Vinicius Queiroz

**Alterações celulares e teciduais de
Echinodermata em resposta ao
parasitismo por moluscos eulimídios
(Gastropoda: Eulimidae).**

**São Paulo
2014**

Vinicius Queiroz Araújo

**Alterações celulares e teciduais de
Echinodermata em resposta ao
parasitismo por moluscos eulimídios
(Gastropoda: Eulimidae).**

**Cellular and tissue alterations in Echinodermata in response to
parasitism of eulimid snails (Gastropoda: Eulimidae)**

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.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Reis
Custódio

**São Paulo
2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

Queiroz, Vinicius

Alterações celulares e teciduais de Echinodermata em resposta ao parasitismo por moluscos eulimídios (Gastropoda: Eulimidae).

127 páginas.

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

1. Celomócitos 2. Inflamação 3. Parasitismo. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

Orientador

“Aos meus pais, Djalma e
Marinlava, e a Licia Sales,
minha companheira em todos
os momentos... fossem eles
bons ou ruins”

“O acaso só favorece os espíritos
predispostos.”

(Louis Pasteur)

“Algumas coisas são tão sérias
que você tem que rir delas.”

(Niels Bohr)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por me manter vivo, com saúde e força para que fizