Ca, porém manteve a concentração de cálcio intracelular ~37% abaixo da concentração do controle até 60 segundos, quando equipararam-se. A combinação de 10mM de Vanadato + 2mM de Amiloride + 1mM de Verapamil inibiu

em ~83% a elevação na concentração intracelular de cálcio imediatamente após o pulso e permaneceu abaixo da concentração até o final do experimento.

IV.2.2 Efeito do pulso de CaCl_2 (10mM) em células depletadas isoladas de hepatopâncreas.

Figura 10. Efeito do pulso de CaCl_2 (10mM) na variação da concentração de cálcio intracelular (ΔCa_i – nM) em relação ao tempo (s), na ausência de Ca^{2+} externo em células depletadas isoladas de hepatopâncreas, (A) Controle (n=6); (B) Efeito do pulso de Ca na presença de 10mM de Vanadato (n=5); (C) Efeito do pulso de Ca na presença de 2mM de Amiloride (n=6); (D) Efeito do pulso de Ca na presença de 1mM de Verapamil (n=6); (E) Efeito do pulso de Ca na presença de 10mM de Vanadato + 2mM de Amiloride + 1mM de Verapamil (n=5). Os * denotam diferença significativa ($p \leq 0,001$) em relação ao tempo inicial (0s) (ANOVA).

A **Figura 10A** demonstra que imediatamente após o pulso de CaCl_2 (10mM) na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) em células depletadas extraídas de hepatopâncreas, ocorreu um aumento na concentração de cálcio intracelular de $10,46 \pm 2,32 \text{ } \eta\text{M}$, atingindo um máximo de $36,32 \pm 3,35 \text{ } \eta\text{M}$ ao final do experimento (180s). Na presença de 10mM de Vanadato, imediatamente após o pulso de CaCl_2 (10mM), ocorreu uma elevação na concentração intracelular de cálcio de $14,50 \pm 2,55 \text{ } \eta\text{M}$, até um máximo de $51,79 \pm 5,74 \text{ } \eta\text{M}$ (**Figura 10B**). A **Figura 10C** demonstra que na presença de 2mM de Amiloride, imediatamente após o pulso de CaCl_2 (10mM) ocorreu um aumento na concentração de cálcio intracelular de $10,00 \pm 1,56 \text{ } \eta\text{M}$, atingindo um máximo de $23,37 \pm 1,47 \text{ } \eta\text{M}$ ao final do experimento (180s). A **Figura 10D** demonstra que na presença de 1mM de Verapamil, imediatamente após o pulso de CaCl_2 (10mM) ocorreu um aumento na concentração de cálcio intracelular de $13,64 \pm 2,10 \text{ } \eta\text{M}$, atingindo um máximo de $29,92 \pm 2,98 \text{ } \eta\text{M}$ ao final do experimento (180s). A combinação de 10mM de Vanadato + 2mM de Amiloride + 1mM de Verapamil inibiu a elevação inicial na concentração de cálcio intracelular (tempo 31s), porém após 40s elevou-se em $12,90 \pm 2,23 \text{ } \eta\text{M}$, até o máximo de $19,22 \pm 3,07 \text{ } \eta\text{M}$ após 180 segundos (**Figura 10E**).

Figura 11. Comparação do efeito do pulso de CaCl_2 (10mM) na variação da concentração de cálcio intracelular ($\Delta\text{Ca}_i - \text{nM}$) em relação ao tempo (s) na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) em células depletadas isoladas de hepatopâncreas nos diferentes tratamentos (controle, 10mM de Vanadato, 2mM de Amiloride, 1mM de Verapamil, 10 mM de Vanadato + 2mM de Amiloride + 1mM de Verapamil). Os * denotam diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (ANOVA). As barras de erro foram omitidas para melhor visualização. Para comparação entre os grupos foram escolhidos os tempos de 0, 31, 40, 60, 90, 120 e 180s.

A **Figura 11** demonstra que o pulso de CaCl_2 (10mM) na ausência de Ca^{2+} externo (0,1mM EGTA) em células depletadas extraídas de hepatopâncreas apresentou diferenças significativas de acordo com os diferentes tratamentos. Na presença de Vanadato (10mM), a concentração de cálcio intracelular foi aproximadamente ~ 31% maior que o controle no tempo 90 segundos, atingindo um máximo de ~42% no tempo 180 segundos. Na presença de Amiloride (2mM), a concentração de cálcio intracelular foi aproximadamente ~ 32% menor que o controle a partir dos 90 segundos, mantendo-se nesse patamar até o final do experimento. Verapamil (1mM) não apresentou efeito quando comparados ao controle. A combinação de 10mM de Vanadato + 2mM de Amiloride + 1mM de

Verapamil manteve a concentração de cálcio intracelular ~47% abaixo do controle até o final do experimento.

IV.2.3. Comparação entre tratamentos: Pulso de CaCl_2 1mM VS Pulso de CaCl_2 10mM

Figura 12. Comparação entre o pulso de Ca 1mM e 10mM na variação da concentração de cálcio intracelular ($\Delta\text{Ca}_i - \eta\text{M}$) em relação ao tempo (s) nos tratamentos dos diferentes grupos experimentais. A. Controle, B. Vanadato 10mM, C. Amiloride 2mM, D. Verapamil 1mM e E. combinação de Vanadato 10mM + Amiloride 2mM + Verapamil 1mM. Os * representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos (teste t). Para comparação entre os tratamentos foram escolhidos os tempos de 0, 31, 40, 60, 90 120 e 180s.

A **Figura 12A** mostra que ambos os pulsos de cálcio (1 e 10mM) no tempo 31 segundos elevaram a concentração intracelular de cálcio em células depletadas isoladas de hepatopâncreas a valores semelhantes. Porém ao longo do tempo, as células que receberam o pulso de 10mM de cálcio apresentaram concentração intracelular do íon estatisticamente mais elevada, atingindo uma diferença de $\sim 20\text{ }\mu\text{M}$. A **Figura 12B** demonstra que na presença de 10mM de Vanadato as células que foram submetidas ao pulso de cálcio de 10mM apresentaram uma concentração intracelular do íon $\sim 8\text{ }\mu\text{M}$ acima das submetidas ao pulso de 1mM no tempo 31 segundos, diferença que elevou-se até $\sim 42\text{ }\mu\text{M}$ ao final do experimento. A **Figura 12C** demonstra que na presença de 2mM de amiloride as células que foram submetidas ao pulso de cálcio de 10mM apresentaram uma concentração intracelular do íon $\sim 6,4\text{ }\mu\text{M}$ acima das submetidas ao pulso de 1mM no tempo 31 segundos, diferença que elevou-se até $\sim 16\text{ }\mu\text{M}$ ao final do experimento. A **Figura 12D** demonstra que na presença de 1mM de Verapamil as células que foram submetidas ao pulso de cálcio de 10mM apresentaram uma concentração intracelular do íon $\sim 8\text{ }\mu\text{M}$ acima das submetidas ao pulso de 1mM. Essa diferença elevou-se a $\sim 17\text{ }\mu\text{M}$ ao final do experimento. A **Figura 12E** demonstra que na presença de 10mM de Vanadato + 2mM de Amiloride + 1mM de Verapamil, as células que foram submetidas ao pulso de cálcio de 10mM apresentaram uma concentração intracelular do íon $\sim 9\text{ }\mu\text{M}$ acima das submetidas ao pulso de 1mM. Ao longo do tempo, as células que receberam o pulso de 10mM de cálcio apresentaram concentração intracelular do íon mais elevada, atingindo uma diferença de $\sim 11,5\text{ }\mu\text{M}$.

V. Discussão

V.1. Efeito do ATP – Visão Geral

De maneira geral o pulso de ATP causou uma queda na concentração intracelular de cálcio, de rápida duração (50 s), que foi ou não recuperado durante o tempo dos diferentes experimentos (Figuras 1A, 2A e 3A). Esse efeito pode ter ocorrido em função da sua atuação na Ca^{2+} -ATPase (PMCA), provocando um efluxo do íon Ca^{2+} . Em mamíferos, a presença Ca-ATPases em membranas celulares já é bem caracterizada, como demonstrou, por exemplo, SIDKAR e colaboradores (1991) estudando espermatozóides de caprinos, no qual o efluxo do íon atinge um máximo quando o ATP está na concentração de 4mM. Além disso, Ca-ATPases são conservadas em outros tecidos de mamíferos como mucosa intestinal (MARTIN *et al.*, 1979), túbulos renais (PARKINSON & RADDE, 1969), eritrócitos (SCHAATZMANN & VICENZI, 1971; NIGGLI *et al.*, 1979) e cérebro (NAKAMARU *et al.*, 1967; BERL & PUSZKIN, 1970; ROBINSON, 1976) (ref D1). Em vesículas preparadas a partir de membranas basolaterais de células de hepatopâncreas de lagostas (*Homarus americanus*), o transporte de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi significativamente maior quando na presença de ATP, sendo reduzido quando na presença de 100 μM de vanadato (ZHUANG & AHEARN, 1998). Além disso, na presença de diferentes concentrações externas do íon, o transporte mostrou-se saturável, indicando uma dependência por outro substrato além do próprio cálcio. Com isso sugeriu-se que o transporte é realizado por uma Ca-ATPase do tipo P (ZHUANG & AHEARN, 1998). A existência de Ca-ATPases também é relatada em células de hepatopâncreas e tecido nervoso de crustáceos dendobranquiados (*Metapenaeus monoceros*, pop. “pitus”) em estudos sobre inibição com organofosforados (SRINIVASULU & RAO, 1990). Também estão disponíveis

estudos relatando que as Ca-ATPases em holotúrios (*Ludwigothurea grisae*, pop. “pepinos do mar”), diferem das presentes em mamíferos por não serem estimuladas por lítio (LANDEIRA-FERNANDEZ *et al.*, 2000).

Um outro modo de ação do ATP nas células pode ser através da sinalização via receptores purinérgicos P2Y, que são responsáveis por diversas vias de sinalização, incluindo a via IP₃, que em última consequência leva a liberação de cálcio do retículo endoplasmático, elevando a concentração de cálcio intracelular (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998), como relatado em células da microglia (MCLARNON, 2005). Esse não parece ser o caso para células de hepatopâncreas de *D. pagei* aqui estudadas. A presença de receptores purinérgicos P2Y poderia ser investigada em mais detalhes utilizando-se de outros agonistas como ADP, UTP, UDP e GTP

Nesse estudo, a recuperação da concentração intracelular de cálcio a valores iniciais pode ter ocorrido em razão do influxo de cálcio presente no meio externo, e/ou liberação de estoques intracelulares, a ser discutido abaixo.

V.1.1. Efeito do Vanadato e participação da Ca-ATPase (PMCA) no efluxo de Ca^{2+}

Quando as células de hepatopâncreas de *D. pagei* foram submetidas ao pulso de 1mM de ATP na presença de vanadato, um inibidor inespecífico para ATPases do tipo P, ocorre uma inibição total (Figuras 1B e 5B) e parcial (Figura 3B) na queda da concentração intracelular de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), demonstrada na ausência de inibidores (Figuras 1A, 3A e 5A). Em células não depletadas incubadas com 1mM de CaCl_2 externo (CND + Ca) ocorre uma elevação $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a níveis acima do inicial (Figura 1B), enquanto a leve queda na concentração em células não depletadas incubadas em meio livre de cálcio (CND – Ca) é rapidamente recuperada. Esses dados reforçam a idéia de que o efluxo de Ca^{2+} é estimulado por um mecanismo dependente de ATP sensível a vanadato. Em crustáceos já foi demonstrado a presença de um transportador de Ca^{2+} dependente de ATP, que pode ser inibido por vanadato em células de hepatopâncreas, brânquias e glândulas antenais (WHEATLY *et al.*, 1999; WHEATLY *et al.*, 2001; WHEATLY *et al.*, 2002) e que foi caracterizado como uma PMCA3 (WHEATLY *et al.*, 2004). A inibição por vanadato, estímulo por ATP e presença de PMCA em tecidos de outros crustáceos são fortes evidências para inferir a presença de uma Ca-ATPase em membranas de células de *D. pagei*.

Em outros invertebrados existem relatos da utilização de vanadato para caracterização de PMCA. DIPOLO (1979) e colaboradores demonstraram que o vanadato inibiu completamente o transporte de cálcio desacoplado e dependente de ATP em axônios gigantes de lula, de maneira reversível e dose dependente ($\text{IC}_{50} = 7 \mu\text{M}$). COLLINS & THOMAS (2001) relatam também o uso de vanadato como inibidor da PMCA em caramujos (*Helix aspersa*).

O mesmo ocorre para diferentes tecidos/células em vertebrados. Em espermatozóides de caprinos 150 μM de vanadato são suficientes para inibir a Ca-ATPase dessas células (SIDKAR *et al.*, 1991). A cinética da inibição da PMCA pelo vanadato em eritrócitos foi descrita por BOND & HUDGINS (1978). TIFFERT & LEW (2001) ressaltam a utilização do vanadato como uma ferramenta valiosa na inibição da PMCA, apesar de conhecido como um inibidor não específico para ATPases Tipo-P, pois com 1mM demonstram uma inibição de 99,7% da PMCA em eritrócitos humanos em menos de 15 segundos. Em vesículas preparadas a partir de células de íris de coelho, o vanadato inibiu o transporte de cálcio dependente de ATP de modo dose dependente, sendo que em concentrações de 10^{-4} M, foi observado um máximo de inibição em torno de 70% (SACCI & DELAMERE, 1988). Em linfócitos T de camundongos, o transporte de cálcio foi inibido em 30% quando na presença de vanadato, que foi atribuído ao seu efeito na PMCA, pois, na presença de inibidores para outros transportadores (ouabaína: $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase - mitocôndria: oligomicina e azida sódica - SERCA: tapsigargina) não ocorreu redução no transporte de cálcio (TELFORD & MILLER, 1996). SEPÚLVEDA e colaboradores (2004), comprovaram a presença de PMCA em cerebelo de porcos utilizando vanadato como inibidor do transporte ativo de cálcio, e complementando os ensaios enzimáticos com imunolocalização da ATPase.

V.1.2. Efeito do amiloride e participação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) no fluxo de Ca^{2+}

Amiloride inibiu completamente a queda da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ após o pulso de ATP em CND + Ca (Figura 2) e parcialmente em CND – Ca (Figura 4) e CD – Ca (Figura 6), sendo recuperada nesses tratamentos. Esses resultados sugerem que (I) o amiloride pode estar inibindo a Ca-ATPase e/ou (II) o efluxo do íon pode ocorrer por um outro mecanismo sensível a amiloride.

O modelo proposto para o transporte de Ca^{2+} em crustáceos foi baseado em estudos “*in vitro*” utilizando-se vesículas de espécies que habitam diferentes ambientes: hepatopâncreas e glândulas antenais de lagostas marinhas (AHEARN & FRANCO, 1993; AHEARN & ZHUANG, 1996; ZHUANG & AHEARN, 1996, 1998; FLIK & HAOND, 2000), brânquias posteriores de caranguejo (FLIK *et al.*, 1994) e glândulas antenais, brânquias e hepatopâncreas de lagostins de água doce (WHEATLY *et al.*, 1998, 1999). Esse modelo assume que o influxo de cálcio ocorre através do lado apical (em contato com o meio ou lúmen dos órgãos) a favor de um gradiente de concentração por difusão facilitada por trocador $\text{Ca}^{2+}/(n) \text{Na}^+$ (ou H^+) sensível ao amiloride que pode ser eletrogênico ou eletroneutro e através de um canal para Ca^{2+} sensível a verapamil. De fato esse trocador parece ser “polifuncional” e parece tratar-se do $2\text{Na}^+/\text{H}^+$ que é capaz de acomodar o Ca^{2+} ($2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ou $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$), além de Zn^{2+} e Cd^{2+} (AHEARN & ZHUANG, 1996; ZHUANG & AHEARN, 1996). O efluxo pelo lado basolateral (em contato com a hemolinfa) ocorre ativamente por uma Ca-ATPase sensível a vanadato de alta afinidade e baixa capacidade dependente de calmodulina e um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ eletrogênico ou eletroneutro de baixa afinidade e alta capacidade, mantida pela Na^+/K^+ ATPase.

Os dados de inibição por vanadato e amiloride sugerem que em células de hepatopâncreas de *D. pagei* o efluxo de cálcio parece ocorrer via Ca-ATPase sensível ao vanadato e via trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ conforme o modelo acima. Apesar da sensibilidade do trocador ao amiloride na membrana basolateral ainda não ter sido estudadas em crustáceos, a inibição do efluxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ por amiloride através do trocador em vesículas preparadas a partir de células cerebrais de rato é conhecida (SCHELLENBERG *et al.*, 1983). Estudos com brânquias (TOWLE, 1993; FLIK *et al.*, 1994) e glândulas antenais (AHEARN & FRANCO, 1993) de caranguejo sugerem mecanismos transportadores semelhantes aos de hepatopâncreas. Em um estudo a respeito da influência do pH no transporte de Na^+ utilizando-se *Daphnia*, observou-se a presença de um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ nesse pequeno crustáceo de água doce (GLOVER & WOOD, 2005).

Um estudo com epitélio intestinal de tilápia (*Oreochromis mosambicus*) demonstrou que o efluxo de cálcio em enterócitos ocorre através de um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que possui alta afinidade e capacidade ($K_m = 181\text{ }\mu\text{M}$; $V_{\text{max}} = 13.6\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) e uma Ca-ATPase, que possui maior afinidade e ~6x menor capacidade ($K_m = 27\text{ }\mu\text{M}$; $V_{\text{max}} = 2.17\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$; FLIK *et al.*, 1990). A Ca-ATPase presente na membrana de células isoladas de hepatopâncreas de lagosta também possui uma alta afinidade ($K_m = 65.8\text{ }\mu\text{M}$) e baixa capacidade (dados não comparáveis), enquanto o trocador possui uma baixa afinidade ($K_m = 20.17\text{ }\mu\text{M}$) e ~3x maior capacidade que a ATPase (ZHUANG & AHEARN, 1998). Tanto para enterócitos de tilápia quanto para células do hepatopâncreas de lagosta deduziu-se que

o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ é responsável pelo transporte massivo de cálcio, enquanto a Ca-ATPase realiza a manutenção rotineira (“housekeeping”) da $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

O trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ utiliza o gradiente eletroquímico dos íons para realizar o transporte, no entanto, os mesmos íons quando não transportados (e outros “fatores” como elucidado abaixo para o ATP) podem agir como moduladores catalíticos, influenciando a cinética de ativação. É o caso da inativação dependente de Na^+ intracelular, no qual o sódio parece se ligar a um domínio intracelular ocasionando um rearranjo na proteína, que nesse novo estado conformacional interage com os domínios de controle cinético do transportador (BLAUSTEIN & LEDERER, 1999) e também da estimulação catalítica por Ca intracelular, que ativa o modo de influxo de Ca do trocador (DiPolo, 1979). O domínio intracelular responsável pela modulação através de cálcio foi identificado por western blot em tecido cardíaco de mamíferos (LEVITSKY *et al.*, 1994).. O trocador possui um sítio ligante para cálcio de alta afinidade ($K_d < 1\mu\text{M}$) e outro sítio de baixa afinidade ($K_d > 100\mu\text{M}$), sendo o primeiro envolvida na modulação catalítica e o último na translocação do Ca^{2+} extracelular (BLAUSTEIN & LEDERER, 1999). Utilizando proteolipossomos (“vesículas”) preparadas a partir de células de músculo esquelético de lagosta, EISENRAUCH e colaboradores (2000) demonstraram que os sítios ligantes para cálcio possuem um K_d de 7-10 μM para a face intracelular e acima de 40 μM para a face extracelular e ainda que o cálcio deve se ligar ao domínio intracelular (K_d 0,6 μM) para que ocorra a ativação catalítica do trocador, semelhante ao que acontece com os trocadores presente em cardiomiócitos de mamíferos (PHILIPSON *et al.*, 1982; PHILIPSON & NISHIMOTO, 1982a,b,c), axônio gigante de lula (DiPOLO & BEAUGÉ,

1988; HILGEMANN, 1990) e músculo de cracas (RASGADO-FLORES & BLAUSTEIN, 1987; RASGADO-FLORES *et al.*, 1989; RASGADO-FLORES *et al.*, 1991; GONZALEZ-SERRATOS *et al.*, 1996; RASGADO-FLORES *et al.*, 1996; DESANTIAGO *et al.*, 2007). Já o trocador isolado de *Drosophila* e expresso em oócitos de sapo (*Xenopus*), difere dos demais, pois apresenta redução de atividade ocasionada por Ca^{2+} intracelular (HRYSHKO *et al.*, 1996).

Apesar do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ não utilizar energia direta da hidrólise do ATP para transportar Ca^{2+} (i.e. fosforilação não é necessária para cada ciclo do trocador), inclusive operando na sua ausência (DIPOLLO, 1976; BLAUSTEIN & SANTIAGO, 1977; NELSON & BLAUSTEIN, 1981), sabe-se que ele pode ser ativado por ATP (DIPOLLO, 1973, 1974, 1976). Na presença de compostos com terminal fosfato hidrolisáveis ocorre um aumento de afinidade pelo Ca^{2+} interno e Na^+ externo, ocasionando um estímulo no modo de operação de efluxo de Ca^{2+} (BLAUSTEIN, 1977).

De acordo com o modelo proposto pela parceria Ahearn/Zhuang (detalhado acima) para o influxo de cálcio, existe a participação de um canal para cálcio (comentado abaixo em V.1.3) e de um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que opera no modo de influxo de cálcio, sendo que sua direção depende principalmente dos gradientes de concentrações desses íons (BLAUSTEIN & LEDERER, 1999). A concentração intracelular de cálcio necessária para metade da ativação máxima ($K_{0.5}$) do modo de influxo de cálcio em axônios gigantes de lula (DIPOLLO, 1979; OSSES *et al.*, 1986; DIPOLLO & BEAUGÉ, 1988; DIPOLLO & BEAUGÉ, 1993a,b) e cardiomiócitos (KIMURA *et al.*, 1987; HILGEMANN 1990; HILGEMANN *et al.*, 1992a,b) é de $1\mu\text{M}$. Assumindo uma grande conservação desse trocador ao longo da escala filogenética, para a

concentração de repouso de cálcio intracelular ($\sim 100\text{--}400\text{ nM}$, dados não mostrados) nas células de hepatopâncreas de *D. pageni*, apenas uma pequena fração do trocador deve estar atuando dessa maneira. A presença de baixas concentrações de metais alcalinos no meio extracelular, entre eles o Na^+ , também pode ativar o modo de influxo de cálcio (BAKER *et al.*, 1969; BEAUGE & DIPOLO, 1991; GADSBY *et al.*, 1991; Fontana *et al.*, 1995), no entanto não parece ser o que ocorre com células de hepatopâncreas, já que seu lado apical está voltado para um meio preenchido com alimento, normalmente mais rico em Na e outros sais no caso de crustáceos terrestres e dulcícolas (ZANOTTO & WHEATLY, 2002; ZANOTTO *et al.*, 2004) e o lado basolateral está em contato direto com a hemolinfa, que possui aproximadamente 190 mM de Na^+ (ONKEN & MCNAMARA, 2002). A ativação do modo de influxo de cálcio do trocador pode ser especialmente importante para absorção de Ca^{2+} nas brânquias desse animal, já que estão em contato direto com o meio externo, que possui baixa concentração de Na^+ ($<0,5\text{ mM}$); no entanto esse não é o foco desse trabalho e esse aspecto deverá ser investigado em estudos futuros.

Considerando o alto gradiente de concentração de Na^+ (10^{-3} M) na hemolinfa e a baixa concentração de Ca^{2+} intracelular (10^{-7} M), pode-se inferir que nas condições estudadas uma das maneiras de atuação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ em células de hepatopâncreas de *D. pageni* é no modo de efluxo de cálcio. Porém para outras espécies de crustáceos existem dados que demonstram a atuação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ operando no modo de influxo de Ca^{2+} . A utilização de amiloride e seus análogos (quinacrina e benzamil) como bloqueador do NCX é relatada em vesículas de *Artemia*, no qual observou-se inibição da tomada de cálcio dependente de sódio com $\text{IC}_{50} = 240\text{ }\mu\text{M}$ (CHEON & REEVES, 1988). Em vesículas de membrana basolateral de

hepatopâncreas de lagostins, 1 μ M de quinacrina reduziu o influxo de cálcio em até 56%, enquanto o benzamil (30 μ M) inibiu em até 72% o transporte de cálcio em vesículas de membrana basolateral de glândulas antenais (WHEATLY *et al.*, 2002).

Também em junções neuromusculares (sinapses) de lagostins (*Procambarus clarkii*), um crustáceo de água doce, o trocador Na⁺/Ca²⁺ presente na membrana plasmática atua no modo de influxo de Ca, sendo a elevação na concentração intracelular de Na⁺, que pode ocorrer pela inativação da Na⁺/K⁺ ATPase, o principal responsável pela operação do trocador nesse modo, tornando-se outra fonte de entrada de Ca²⁺, que é regulado pelo efluxo do íon através de uma Ca-ATPase e tomada por mitocôndrias (BEAUMONT *et al.*, 2001; ZHONG *et al.*, 2001). A interação entre o trocador Na⁺/Ca²⁺ e Na⁺/K⁺ ATPase é bem estabelecida (BLAUSTEIN & LEDERER, 1999) e é importante para a função cardíaca (REUTER *et al.*, 2002; VERDONCK *et al.*, 2004) e células musculares de mamíferos (BORIN *et al.*, 1994; ARMON *et al.*, 2000a,b; DOSTANIC *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006). Em células de músculo liso de aorta e artérias mesentéricas de rato, a elevação da concentração intracelular de Na⁺ (seja por inibição da Na⁺/K⁺ ATPase por ouabaína, depleção de ATP ou diminuição da sua atividade pela remoção de K⁺ externo) causa uma menor atividade do trocador Na⁺/Ca²⁺, ocasionando a elevação da concentração intracelular de Ca²⁺, sugerindo a modulação do trocador pela Na⁺/K⁺ ATPase (MATCHHKOV *et al.*, 2007).

Mais uma vez a elevação da concentração intracelular de Na⁺ parece ser determinante para que o trocador passe a operar no modo de influxo de Ca: em glândulas salivares de barata (*Periplaneta americana*) estimuladas com dopamina.

Nesse caso, verificou-se uma elevação na concentração intracelular de Ca^{2+} , atribuída ao influxo do íon do meio extracelular através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que é precedida por aumento na concentração intracelular de Na^+ via cotransporte $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$. O efeito do neurotransmissor é abolido quando na ausência de Na^+ externo ou inibição do contransporte por bumetanide (10 μm) (HILLE & WALZ, 2006). Caso as células de hepatopâncreas de *D. pagei* sejam responsivas a dopamina, essa parece ser uma metodologia adequada para verificar a participação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no modo de influxo de Ca^{2+} no transporte do íon. KLOPPENBURG e colaboradores (2007) relatam um aumento dependente de voltagem na concentração de cálcio intracelular em neurônios de lagosta (*Panulirus interruptus*) após estímulo com dopamina. Neurônios dopaminérgicos foram localizados por imunohistoquímica nos órgãos-X de pedúnculos oculares de lagostins (*Procambarus clarkii*), sendo esse um possível neurotransmissor / neuromodulador nessa região (ALVAREZ *et al.*, 2004).

Nesse estudo, o ATP estimularia concomitantemente o efluxo de Ca^{2+} via Ca-ATPase e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (DiPOLO, 1973, 1974, 1976) que parece ser sensível ao amiloride.

V.1.3 Efeito do verapamil e participação de canais para Ca^{2+} no influxo Ca^{2+}

O(s) mecanismo(s) responsável (eis) pelo efluxo de cálcio nessas células não é (são) sensível (eis) ao verapamil. No entanto, esse inibidor retardou a recuperação da concentração intracelular do íon (Figura 1D), sugerindo que quando na presença de cálcio externo, ocorre um influxo de Ca através de um mecanismo sensível ao verapamil, que pode ser um canal do tipo L. FLECKENSTEIN (1983) e SPEEDING (1985) relatam em estudos farmacológicos a utilização do verapamil como inibidor para canais do tipo “L”, porém um estudo mais detalhado precisa ser realizado para evidenciar a natureza desse canal em células de hepatopâncreas de *D. pagei*, uma vez que esse inibidor é considerado de amplo espectro na atuação de canais para cálcio (GARCIA *et al.*, 2006). Em vesículas preparadas a partir de membranas basolaterais de células de hepatopâncreas de lagosta, a tomada de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi significativamente menor quando na presença de 50 μM de verapamil (ZHUANG & AHEARN, 1996).

A entrada capacitiva de cálcio (PUTNEY, 1986, 1997, 2001; BERRIDGE, 1995), é um mecanismo no qual o esvaziamento dos estoques intracelulares de Ca^{2+} sinalizam para a abertura de canais para cálcio na membrana plasmática (canais operados por estoque). Segundo PUTNEY (2003) esse mecanismo é ubíquo em células não excitáveis e garante que os canais operados por estoque permaneçam abertos até que os estoques intracelulares de cálcio tenham sido re-estabelecidos e uma vez ativados, permanecem abertos por um longo período de tempo quando na ausência do influxo de Ca^{2+} (CHAKRABARTI *et al.*, 1995; SHUTTLEWORTH & THOMPSON, 1996). CHAKRABARTI & CHAKRABARTI (2006) relatam que a entrada capacitiva de cálcio é responsável somente pelo preenchimento dos estoques intracelulares, impossibilitando a elevação da concentração no citosol. Propõem que o influxo de

cálcio também poderia ocorrer via canais TRP (*transient receptor potencial*), originalmente descobertos em *Drosophila* e amplamente relatados em mamíferos (para uma revisão veja VASQUEZ *et al.*, 2004; PERDERSEN *et al.* 2005), que são permeáveis a diversos cátions, entre eles o Ca^{2+} . A elevação na concentração intracelular (citossol) de Ca^{2+} atua como um feedback negativo no influxo via canais TRP (MULDON *et al.*, 1991; TAREILUS *et al.*, 1994; LINTSCHINGER *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2004), sugerindo um estado aberto persistente quando na ausência de influxo (CHAKRABARTI & CHAKRABARTI, 2006). Outro canal não seletivo a cátions já identificado em neurônios olfativos de lagostas (*Panilirus argus*) é dependente de Na^+ (“sodium gated channel”, SGC) e modulado por cálcio, que aumenta sua chance de abertura e possui um $K_{1/2}$ de 490 nM (BOBKOV & ACHE 2003). GAO & WHEATLY (2007) relatam a clonagem e sequenciamento do gene de um canal semelhante (“EcaC-like”) ao canal de Ca (EcAC) em epitélios de lagostins (*Procambarus clarkii*), possuindo ~80% e 60% de semelhança na sequência de aminoácidos dos canais para cálcio de peixes e mamíferos, respectivamente. Quando comparado com hepatopâncreas, a expressão do gene desse canal nas brânquias é 10x maior e na glândula antenal 15x maior em animais na intermuda, aumentando para 7 e 24x, respectivamente, na pós-muda, principalmente em regiões de fluxo unidirecional de Ca^{2+} , levando os autores a inferir que a expressão está relacionada com as taxas de influxo do íon.

Os resultados obtidos com células de hepatopâncreas de *D. pajei* sugerem que o influxo de Ca^{2+} é realizado por um canal sensível a verapamil. No entanto, não é possível inferir se trata-se de um canal operado por estoque e se o mecanismo de entrada capacitiva de cálcio está presente nessas células, ou se é semelhante ao sequenciado em lagostins ou ainda se é um canal TRP inespecífico para cátions.

Estudos eletrofisiológicos, farmacológicos e moleculares devem ser realizados para identificar a natureza desse canal.

V.1.4 Ausência de Ca^{2+} externo e participação dos estoques intracelulares de Ca^{2+}

Após o pulso de ATP, quando na presença de Ca^{2+} externo, as células recuperam a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em 15 segundos (Figura 1A), enquanto na ausência de Ca^{2+} essa recuperação ocorre após 30 segundos (Figura 3A). Já em células depletadas (que também não possuem Ca^{2+} no meio externo – Figura 5A) essa recuperação só ocorre após 45 segundos. Esses resultados sugerem que a recuperação mais rápida encontrada em CND + Ca pode ocorrer devido a somatória do influxo de cálcio do meio externo e liberação de Ca de estoques intracelulares. A queda na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causada pelo pulso de ATP em CND – Ca é seguida de uma recuperação dessa concentração, na qual não há efeito do verapamil (Figura 3D), ao contrário das CND + Ca (Figura 1D). Nesse caso as células foram incubadas em meio livre de cálcio externo, sugerindo que a recuperação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pode ter ocorrido através da liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares, um fenômeno bem caracterizado em células eucariontes (SMYTH *et al.*, 2006; BERRIDGE *et al.*, 2000). O mesmo ocorre em CD – Ca, além de apresentarem uma queda significativamente menor na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ quando comparadas as CND (+ ou – Ca^{2+}). Isso demonstra que nessas condições essas células podem estar com a concentração basal de Ca^{2+} (citossol) diminuída e/ou estoques intracelulares de Ca^{2+} depletados, tornando a recuperação ainda mais lenta.

Células de hepatopâncreas de *D. pagei* parecem ser sensíveis a concentração de Ca^{2+} extracelular. Quando na presença do íon (CND + Ca) ocorre uma queda maior na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ quando comparadas as CND – Ca. A ausência de Ca^{2+} externo pode ser um sinal para que as células regulem de maneira mais refinada sua concentração de Ca^{2+} intracelular, de modo que qualquer mecanismo que cause uma queda nessa

concentração seja atenuado/inibido nessas condições. Essa afirmação parece ser comprovada em células depletadas, que apresentaram uma queda significativamente menor na $[Ca^{2+}]_i$ quando comparadas as CNDs (Figura 7A), que pode ser devido ao próprio esgotamento dos estoques intracelulares, menor concentração basal (citossólica) de Ca^{2+} e/ou seus mecanismos de efluxo de íons já estarem inibidos/inativos para evitar uma perda ainda maior de Ca^{2+} .

V.2. Efeito do pulso de Ca^{2+}

Quando células são incubadas em meio livre de cálcio por um longo período, a adição de Ca^{2+} resulta em seu influxo para o citosol, sugerindo que nessas condições os estoques intracelulares estão depletados (MASON *et al.*, 1991; MONTERO *et al.*, 1991; RANDRIAMAMPITA & TSIEN, 1993). No entanto, em células T nas mesmas condições, ocorreu uma redução na concentração de cálcio intracelular basal (citosol) e os estoques permaneceram inalterados (CHAKRABARTI *et al.*, 1995). A redução em 30% na concentração de cálcio intracelular em células RBL-1 ativou espontaneamente o influxo de cálcio (KRAUSE, *et al.*, 1999). Não é claro se a exposição prolongada a um meio livre de cálcio irá alterar a concentração de cálcio intracelular basal (citosol) ou se irá depletar os estoques intracelulares (ou ainda ambos). No entanto a re-adição de Ca^{2+} ao meio externo parece sempre ocasionar o seu influxo, sendo direcionado diretamente aos estoques (veja discussão acima acerca de entrada capacitiva de cálcio) ou ao citosol. Considerando que em todos os experimentos nos quais foram utilizados pulsos de Ca^{2+} (Figuras 8 e 10) ocorreu a elevação da concentração intracelular do íon, fica claro que ao menos uma fração do cálcio fica retida no citosol na forma de Ca^{2+} livre, e a outra parte pode ou não ser direcionada para os estoques intracelulares. Dessa forma, incubar as células de hepatopâncreas de *D. pagei* por um período de tempo em meio livre de cálcio parece uma boa metodologia para estudar o influxo do íon.

V.2.1 Efeito do pulso de Ca^{2+} 1mM.

O pulso de 1mM de CaCl_2 causa uma elevação de $\sim 10\text{ nM}$ na $[\text{Ca}]_i$ (Figura 8A). O amiloride inibe em parte essa elevação até o tempo de 130s (Figura 8C), reforçando a hipótese de que o influxo de cálcio ocorre por um mecanismo sensível a esse bloqueador, que pode ser a um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, conforme modelo explicado anteriormente (seção V.1.2). Verapamil não inibiu completamente o influxo de Ca^{2+} (Figura 8D), porém quando comparado ao controle (Figura 9), observou-se que a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ permanece abaixo do controle até o tempo de 60s, o que pode sugerir que ao menos um dos mecanismos de influxo de Ca^{2+} nessas células é um canal sensível a verapamil, como explicado para o pulso de ATP (seção V.1.3). A combinação de inibidores (Figura 8E) demonstra que o influxo de Ca^{2+} pode ocorrer por mecanismos insensíveis aos mesmos, uma vez que em sua presença ainda há elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Não há explicação evidente para a menor elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ após o pulso de Ca^{2+} na presença de vanadato; não existem relatos na literatura que indiquem o uso de vanadato como bloqueador de algum mecanismo de influxo de Ca^{2+} . Dessa maneira o efeito do vanadato deverá ser investigado detalhadamente no futuro.

V.2.2 Efeito do pulso de Ca^{2+} 10mM.

O pulso de 10mM de CaCl_2 parece causar uma elevação na $[\text{Ca}]_i$ que possui 2 etapas distintas: uma rápida e imediata (fase I) elevação de $\sim 10\text{ }\mu\text{M}$ e outra mais lenta (fase II), que se estende de 40 a 180s de $\sim 35\text{ }\mu\text{M}$ (Figura 10A). Os inibidores parecem não afetar a fase I, sendo que seus efeitos são notados principalmente na fase II (Figura 11). Na presença de vanadato $[\text{Ca}]_i$ foi $\sim 42\%$ maior quando comparada ao controle, sugerindo que a Ca-ATPase dessas células pode estar inibida e todo o cálcio que entra nas células devido ao pulso de CaCl_2 está sendo acumulado no citosol. Na presença do amiloride a elevação da $[\text{Ca}]_i$ foi $\sim 32\%$ menor que o controle, sugerindo que uma parte do influxo de Ca^{2+} ocorre via mecanismo sensível a esse inibidor, conforme sugerido nas seção V.1.2 e acima. Inesperadamente, verapamil não apresentou efeito nesses experimentos (Figura 10D), o que pode sugerir que em altas concentrações de Ca^{2+} o influxo pode ocorrer por outros canais insensíveis a esse inibidor. A combinação de inibidores reduziu a elevação da $[\text{Ca}]_i$ a $\sim 10\text{ }\mu\text{M}$, que é a mesma variação encontrada na fase I e também na presença isolada do amiloride, sugerindo que os mecanismos de influxo de Ca^{2+} da fase II são sensíveis principalmente a esse inibidor.

V.3. Modelo proposto para transporte de cálcio em células de hepatopâncreas de *D. paguei*

Juntos os dados permitem sugerir um modelo para o fluxo de cálcio em células de hepatopâncreas de *D. paguei*: o influxo de cálcio do lúmen ou hemolinfa ocorre a favor de um gradiente de concentração por um canal (específico ou inespecífico) sensível ao verapamil e via trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sensível ao amiloride. O efluxo para o lúmen e hemolinfa ocorre contra um gradiente de concentração simultaneamente através de uma Ca-ATPase sensível ao vanadato, responsável pela manutenção rotineira (“housekeeping”) da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que também parece ser sensível ao amiloride (modo de efluxo de Ca^{2+}), que pode ser responsável pelo transporte massivo do íon, como por exemplo, durante as fases da muda, no qual Ca^{2+} é acumulado (pré-muda) ou direcionado para carapaça (pós-muda) do hepatopâncreas. Esse modelo está de acordo com o sugerido para o transporte de Ca^{2+} em crustáceos. A participação de estoque intracelulares parece estar envolvida na homeostase do cálcio nessas células.

VI. Conclusões

1. A exposição ao ATP externo causa uma redução na $[Ca^{2+}]_i$ que pode ter ocorrido pelo efluxo do íon através da estimulação de uma Ca-ATPase (PMCA) sensível ao Vanadato

2. O efluxo de Ca^{2+} parece ocorrer também via transportador sensível ao amiloride, não estando claro se trata-se de um trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX) ou trocador Na^+/H^+ (NHE) operando como $Ca^{2+}/(n) Na^+$.

3. O influxo de Ca^{2+} sensível ao verapamil provavelmente ocorre via canal, porém não está claro se trata-se da entrada capacitiva de cálcio, canais para cálcio mediados por Na^+ (Sodium Gated Channels), canais do tipo TRP (*transient receptor potencial*) ou ainda canais semelhantes a canais para cálcio, como já identificados em outros crustáceos.

4. A liberação de Ca^{2+} de estoque intracelulares parece ser importante para a regulação desse íon.

5. Quando células de hepatopâncreas são incubadas por um longo período em meio livre de cálcio parece ocorrer uma depleção dos estoques intracelulares. A re-introdução do íon no meio causa um influxo imediato, que em parte fica retido no citosol, ocasionando a elevação da $[Ca^{2+}]_i$

6. A nova metodologia proposta para o isolamento de células de hepatopâncreas se mostrou adequada, sendo aconselhável para obtenção de células viáveis e responsivas a estímulos extracelulares. Além disso, essa metodologia parece ser adequada para estudarem-se as vias de sinalização celular.

7. O modelo proposto para o transporte de cálcio em células isoladas de hepatopâncreas de *D. pageni* parece estar de acordo com os atuais modelos propostos para o transporte desse íon em outros crustáceos. No entanto, esse estudo evidencia quais podem ser os transportadores presentes na membrana dessas células, sendo que um estudo mais detalhado e focado em cada mecanismo de transporte poderá ser realizado para confirmação dos mesmos.

VII. Referências Bibliográficas

- ABBRACCHIO, M. P.;BURNSTOCK, G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? Pharmacol Ther, v.64, n.3, p.445-75. 1994.
- AHEARN, G. A.;FRANCO, P. Sodium and calcium share the electrogenic 2 Na(+)-1 H⁺ antiporter in crustacean antennal glands. Am J Physiol, v.259, n.5 Pt 2, p.F758-67. 1990.
- _____. Ca²⁺ transport pathways in brush-border membrane vesicles of crustacean antennal glands. Am J Physiol, v.264, n.6 Pt 2, p.R1206-13. 1993.
- AHEARN, G. A.;MANDAL, P. K.;MANDAL, A. Biology of the 2Na⁺/1H⁺ antiporter in invertebrates. J Exp Zool, v.289, n.4, p.232-44. 2001.
- AHEARN, G. A.;ZHUANG, Z. Cellular mechanisms of calcium transport in crustaceans. Physiol Zool, v.69, n.2, p.383-402. 1996.
- AL-MOHANNA, S. Y. R-cells and the digestive cycle in *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) Mar Biol, v.95, n.1, p.129-137. 1987.
- AL-MOHANA, S. Y.; NOTT, J. A. The accumulation of metals in the hepatopâncreas of the shrimp *Penaeus sem-sulcatus* de Haan (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. In: Halwagy, R.; Clayton, D. & Behbehani, M. (Eds.) Mar. Environ. Pollut. Kuwait: Kuwait University, 1985, p. 195-209.
- _____. B-Cells and digestion in the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda). J Mar Biol Assoc U.K., v.66, n.2, p.403-414. 1986.
- _____. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle Mar Biol, v.101, n.4, p.535-544. 1989.
- ÁLVAREZ, R. A.;VILLALOBOS, M. G. P.;ROSETE, G. C.;SOSA, L. R.;ARÉCHIGA, H. Dopaminergic Modulation of Neurosecretory Cells in the Crayfish. Cellular and Molecular Neurobiology, v.25, n.2, p.345-370. 2005.
- AMADO, E. M.;FREIRE, C. A.;SOUZA, M. M. Osmoregulation and tissue water regulation in the freshwater red crab *Dilocarcinus pagei* (Crustacea, Decapoda), and the effect of waterborne inorganic lead. Aquat Toxicol, v.79, n.1, p.1-8. 2006.
- AREND, L. J.;HANDLER, J. S.;RHIM, J. S.;GUSOVSKY, F.;SPIELMAN, W. S. Adenosine-sensitive phosphoinositide turnover in a newly established renal cell line. Am J Physiol, v.256, n.6 Pt 2, p.F1067-74. 1989.

- ARNON, A.;HAMLYN, J. M.;BLAUSTEIN, M. P. Na(+) entry via store-operated channels modulates Ca²⁺ signaling in arterial myocytes. Am J Physiol Cell Physiol, v.278, n.1, p.C163-73. 2000a.
- _____. Ouabain augments Ca²⁺ transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na⁺. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.279, n.2, p.H679-91. 2000b.
- AUGUSTO, A.;GREENE, L. J.;LAURE, H. J.;MCNAMARA, J. C. Adaptive shifts in osmoregulatory strategy and the invasion of freshwater by brachyuran crabs: evidence from *Dilocarcinus pagei* (Trichodactylidae). J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol, v.307, n.12, p.688-98. 2007.
- BAGNARESI, P.;RODRIGUES, M. T.;GARCIA, C. R. Calcium signaling in lizard red blood cells. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.147, n.3, p.779-87. 2007.
- BAIMBRIDGE, K. G. Calcium-binding proteins in the dentate gyrus. Epilepsy Res Suppl, v.7, p.211-20. 1992.
- BAIMBRIDGE, K. G.;CELIO, M. R.;ROGERS, J. H. Calcium-binding proteins in the nervous system. Trends Neurosci, v.15, n.8, p.303-8. 1992.
- BAKER, P. F.;BLAUSTEIN, M. P.;HODGKIN, A. L.;STEINHARDT, R. A. The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. J Physiol, v.200, n.2, p.431-58. 1969.
- BARKER, P.L., GIBSON, R.,. Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the European lobster *Homarus gammarus* L.. Decapoda: Nephropidae.. J. Exp.Mar. Biol. Ecol. v.26, p. 297-324. 1977.
- BARKER, P.L., GIBSON, R.,. Observations on the structure of the mouthparts, histology of the alimentary tract, and digestive physiology of the mud crab *Scylla serrata* Forskal. Decapoda: Portunidae.. J.Exp. Mar. Biol. Ecol. v.32, p. 177-196. 1978.
- BEAN, B. P. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. Trends Pharmacol Sci, v.13, n.3, p.87-90. 1992.
- BEARD, N. A.;LAVER, D. R.;DULHUNTY, A. F. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. Prog Biophys Mol Biol, v.85, n.1, p.33-69. 2004.
- BEAUGE, L.;DELGADO, D.;ROJAS, H.;BERBERIAN, G.;DIPOLO, R. A nerve cytosolic factor is required for MgATP stimulation of a Na⁺ gradient-dependent Ca²⁺ uptake in plasma membrane vesicles from squid optic nerve. Ann N Y Acad Sci, v.779, p.208-16. 1996.
- BEAUGE, L.;DIPOLO, R. Effects of monovalent cations on Na-Ca exchange in nerve cells. Ann N Y Acad Sci, v.639, p.147-55. 1991.

- BEAUMONT, V.;ZHONG, N.;FLETCHER, R.;FROEMKE, R. C.;ZUCKER, R. S. Phosphorylation and local presynaptic protein synthesis in calcium- and calcineurin-dependent induction of crayfish long-term facilitation. Neuron, v.32, n.3, p.489-501. 2001.
- BECKER, G. L.;CHEN, C. H.;GREENAWALT, J. W.;LEHNINGER, A. L. Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus*. J Cell Biol, v.61, n.2, p.316-26. 1974.
- BEHNKE, R. D.; WONG, R. K.; HUSE, S. M.; RESHKIN, S. J. & AHEARN, G. A. Proline transport by brush border membrane vesicles of lobster antennal gland. Am. J. Physiol., v. 258, p. 311-320, 1990.
- BENHAM, C. D.;TSIEN, R. W. A novel receptor-operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. Nature, v.328, n.6127, p.275-8. 1987.
- BERL, S.;PUSZKIN, S. Mg^{2+} - Ca^{2+} -activated adenosine triphosphatase system isolated from mammalian brain. Biochemistry, v.9, n.10, p.2058-67. 1970.
- BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature, v.361, n.6410, p.315-25. 1993.
- _____. Capacitative calcium entry. Biochem J, v.312 (Pt 1), p.1-11. 1995.
- BERRIDGE, M. J.;LIPP, P.;BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol, v.1, n.1, p.11-21. 2000.
- BEZPROZVANNY, I.;WATRAS, J.;EHRlich, B. E. Bell-shaped calcium-response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. Nature, v.351, n.6329, p.751-4. 1991.
- BLANDAMER, A.;BEECHEY, R. B. The Identification of an Alpha-Amylase in Aqueous Extracts of the Hepatopancreas of *Carcinus Maenas*, the Common Shore Crab. Comp Biochem Physiol, v.13, p.97-105. 1964.
- BLAUSTEIN, M. P.;LEDERER, W. J. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. Physiol Rev, v.79, n.3, p.763-854. 1999.
- BLAUSTEIN, M. P.;SANTIAGO, E. M. Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcium exchange in squid axons. Biophys J, v.20, n.1, p.79-111. 1977.
- BLISS, D. E. Transition from water to land in Decapoda Crustaceans. Am. Zool., v.8, p.355-392, 1968.
- BOBKOV, Y. V.;ACHE, B. W. Calcium sensitivity of a sodium-activated nonselective cation channel in lobster olfactory receptor neurons. J Neurophysiol, v.90, n.5, p.2928-40. 2003.

- BOND, G. H.;HUDGINS, P. M. Kinetics of inhibition of NaK-ATPase by Mg^{2+} , K^+ , and vanadate. Biochemistry, v.18, n.2, p.325-31. 1979.
- BORIN, M. L.;TRIBE, R. M.;BLAUSTEIN, M. P. Increased intracellular Na^+ augments mobilization of Ca^{2+} from SR in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol, v.266, n.1 Pt 1, p.C311-7. 1994.
- BRINI, M. Ca^{2+} signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. Cell Calcium, v.34, n.4-5, p.399-405. 2003.
- BUNT, A. H.;ASHBY, E. A. Ultrastructural changes in the crayfish sinus gland following electrical stimulation. Gen Comp Endocrinol, v.1, n.3, p.376-82. 1968.
- BURNSTOCK, G. Purines and cotransmitters in adrenergic and cholinergic neurones. Prog Brain Res, v.68, p.193-203. 1986.
- _____. Overview. Purinergic mechanisms. Ann N Y Acad Sci, v.603, p.1-17; discussion 18. 1990.
- BURNSTOCK, G.;COCKS, T.;KASAKOV, L.;WONG, H. K. Direct evidence for ATP release from non-adrenergic, non-cholinergic ("purinergic") nerves in the guinea-pig taenia coli and bladder. Eur J Pharmacol, v.49, n.2, p.145-9. 1978.
- BURNSTOCK, G.;WOOD, J. N. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. Curr Opin Neurobiol, v.6, n.4, p.526-32. 1996.
- BYGRAVE, F. L.;BENEDETTI, A. What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum? Cell Calcium, v.19, n.6, p.547-51. 1996.
- CARAFOLI, E.;GARCIA-MARTIN, E.;GUERINI, D. The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives. Experientia, v.52, n.12, p.1091-100. 1996.
- CHAKRABARTI, R. Calcium signaling in non-excitabile cells: Ca^{2+} release and influx are independent events linked to two plasma membrane Ca^{2+} entry channels. J Cell Biochem, v.99, n.6, p.1503-16. 2006.
- CHAKRABARTI, R.;CHANG, J. Y.;ERICKSON, K. L. T cell receptor-mediated Ca^{2+} signaling: release and influx are independent events linked to different Ca^{2+} entry pathways in the plasma membrane. J Cell Biochem, v.58, n.3, p.344-59. 1995.
- CHAVEZ-CROOKER, P.;GARRIDO, N.;AHEARN, G. A. Copper transport by lobster (*Homarus americanus*) hepatopancreatic mitochondria. J Exp Biol, v.205, n.Pt 3, p.405-13. 2002.

- CHAVEZ-CROOKER, P.;GARRIDO, N.;POZO, P.;AHEARN, G. A. Copper transport by lobster (*Homarus americanus*) hepatopancreatic lysosomes. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, v.135, n.2, p.107-18. 2003.
- CHEN, C. H.;GREENAWALT, J. W.;LEHNINGER, A. L. Biochemical and ultrastructural aspects of Ca^{2+} transport by mitochondria of the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus*. J Cell Biol, v.61, n.2, p.301-15. 1974.
- CHEON, J.;REEVES, J. P. Sodium-calcium exchange in membrane vesicles from *Artemia*. Arch Biochem Biophys, v.267, n.2, p.736-41. 1988.
- CONKLIN, D.E., 1995. Digestive physiology and nutrition.In: Factor, J.R. (Ed.)..., Biology of the Lobster *Homarus americanus*. Academic Press, New York, pp.441-463
- COLLINS, R. O.;THOMAS, R. C. The effect of calcium pump inhibitors on the response of intracellular calcium to caffeine in snail neurones. Cell Calcium, v.30, n.1, p.41-8. 2001.
- DALZIEL, H. H.;WESTFALL, D. P. Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization. Pharmacol Rev, v.46, n.4, p.449-66. 1994.
- DAVIS, L. E.;BURNETT, A. L. A Study of Growth and Cell Differentiation in the Hepatopancreas of the Crayfish. Dev Biol, v.10, p.122-53. 1964.
- DESANTIAGO, J.;BATLLE, D.;KHILNANI, M.;DEDHIA, S.;KULCZYK, J.;DUQUE, R.;RUIZ, J.;PENA-RASGADO, C.;RASGADO-FLORES, H. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange via the plasma membrane Ca^{2+} ATPase in skeletal muscle. Front Biosci, v.12, p.4641-60. 2007.
- DEVILLEZ, E.J., FYLER, D.J., Isolation of hepatopancreatic cell types and enzymatic activities in B cells of the crayfish *Orconectes rusticus*. Can. J. Zool. v.64, p. 81-83. 1985
- DIPOLO, R. Calcium efflux from internally dialyzed squid giant axons. J Gen Physiol, v.62, n.5, p.575-89. 1973.
- _____. Effect of ATP on the calcium efflux in dialyzed squid giant axons. J Gen Physiol, v.64, n.4, p.503-17. 1974.
- _____. The influence of nucleotides on calcium fluxes. Fed Proc, v.35, n.14, p.2579-82. 1976.
- DIPOLO, R.;BEAUGE, L. Ca^{2+} transport in nerve fibers. Biochim Biophys Acta, v.947, n.3, p.549-69. 1988.
- _____. In squid axons the Ca^{2+} i regulatory site of the $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger is drastically modified by sulfhydryl blocking agents. Evidences that intracellular

- Ca²⁺i regulatory and transport sites are different. Biochim Biophys Acta, v.1145, n.1, p.75-84. 1993.
- _____. In squid axons phosphoarginine plays a key role in modulating Na-Ca exchange fluxes at micromolar [Ca²⁺]i. Ann N Y Acad Sci, v.779, p.199-207. 1996.
- DIPOLO, R.;ROJAS, H.;BEAUGE, L. [Regulation of the Na/Ca exchanger]. Acta Cient Venez, v.44, n.2, p.103-10. 1993.
- DIPOLO, R.;ROJAS, H. R.;BEAUGE, L. Vanadate inhibits uncoupled Ca efflux but not Na--Ca exchange in squid axons. Nature, v.281, n.5728, p.229-30. 1979.
- DOSTANIC, I.;PAUL, R. J.;LORENZ, J. N.;THERIAULT, S.;VAN HUYSSSE, J. W.;LINGREL, J. B. The alpha2-isoform of Na-K-ATPase mediates ouabain-induced hypertension in mice and increased vascular contractility in vitro. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.288, n.2, p.H477-85. 2005.
- DUBYAK, G. R. Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. Am J Respir Cell Mol Biol, v.4, n.4, p.295-300. 1991.
- DUBYAK, G. R.;EL-MOATASSIM, C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. Am J Physiol, v.265, n.3 Pt 1, p.C577-606. 1993.
- EISENRAUCH, A.;JUHASZOVA, M.;BLAUSTEIN, M. P. Regulatory Processes on the Cytoplasmic Surface of the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger from Lobster Exoskeletal Muscle. Journal of Membrane Biology, v.174, n.3, p.225-235. 2000.
- ELLIS, B.;MORRIS, S. Effects of extreme pH on the physiology of the Australian 'yabby' *Cherax destructor*: acute and chronic changes in haemolymph carbon dioxide, acid-base and ionic status. J Exp Biol, v.198, n.Pt 2, p.395-407. 1995.
- FERRE, S. Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. Psychopharmacology (Berl), v.133, n.2, p.107-20. 1997.
- FERRE, S.;FUXE, K.;VON EULER, G.;JOHANSSON, B.;FREDHOLM, B. B. Adenosine-dopamine interactions in the brain. Neuroscience, v.51, n.3, p.501-12. 1992.
- FERRE, S.;RUBIO, A.;FUXE, K. Stimulation of adenosine A2 receptors induces catalepsy. Neurosci Lett, v.130, n.2, p.162-4. 1991.
- FINK, J. S.;WEAVER, D. R.;RIVKEES, S. A.;PETERFREUND, R. A.;POLLACK, A. E.;ADLER, E. M.;REPPERT, S. M. Molecular cloning of the rat A2 adenosine receptor: selective co-expression with D2 dopamine receptors in rat striatum. Brain Res Mol Brain Res, v.14, n.3, p.186-95. 1992.

- FLECKENSTEIN, A. History of calcium antagonists. Circ Res, v.52, n.2 Pt 2, p.13-16. 1983.
- FLECKENSTEIN, A.;FREY, M.;FLECKENSTEIN-GRUN, G. Consequences of uncontrolled calcium entry and its prevention with calcium antagonists. Eur Heart J, v.4 Suppl H, p.43-50. 1983.
- FLIEGEL, L.;BURNS, K.;OPAS, M.;MICHALAK, M. The high-affinity calcium binding protein of sarcoplasmic reticulum. Tissue distribution, and homology with calregulin. Biochim Biophys Acta, v.982, n.1, p.1-8. 1989.
- FLIK, G.;HAOND, C. Na(+) and Ca²⁺ pumps in the gills, epipodites and branchiostegites of the european lobster Homarus gammarus: effects of dilute sea water. J Exp Biol, v.203, n.Pt 2, p.213-20. 2000.
- FLIK, G.;SCHOENMAKERS, T. J.;GROOT, J. A.;VAN OS, C. H.;WENDELAAR BONGA, S. E. Calcium absorption by fish intestine: the involvement of ATP- and sodium-dependent calcium extrusion mechanisms. J Membr Biol, v.113, n.1, p.13-22. 1990.
- FLIK, G.;VERBOST, P. M.;ATSMAN, W.;LUCU, C. Calcium transport in gill plasma membranes of the crab Carcinus maenas: evidence for carriers driven by ATP and a Na⁺ gradient. J Exp Biol, v.195, p.109-22. 1994.
- FONTANA, G.;ROGOWSKI, R. S.;BLAUSTEIN, M. P. Kinetic properties of the sodium-calcium exchanger in rat brain synaptosomes. J Physiol, v.485 (Pt 2), p.349-64. 1995.
- FREDHOLM, B. B. Purinoceptors in the nervous system. Pharmacol Toxicol, v.76, n.4, p.228-39. 1995.
- FREDHOLM, B. B.;ZHANG, Y.;VAN DER PLOEG, I. Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, v.354, n.3, p.262-7. 1996.
- GALIETTA, L. J.;RASOLA, A.;RUGOLO, M.;ZOTTINI, M.;MASTROCOLA, T.;GRUENERT, D. C.;ROMEO, G. Extracellular 2-chloroadenosine and ATP stimulate volume-sensitive Cl⁻ current and calcium mobilization in human tracheal 9HTEo⁻ cells. FEBS Lett, v.304, n.1, p.61-5. 1992.
- GALIONE, A. Cyclic ADP-ribose, the ADP-ribosyl cyclase pathway and calcium signalling. Mol Cell Endocrinol, v.98, n.2, p.125-31. 1994.
- GALIONE, A.;WHITE, A. Ca²⁺ release induced by cyclic ADP-ribose. Trends Cell Biol, v.4, n.12, p.431-6. 1994.

- GAO, Y.;WHEATLY, M. G. Characterization and expression of plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA3) in the crayfish *Procambarus clarkii* antennal gland during molting. J Exp Biol, v.207, n.Pt 17, p.2991-3002. 2004.
- _____. Molecular characterization of an epithelial Ca^{2+} channel-like gene from crayfish *Procambarus clarkii*. J Exp Biol, v.210, n.Pt 10, p.1813-24. 2007.
- GARCIA, A. G.;GARCIA-DE-DIEGO, A. M.;GANDIA, L.;BORGES, R.;GARCIA-SANCHO, J. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. Physiol Rev, v.86, n.4, p.1093-131. 2006.
- GELEBART, P.;OPAS, M.;MICHALAK, M. Calreticulin, a Ca^{2+} -binding chaperone of the endoplasmic reticulum. Int J Biochem Cell Biol, v.37, n.2, p.260-6. 2005.
- GERWINS, P.;FREDHOLM, B. B. ATP and its metabolite adenosine act synergistically to mobilize intracellular calcium via the formation of inositol 1,4,5-trisphosphate in a smooth muscle cell line. J Biol Chem, v.267, n.23, p.16081-7. 1992a.
- _____. Stimulation of adenosine A1 receptors and bradykinin receptors, which act via different G proteins, synergistically raises inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular free calcium in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.16, p.7330-4. 1992b.
- GLOVER, C. N.;WOOD, C. M. Physiological characterisation of a pH- and calcium-dependent sodium uptake mechanism in the freshwater crustacean, *Daphnia magna*. J Exp Biol, v.208, n.Pt 5, p.951-9. 2005.
- GONZALEZ-SERRATOS, H.;HILGEMANN, D. W.;ROZYCKA, M.;GAUTHIER, A.;RASGADO-FLORES, H. Na-Ca exchange studies in sarcolemmal skeletal muscle. Ann N Y Acad Sci, v.779, p.556-60. 1996.
- GORDON, J. L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. Biochem J, v.233, n.2, p.309-19. 1986.
- GREENAWAY, P. Total body calcium and haemolymph calcium concentrations in the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). J Exp Biol, v.61, n.1, p.19-26. 1974.
- _____. The regulation of haemolymph calcium concentration of the crab *Carcinus maenas* (L.). J Exp Biol, v.64, n.1, p.149-57. 1976.
- _____. Sodium regulation in the freshwater/land crab *Holthuisana transversa* J Comp Physiol [B], v.142, n.4, p.451-456. 1981.
- _____. Calcium balance and moulting in the Crustacea. Biol Rev v.60, n.3, p.425-454. 1985.

- _____. Calcium and Magnesium Balance during Molting in Land Crabs J Crust Biol, v.13, n.2, p.191-197. 1993.
- GREENAWAY, P.; FARRELLY, C. Trans-epidermal transport and storage of calcium in *Holthusia transversa* (Brachyura; Sundathelphunidae) during premolt. Acta Zool, v.72, n.1, p.29-40. 1991.
- GREENAWAY, P.; MORRIS, S. Adaptations to a terrestrial existence by the robber crab *Birgus latro*, III: Nitrogenous excretion. J Exp Biol, v.143, n.1, p.333-346 1989.
- GREENAWAY, P.; TAYLOR, H. H.; MORRIS, S. Adaptations to a Terrestrial Existence by the Robber Crab *Birgus Latro*: VI. The Role of the Excretory System in Fluid Balance J Exp Biol, v.152, n.1, p.505-519. 1990.
- GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. Am J Physiol, v.258, n.5 Pt 1, p.C755-86. 1990.
- GUNTER, T. E.; YULE, D. I.; GUNTER, K. K.; ELISEEV, R. A.; SALTER, J. D. Calcium and mitochondria. FEBS Lett, v.567, n.1, p.96-102. 2004.
- HARRIS, R. R. Urine production rate and urinary sodium loss in the freshwater crab *Potamon edulis* J Comp Physiol [B], v.96, Number 2 / June, 1975, n.2, p.143-153. 1975.
- HILGEMANN, D. W. Regulation and deregulation of cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches. Nature, v.344, n.6263, p.242-5. 1990.
- HILGEMANN, D. W.; COLLINS, A.; MATSUOKA, S. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. J Gen Physiol, v.100, n.6, p.933-61. 1992.
- HILGEMANN, D. W.; MATSUOKA, S.; NAGEL, G. A.; COLLINS, A. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Sodium-dependent inactivation. J Gen Physiol, v.100, n.6, p.905-32. 1992.
- HILLE, C.; WALZ, B. Dopamine-induced graded intracellular Ca²⁺ elevation via the Na⁺Ca²⁺ exchanger operating in the Ca²⁺-entry mode in cockroach salivary ducts. Cell Calcium, v.39, n.4, p.305-11. 2006.
- HIRSCH, G.C., JACOBS, W.,. Der arbeitsrhythmus der Mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. II. Wachstum als primärer faktor des rhythmus eines polyphasischen organigen sekretionssystem. Z. Vergl. Physiol. v.12, p. 524-558. 1930.

- HOPKIN, S.P., NOTT, J.A., Studies on the digestive cycle of the shore crab *Carcinus maenas* L., with special reference to the B cells in the hepatopancreas. J. Mar. Biol. Ass. UK v.60, p. 891-907. 1980.
- HOTT, M.;NOEL, B.;BERNACHE-ASSOLANT, D.;REY, C.;MARIE, P. J. Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite. J Biomed Mater Res, v.37, n.4, p.508-16. 1997.
- HRYSKO, L. V.;MATSUOKA, S.;NICOLL, D. A.;WEISS, J. N.;SCHWARZ, E. M.;BENZER, S.;PHILIPSON, K. D. Anomalous regulation of the Drosophila $\text{Na}^{(+)}\text{-Ca}^{2+}$ exchanger by Ca^{2+} . J Gen Physiol, v.108, n.1, p.67-74. 1996.
- IREDALE, P. A.;ALEXANDER, S. P.;HILL, S. J. Coupling of a transfected human brain A1 adenosine receptor in CHO-K1 cells to calcium mobilisation via a pertussis toxin-sensitive mechanism. Br J Pharmacol, v.111, n.4, p.1252-6. 1994.
- JACOBS, W. Untersuchungen über die cytologie der sekretbildung in der mitteldarmdrüse von *Astacus leptodactylus*. Z. Zellforsch. v.8, p.1-62. 1928
- JACOBSON, K. A.;VAN GALEN, P. J.;WILLIAMS, M. Adenosine receptors: pharmacology, structure-activity relationships, and therapeutic potential. J Med Chem, v.35, n.3, p.407-22. 1992.
- JOHNSON, P.T., 1980. Histology of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. A model for the Decapoda. Praeger, New York.
- KENDALL, J. M.;BADMINTON, M. N.;SALA-NEWBY, G. B.;WILKINSON, G. W.;CAMPBELL, A. K. Agonist-stimulated free calcium in subcellular compartments. Delivery of recombinant aequorin to organelles using a replication deficient adenovirus vector. Cell Calcium, v.19, n.2, p.133-42. 1996.
- KIMURA, I.;KIMURA, M. External Ca^{2+} -dependent Ca^{2+} release in directly stimulated diaphragm muscles of mice. Jpn J Pharmacol, v.44, n.4, p.510-4. 1987.
- KIMURA, J.;MIYAMAE, S.;NOMA, A. Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. J Physiol, v.384, p.199-222. 1987.
- KLEIN, M. J & AHEARN, G. A. Calcium transport processes of lobster hepatopancreatic mitochondria. J. Exp. Biol., v.283, p. 147-159, 1999.
- KLOPPENBURG, P.;ZIPFEL, W. R.;WEBB, W. W.;HARRIS-WARRICK, R. M. Heterogeneous effects of dopamine on highly localized, voltage-induced Ca^{2+} accumulation in identified motoneurons. J Neurophysiol, v.98, n.5, p.2910-7. 2007.
- KOOIMAN, P. The Occurrence of Carbohydrases in Digestive Juice and in Hepatopancreas of *Astacus Fluviatilis* Fabr. And of *Homarus Vulgaris* M.-E. J Cell Physiol, v.63, p.197-201. 1964.

- KRAUSE, E.;SCHMID, A.;GONZALEZ, A.;SCHULZ, I. Low cytoplasmic $[Ca^{2+}]$ activates I(CRAC) independently of global Ca^{2+} store depletion in RBL-1 cells. J Biol Chem, v.274, n.52, p.36957-62. 1999.
- LANDEIRA-FERNANDEZ, A. M.;GALINA, A.;DE MEIS, L. Catalytic activity and heat production by the Ca^{2+} -ATPase from sea cucumber (*Ludwigothurea grisea*) longitudinal smooth muscle: modulation by monovalent cations. J Exp Biol, v.203, n.Pt 23, p.3613-9. 2000.
- LEE, H. C.;GALIONE, A.;WALSETH, T. F. Cyclic ADP-ribose: metabolism and calcium mobilizing function. Vitam Horm, v.48, p.199-257. 1994.
- LEE, M. Y.;SONG, H.;NAKAI, J.;OHKURA, M.;KOTLIKOFF, M. I.;KINSEY, S. P.;GOLOVINA, V. A.;BLAUSTEIN, M. P. Local subplasma membrane Ca^{2+} signals detected by a tethered Ca^{2+} sensor. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.35, p.13232-7. 2006.
- LEVITSKY, D. O.;NICOLL, D. A.;PHILIPSON, K. D. Identification of the high affinity Ca^{2+} -binding domain of the cardiac Na^{+} - Ca^{2+} exchanger. J Biol Chem, v.269, n.36, p.22847-52. 1994.
- LINTSCHINGER, B.;BALZER-GELDSETZER, M.;BASKARAN, T.;GRAIER, W. F.;ROMANIN, C.;ZHU, M. X.;GROSCHNER, K. Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca^{2+} -sensitive cation channels. J Biol Chem, v.275, n.36, p.27799-805. 2000.
- LOIZZI, R.F., 1966. Cellular and physiological changes during secretion in crayfish hepatopancreas. Tese de Doutorado, Iowa State University of Science and Technology, Ames.
- LOIZZI, R.F., PETERSON, D.R.,. Lipolytic sites in crayfish hepatopancreas and correlation with fine structure. Comp. Biochem. Physiol. v.39B, p. 227-236.1971
- LOIZZI, R. F. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. Z Zellforsch Mikrosk Anat, v.113, n.3, p.420-40. 1971.
- LONDOS, C.;COOPER, D. M.;WOLFF, J. Subclasses of external adenosine receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.77, n.5, p.2551-4. 1980.
- LORET, S.M., DEVOS, P.E.,. Seasonal and substrate regulation of glycogen accumulation in two tissues of the crab *Carcinus maenas*: comparative study on cell suspensions. Oceanis v.16, p. 419-431. 1990.
- LORET, S. M.;DEVOS, P. E. Structure and possible functions of the calcospherite-rich cells (R^{*} cells) in the digestive gland of the shore crab *Carcinus maenas*. Cell Tissue Res, v.267, n.1, p.105-11. 1992.

- LUCU, C.;FLIK, G. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. Am J Physiol, v.276, n.2 Pt 2, p.R490-9. 1999.
- LUCU, C.;TOWLE, D. W. $\text{Na}(+)\text{+K}(+)\text{-ATPase}$ in gills of aquatic crustacea. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.135, n.2, p.195-214. 2003.
- LUQUET, G.;MARIN, F. Biomineralizations in Crustaceans : Storage strategies. C R Palevol, v.3, n.6-7, p.515-534. 2004.
- MACLENNAN, D. H.;WONG, P. T. Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. Proc Natl Acad Sci U S A, v.68, n.6, p.1231-5. 1971.
- MAGALHÃES, C. U. 1991. Revisão taxonômica dos caranguejos dulcícolas da família Trichodactylidae (Crustacea: Decapoda: Brachyura). Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil.
- MANTEL, L. H. & FARMER, L. L. Osmotic and ionic regulation. In: BLISS, D. E. & MANTEL, L. H. (Eds.) The Biology of Crustacea, vol 5. London: Academic Press, 1983. p. 54-126.
- MARTIN, D. L.;MELANCON, M. J., JR.;DELUCA, H. F. Vitamin D stimulated, calcium-dependent adenosine triphosphatase from brush borders of rat small intestine. Biochem Biophys Res Commun, v.35, n.6, p.819-23. 1969.
- MASON, S. J.;PARADISO, A. M.;BOUCHER, R. C. Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. Br J Pharmacol, v.103, n.3, p.1649-56. 1991.
- MATCHKOV, V. V.;GUSTAFSSON, H.;RAHMAN, A.;BRIGGS BOEDTKJER, D. M.;GORINTIN, S.;HANSEN, A. K.;BOUZINOVA, E. V.;PRAETORIUS, H. A.;AALKJAER, C.;NILSSON, H. Interaction between $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-pump}$ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-exchanger}$ modulates intercellular communication. Circ Res, v.100, n.7, p.1026-35. 2007.
- MC CARTHY, J. C. & SKINNER, D. Preecdysal changes in serum ecdysone titers, gastrolith, formation and limb regeneration following molt induction by limb autonomy and/or eyestalk removal in land crab, *Geocarcinus lateralis*. Gen. Comp. Endocrinol., v. 33, p. 278-292, 1977.
- MCLARNON, J. G. Purinergic mediated changes in Ca^{2+} mobilization and functional responses in microglia: effects of low levels of ATP. J Neurosci Res, v.81, n.3, p.349-56. 2005.
- MCNAMARA, J. C.;ZANOTTO, F. P.;ONKEN, H. Adaptation to hypoosmotic challenge in brachyuran crabs: a microanatomical and electrophysiological characterization of the intestinal epithelia. J Exp Zoolog A Comp Exp Biol, v.303, n.10, p.880-93. 2005.

- MEGSON, A. C.;DICKENSON, J. M.;TOWNSEND-NICHOLSON, A.;HILL, S. J.
Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A1-receptors and constitutive P2-purinoceptors in CHO-K1 cells. Br J Pharmacol, v.115, n.8, p.1415-24. 1995.
- MELDOLESI, J. Calcium signalling. Oscillation, activation, expression. Nature, v.392, n.6679, p.863, 865-6. 1998.
- MELDOLESI, J.;POZZAN, T. The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. Trends Biochem Sci, v.23, n.1, p.10-4. 1998a.
- _____. The heterogeneity of ER Ca^{2+} stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function. J Cell Biol, v.142, n.6, p.1395-8. 1998b.
- MIYAWAKI, A.;LLOPIS, J.;HEIM, R.;MCCAFFERY, J. M.;ADAMS, J. A.;IKURA, M.;TSIEN, R. Y. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. Nature, v.388, n.6645, p.882-7. 1997.
- MOMIN, M. A.;RANGNEKER, P. V. Variants in the histochemical patterns of lipids in the hepatopancreas of *Scylla serrata* (Forsk.) (Brachyura, Decapoda). Z Mikrosk Anat Forsch, v.89, n.1, p.170-82. 1975.
- MONTERO, M.;ALVAREZ, J.;GARCIA-SANCHO, J. Agonist-induced Ca^{2+} influx in human neutrophils is secondary to the emptying of intracellular calcium stores. Biochem J, v.277 (Pt 1), p.73-9. 1991.
- MONTERO, M.;BRINI, M.;MARSAULT, R.;ALVAREZ, J.;SITIA, R.;POZZAN, T.;RIZZUTO, R. Monitoring dynamic changes in free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. EMBO J, v.14, n.22, p.5467-75. 1995.
- MORI, Y.;NIIDOME, T.;FUJITA, Y.;MYNLIEFF, M.;DIRKSEN, R. T.;BEAM, K. G.;IWABE, N.;MIYATA, T.;FURUTAMA, D.;FURUICHI, T.;ET AL. Molecular diversity of voltage-dependent calcium channel. Ann N Y Acad Sci, v.707, p.87-108. 1993.
- MORRIS, S. Salt and water relations, and nitrogen excretion, in the amphibious african freshwater crab *potamonautes warreni* in water and in air. J Exp Biol, v.201, n.6, p.883-93. 1998.
- _____. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. J Exp Biol, v.204, n.Pt 5, p.979-89. 2001.
- MORRIS, S.;TAYLOR, H. H.;GREENAWAY, P. Adaptations to a Terrestrial Existence by the Robber Crab *Birgus Latro* : VII. The Branchial Chamber and its Role in Urine Reprocessing J Exp Biol, v.161, n.1, p.315-331. 1991.
- MULDOON, L. L.;ENSLIN, H.;RODLAND, K. D.;MAGUN, B. E. Stimulation of Ca^{2+} influx by endothelin-1 is subject to negative feedback by elevated intracellular Ca^{2+} . Am J Physiol, v.260, n.6 Pt 1, p.C1273-81. 1991.

- NAKAMARU, Y.;KOSAKAI, M.;KONISHI, K. Some properties of brain microsome adenosine triphosphatases activated by magnesium and calcium. Arch Biochem Biophys, v.120, n.1, p.15-21. 1967.
- NELSON, M. T.;BLAUSTEIN, M. P. Effects of ATP and vanadate on calcium efflux from barnacle muscle fibres. Nature, v.289, n.5795, p.314-6. 1981.
- NIGGLI, V.;PENNISTON, J. T.;CARAFOLI, E. Purification of the $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})$ -ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. J Biol Chem, v.254, n.20, p.9955-8. 1979.
- NORTH, R. A. P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels. Ciba Found Symp, v.198, p.91-105; discussion 105-9. 1996.
- OLIVEIRA, A. M.;BENDHACK, L. M. Dopamine-induced contractile responses of the rat anococcygeus muscle. Arch Int Pharmacodyn Ther, v.316, p.97-104. 1992.
- OLSSON, R. A.;PEARSON, J. D. Cardiovascular purinoceptors. Physiol Rev, v.70, n.3, p.761-845. 1990.
- ONGINI, E.;FREDHOLM, B. B. Pharmacology of adenosine A2A receptors. Trends Pharmacol Sci, v.17, n.10, p.364-72. 1996.
- ONKEN, H.;MCNAMARA, J. C. Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. J Exp Biol, v.205, n.Pt 2, p.167-75. 2002.
- ONKEN, H.;RIESTENPATT, S. NaCl absorption across split gill lamellae of hyperregulating crabs: Transport mechanisms and their regulation Comp Biochem Physiol [A], v.119, n.4, p.883-893. 1998.
- OSSES, L.;CONDRESCU, M.;DIPOLO, R. ATP-dependent calcium pump and $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ exchange in plasma membrane vesicles from squid optic nerve. Biochim Biophys Acta, v.860, n.3, p.583-91. 1986.
- PARKINSON, D. K.;RADDE, I. C. Properties of a Ca^{2+} -and Mg^{2+} -activated ATP-hydrolyzing enzyme in rat kidney cortex. Biochim Biophys Acta, v.242, n.1, p.238-46. 1971.
- PEAKMAN, M. C.;HILL, S. J. Adenosine A1 receptor-mediated changes in basal and histamine-stimulated levels of intracellular calcium in primary rat astrocytes. Br J Pharmacol, v.115, n.5, p.801-10. 1995.
- PEDERSEN, S. F.;OWSIANIK, G.;NILIUS, B. TRP channels: an overview. Cell Calcium, v.38, n.3-4, p.233-52. 2005.
- PÉQUEUX, A. Osmotic Regulation in Crustaceans J Crust Biol, v.15, n.1, p.1-60. 1995.

- PÉQUEUX, A.; GILLES, R. & MARSHALL, W. S. NaCl transport in gills and related structures. In: Greger, R. (Ed.) *Advances in comparative and environmental physiology*, vol 1. Berlin: Springer, 1988, p. 1-73.
- PEQUEUX, A.; GILLES, R. Osmoregulation of the Chinese crab *Eriocheir sinensis* as related to the activity of the (Na^+ , K^+) ATPase [proceedings]. Arch Int Physiol Biochim, v.85, n.2, p.426-8. 1977.
- PHILIPSON, K. D.; BERSOHN, M. M.; NISHIMOTO, A. Y. Effects of pH on Na^+ - Ca^{2+} exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. Circ Res, v.50, n.2, p.287-93. 1982.
- PHILIPSON, K. D.; NISHIMOTO, A. Y. Na^+ - Ca^{2+} exchange in inside-out cardiac sarcolemmal vesicles. J Biol Chem, v.257, n.9, p.5111-7. 1982a.
- _____. Stimulation of Na^+ - Ca^{2+} exchange in cardiac sarcolemmal vesicles by proteinase pretreatment. Am J Physiol, v.243, n.3, p.C191-5. 1982b.
- PAQUET, F., GERMAIN, P., FRITSCH, P.,. Etude ultrastructurale de la glande digestive du homard *Homarus gammarus*. Role des divers types cellulaires dans les processus digestifs. Cah. Biol. Mar. v.35, p. 15-37. 1993.
- PAQUET, F., 1991. Etude expérimentale des biocinétiques de l'americium-241 chez le homard *Homarus gammarus*. Analyse des mécanismes d'accumulation et de detoxication au niveau subcellulaire. Tese de Doutorado, University of Nantes, Nantes
- PUTNEY, J. W., JR. A model for receptor-regulated calcium entry. Cell Calcium, v.7, n.1, p.1-12. 1986.
- _____. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. Cell Calcium, v.21, n.3, p.257-61. 1997.
- _____. Capacitative calcium entry in the nervous system. Cell Calcium, v.34, n.4-5, p.339-44. 2003.
- PUTNEY, J. W., JR.; BIRD, G. S. Calcium mobilization by inositol phosphates and other intracellular messengers. Trends Endocrinol Metab, v.5, n.6, p.256-60. 1994.
- PUTNEY, J. W., JR.; BROAD, L. M.; BRAUN, F. J.; LIEVREMONT, J. P.; BIRD, G. S. Mechanisms of capacitative calcium entry. J Cell Sci, v.114, n.Pt 12, p.2223-9. 2001.
- RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Effects of purines and pyrimidines on the rat mesenteric arterial bed. Circ Res, v.69, n.6, p.1583-90. 1991a.

- _____. Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system. Circulation, v.84, n.1, p.1-14. 1991b.
- _____. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev, v.50, n.3, p.413-92. 1998.
- RALEVIC, V.;MATHIE, R. T.;ALEXANDER, B.;BURNSTOCK, G.
Characterization of P2X- and P2Y-purinoceptors in the rabbit hepatic arterial vasculature. Br J Pharmacol, v.103, n.1, p.1108-13. 1991.
- RANDRIAMAMPITA, C.;TSIEN, R. Y. Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. Nature, v.364, n.6440, p.809-14. 1993.
- RASGADO-FLORES, H.;BLAUSTEIN, M. P. Na/Ca exchange in barnacle muscle cells has a stoichiometry of 3 Na^+ /1 Ca^{2+} . Am J Physiol, v.252, n.5 Pt 1, p.C499-504. 1987.
- RASGADO-FLORES, H.;DESANTIAGO, J.;ESPINOSA-TANGUMA, R.
Stoichiometry and regulation of the Na-Ca exchanger in barnacle muscle cells. Ann N Y Acad Sci, v.639, p.22-33. 1991.
- RASGADO-FLORES, H.;ESPINOSA-TANGUMA, R.;TIE, J.;DESANTIAGO, J.
Voltage dependence of Na-Ca exchange in barnacle muscle cells. I. Na-Na exchange activated by alpha-chymotrypsin. Ann N Y Acad Sci, v.779, p.236-48. 1996.
- RASGADO-FLORES, H.;SANTIAGO, E. M.;BLAUSTEIN, M. P. Kinetics and stoichiometry of coupled Na efflux and Ca influx (Na/Ca exchange) in barnacle muscle cells. J Gen Physiol, v.93, n.6, p.1219-41. 1989.
- REDDY, M. S.;RAO, K. V. In vitro inhibition of Ca^{2+} ATPase by methylparathion in prawn: a kinetic approach. Biochem Int, v.22, n.6, p.1053-8. 1990.
- REUTER, H.;HENDERSON, S. A.;HAN, T.;ROSS, R. S.;GOLDHABER, J. I.;PHILIPSON, K. D. The Na^+ - Ca^{2+} exchanger is essential for the action of cardiac glycosides. Circ Res, v.90, n.3, p.305-8. 2002.
- RIEGEL, J.A.; COOK, M.A. Recent studies of excretion in Crustacea. In: Wessing, A. (Ed.) Excretion. Fortschritte der Zoologie 23. Stuttgart: Gustav Fisher, 1975, p. 48-74.
- RIESTENPATT, S.;ZEISKE, W.;ONKEN, H. Cyclic amp stimulation of electrogenic uptake of Na^+ and Cl^- across the gill epithelium of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. J Exp Biol, v.188, n.1, p.159-74. 1994.
- RIZZUTO, R.;BRINI, M.;MURGIA, M.;POZZAN, T. Microdomains with high Ca^{2+} close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. Science, v.262, n.5134, p.744-7. 1993.

- ROBINSON, J. D. (Ca + Mg)-stimulated ATPase activity of a rat brain microsomal preparation. Arch Biochem Biophys, v.176, n.1, p.366-74. 1976.
- SCHATZMANN, H. J.;ROSSI, G. L. (Ca²⁺ + Mg²⁺)-activated membrane ATPases in human red cells and their possible relations to cation transport. Biochim Biophys Acta, v.241, n.2, p.379-92. 1971.
- SCHATZMANN, H.J, VICENZI, F.F. Calcium movement across the membrane of human red cells. J Physiol v.201 p. 369–395, 1969
- SCHELLENBERG, G. D.;ANDERSON, L.;SWANSON, P. D. Inhibition of Na⁺-Ca²⁺ exchange in rat brain by amiloride. Mol Pharmacol, v.24, n.2, p.251-8. 1983.
- SCHIEHMANN, W. P.;BUXTON, I. L. A1 adenosine receptor stimulation of IP1 degradation in myometrial smooth muscle. Proc West Pharmacol Soc, v.34, p.261-8. 1991a.
- _____. Adenosine A1-receptor coupling to phosphoinositide metabolism in pregnant guinea pig myometrium. Am J Physiol, v.261, n.5 Pt 1, p.E665-72. 1991b.
- SCHIEHMANN, W. P.;WESTFALL, D. P.;BUXTON, I. L. Smooth muscle adenosine A1 receptors couple to disparate effectors by distinct G proteins in pregnant myometrium. Am J Physiol, v.261, n.1 Pt 1, p.E141-50. 1991.
- SCHIFFMANN, S. N.;VANDERHAEGHEN, J. J. Adenosine A2 receptors regulate the gene expression of striatopallidal and striatonigral neurons. J Neurosci, v.13, n.3, p.1080-7. 1993.
- SCHOLZ, W.;ALBUS, U. Na⁺/H⁺ exchange and its inhibition in cardiac ischemia and reperfusion. Basic Res Cardiol, v.88, n.5, p.443-55. 1993.
- SEBASTIAO, A. M.;RIBEIRO, J. A. Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. Prog Neurobiol, v.48, n.3, p.167-89. 1996.
- SEIFERT, R.;WENZEL, K.;ECKSTEIN, F.;SCHULTZ, G. Purine and pyrimidine nucleotides potentiate activation of NADPH oxidase and degranulation by chemotactic peptides and induce aggregation of human neutrophils via G proteins. Eur J Biochem, v.181, n.1, p.277-85. 1989.
- SEPULVEDA, M. R.;HIDALGO-SANCHEZ, M.;MATA, A. M. Localization of endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca²⁺-ATPases in subcellular fractions and sections of pig cerebellum. Eur J Neurosci, v.19, n.3, p.542-51. 2004.
- SHAW, J. Salt and water balance in East African freshwater crab, *Potamon niloticus* (M. Edw.). J. Exp. Biol, v. 36, p. 157-179, 1959.

- SHI, J.;MORI, E.;MORI, Y.;MORI, M.;LI, J.;ITO, Y.;INOUE, R. Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. J Physiol, v.561, n.Pt 2, p.415-32. 2004.
- SHUTTLEWORTH, T. J.;THOMPSON, J. L. Ca^{2+} entry modulates oscillation frequency by triggering Ca^{2+} release. Biochem J, v.313 (Pt 3), p.815-9. 1996.
- SIKDAR, R.;GANGULY, U.;PAL, P.;MAZUMDER, B.;SEN, P. C. Biochemical characterization of a calcium ion stimulated-ATPase from goat spermatozoa. Mol Cell Biochem, v.103, n.2, p.121-30. 1991.
- SILVESTRE, F; TRAUSCH, G; DEVOS, P. Hyper-osmoregulatory capacity of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) exposed to cadmium; acclimation during chronic exposure. Comp Biochem Physiol (C), v.140, n.1, p.29-37. 2005.
- SILVESTRE, F; TRAUSCH, G.; PÉQUEUX, A.; DEVOS, P. Uptake of cadmium through isolated perfused gills of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Comp Biochem Physiol (A), v.137, n.1, p.189-196. 2004.
- SILVESTRE, F; TRAUSCH, G.; PÉQUEUX, A.; DEVOS, P. Effects of atrazine on osmoregulation in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Comp Biochem Physiol (C), v.132, n.3, p.385-390. 2002.
- SMYTH, J. T.;DEHAVEN, W. I.;JONES, B. F.;MERCER, J. C.;TREBAK, M.;VAZQUEZ, G.;PUTNEY, J. W., JR. Emerging perspectives in store-operated Ca^{2+} entry: roles of Orai, Stim and TRP. Biochim Biophys Acta, v.1763, n.11, p.1147-60. 2006.
- SOCCI, R. R.;DELAMERE, N. A. The effect of vanadate upon calcium-stimulated ATPase of the rabbit iris-ciliary body. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.29, n.12, p.1866-70. 1988.
- SPARKS, S. & GREENAWAY, P. The hemolymph as a storage site for cuticular ions during premolt in the fresh water/land crab *Holthusiana transversa*. J. Exp. Biol., v. 113, p. 43-54, 1984.
- SPEEDING, M. Activators and inactivators of Ca^{++} channels: new perspectives. J Pharmacol, v.16, n.4, p.319-43. 1985.
- STANIER, J. E.;WOODHOUSE, M. A.;GRIFFIN, R. L. Light- and electron-microscopic observations on the metacercaria of a *Spelotrema* sp. (Trematoda. Microphallidae) encysted in *Carcinus maenas*. J Invertebr Pathol, v.10, n.2, p.269-82. 1968.
- TAKAGI, K.; ISHII, N. & NAGASAWA, H. Immunolocalization of gastrolith matrix protein (GAMP) in the gastroliths and exoskeleton of crayfish, *Procambarus clarkii*. Zool. Sci., v. 17, p. 179-184, 2000.

- TAREILUS, E.;SCHOCH, J.;BREER, H. $\text{Ca}^{(2+)}$ -dependent inactivation of P-type calcium channels in nerve terminals. J Neurochem, v.62, n.6, p.2283-91. 1994.
- TAYLOR, H. H.;GREENAWAY, P. Osmoregulation in the terrestrial Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis* (Brachyura: Gecarcinidae): modulation of branchial chloride uptake from the urine. J Exp Biol, v.205, n.Pt 20, p.3251-60. 2002.
- TAYLOR, H. H.; GREENAWAY, P. & MORRIS, S. Adaptations to a terrestrial existence by the robber crab *Birgus latro*, VIII: Osmotic and ionic regulation on freshwater and saline drinking regimens. J. Exp. Biol., v.179, p. 93-113, 1993.
- TELFORD, W. G.;MILLER, R. A. Detection of plasma membrane $\text{Ca}^{(2+)}$ -ATPase activity in mouse T lymphocytes by flow cytometry using fluo-3-loaded vesicles. Cytometry, v.24, n.3, p.243-50. 1996.
- TIFFERT, T.;LEW, V. L. Kinetics of inhibition of the plasma membrane calcium pump by vanadate in intact human red cells. Cell Calcium, v.30, n.5, p.337-42. 2001.
- TOULLEC, J. Y.;CHIKHI, M.;VAN WORMHOUDT, A. In vitro protein synthesis and alpha amylase activity in F cells from hepatopancreas of *Palaemon serratus* (Crustacea; Decapoda). Experientia, v.48, n.3, p.272-7. 1992.
- TOWLE, D.W. Ion transport systems in membrane vesicles isolated from crustacean tissues. Journal of Experimental Zoology, v.265, n.4, p.387-396. 1993.
- TOWLE, D. Sodium transport system in gills. In: KINNE, R. K. H. (Ed.) Comparative aspects of sodium cotransport system. Basel, Karger, 1990, p. 241-263.
- TRAVIS, D.F.,. The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille. IV. Postecdysial histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. Biol. Bull. v.113, p. 541-579. 1957
- TSE, F. W.;TSE, A.;HILLE, B. Cyclic Ca^{2+} changes in intracellular stores of gonadotropes during gonadotropin-releasing hormone-stimulated Ca^{2+} oscillations. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.21, p.9750-4. 1994.
- VAN CALKER, D.;MULLER, M.;HAMPRECHT, B. Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. Nature, v.276, n.5690, p.839-41. 1978.
- VAN WEEL, P.B. Processes of secretion, restitution, and resorption in gland of midgut glandula media intestini. of *Atja spinipes* Newp. Physiol. Zool. V.28, p. 40-54. 1955
- VAN WEEL, P.B.,. On the secretion of digestive enzymes by the marine crab *Thalamita crenata*. Z.Vergl. Physiol. 43, p.567-577. 1960.

- VAN WEEL, P.B. Digestion in Crustacea. In: Florkin, M., Scheer, B.T.(Eds.), Chemical Zoology, vol. 5. Academic Press, New York, 1970 p. 97-115.
- VAZQUEZ, G.;WEDEL, B. J.;AZIZ, O.;TREBAK, M.;PUTNEY, J. W., JR. The mammalian TRPC cation channels. Biochim Biophys Acta, v.1742, n.1-3, p.21-36. 2004.
- VERDONCK, F.;MUBAGWA, K.;SIPIDO, K. R. $[Na^{+}]$ in the subsarcolemmal 'fuzzy' space and modulation of $[Ca^{2+}]_i$ and contraction in cardiac myocytes. Cell Calcium, v.35, n.6, p.603-12. 2004.
- VONK, H.J.. Digestion and metabolism. In: Waterman, T.H. (Ed.), Physiology of Crustacea, vol. 1. Academic Press, New York, 1960, p. 291-316.
- WEIHRAUCH, D.;MCNAMARA, J. C.;TOWLE, D. W.;ONKEN, H. Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). J Exp Biol, v.207, n.Pt 26, p.4623-31. 2004.
- WHEATLY, M.;ZHANG, Z.;WEIL, J.;ROGERS, J.;STINER, L. Novel subcellular and molecular tools to study Ca^{2+} transport mechanisms during the elusive moulting stages of crustaceans: flow cytometry and polyclonal antibodies. J Exp Biol, v.204, n.Pt 5, p.959-66. 2001.
- WHEATLY, M. G. Calcium homeostasis in crustacea: the evolving role of branchial, renal, digestive and hypodermal epithelia. J Exp Zool, v.283, n.7, p.620-40. 1999.
- WHEATLY, M. G. Crustaceans models for studying calcium transport: the journey from whole organisms to molecular mechanisms. J. Mar. Biol. Assoc. UK, v. 77, p. 107-125, 1997.
- WHEATLY, M. G. An overview of calcium balance in crustacean. Physiol. Zool., vol. 69, p. 351-382, 1996.
- WHEATLY, M. G. & AYERS, J. Scaling of calcium, inorganic and organic contents to body mass during molting cycle of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii* (Girard). J. Crust. Biol., v. 15, p. 409-417, 1995.
- WHEATLY, M. G.;GAO, Y. Molecular biology of ion motive proteins in comparative models. J Exp Biol, v.207, n.Pt 19, p.3253-63. 2004.
- WHEATLY, M. G.;HUBBARD, M. G.;CORBETT, A. M. Physiological characterization of the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger (NCX) in hepatopancreatic and antennal gland basolateral membrane vesicles isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.131, n.2, p.343-61. 2002.

- WHEATLY, M. G.;PENCE, R. C.;WEIL, J. R. ATP-dependent calcium uptake into basolateral vesicles from transporting epithelia of intermolt crayfish. Am J Physiol, v.276, n.2 Pt 2, p.R566-74. 1999.
- WHEATLY, M. G.;WEIL, J. R.;DOUGLAS, P. B. Isolation, visualization, characterization, and osmotic reactivity of crayfish BLMV. Am J Physiol, v.274, n.3 Pt 2, p.R725-34. 1998.
- WHEATLY, M. G.;ZANOTTO, F. P.;HUBBARD, M. G. Calcium homeostasis in crustaceans: subcellular Ca dynamics. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, v.132, n.1, p.163-78. 2002.
- WHEATLY, M. G. & TOOP, T. Physiological responses of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana) to environmental hyperoxia II: The role of antennal gland. J. Exp. Biol., v. 143, p. 53-50, 1989.
- WHITE, T. E.;DICKENSON, J. M.;ALEXANDER, S. P.;HILL, S. J. Adenosine A1-receptor stimulation of inositol phospholipid hydrolysis and calcium mobilisation in DDT1 MF-2 cells. Br J Pharmacol, v.106, n.1, p.215-21. 1992.
- WOLCOTT, T. G.; WOLCOTT, D. L. Extrarenal modification of urine for ion conservation in ghost crabs, *Ocypode quadrata* Fabricius. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** Oxford: Elsevier, V. 91, p. 93-107, 1985.
- WOLCOTT, T. G.; WOLCOTT, D. L. Ion conservation and reprocessing of urine in land crabs *Gecarcinus lateralis*. **Physiol. Zool.** Chicago: University of Chicago Press, vol. 64, p. 344-361, 1991.
- WOLCOTT, T. Water and solute balance in the transition to land. **Am. Zool.** McLean: Society for Integrative and Comparative Biology; American Society of Zoologists, v.32, p.370-3381, 1992.
- WOLOSKER, H.;DE MEIS, L. Ligand-gated channel of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport ATPase. Biosci Rep, v.15, n.5, p.365-76. 1995.
- YONGE, C.M. Studies on the comparative physiology of digestion. II. The mechanism of feeding, digestion, and assimilation in *Nephrops norvegicus*. Br. J. Exp. Biol. V.1, p.343-390. 1924.
- YOUNG, H. S.;STOKES, D. L. The mechanics of calcium transport. J Membr Biol, v.198, n.2, p.55-63. 2004.
- ZANOTTO, F. P.;WHEATLY, M. G. Calcium balance in crustaceans: nutritional aspects of physiological regulation. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, v.133, n.3, p.645-60. 2002.
- ZANOTTO, F. P.;WHEATLY, M. G.;REIBER, C. L.;GANNON, A. T.;JALLES-FILHO, E. Allometric relationship of postmolt net ion uptake, ventilation, and

circulation in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*: intraspecific scaling. Physiol Biochem Zool, v.77, n.2, p.275-84. 2004.

ZANOTTO, F. P. & WHEATLY, M. G. The effect of ambient p.H. on the electrolyte regulation during the postmoult period in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. J. Exp. Biol., v. 178, p. 1-19, 1993.

ZHONG, N.;BEAUMONT, V.;ZUCKER, R. S. Roles for mitochondrial and reverse mode $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and the plasmalemma Ca^{2+} ATPase in post-tetanic potentiation at crayfish neuromuscular junctions. J Neurosci, v.21, n.24, p.9598-607. 2001.

ZHUANG, Z.;AHEARN, G. Ca^{2+} transport processes of lobster hepatopancreatic brush-border membrane vesicles. J Exp Biol, v.199, n.Pt 5, p.1195-208. 1996.

ZHUANG, Z.;AHEARN, G. A. Energized Ca^{2+} transport by hepatopancreatic basolateral plasma membranes of *Homarus americanus*. J Exp Biol, v.201, n.Pt 2, p.211-20. 1998.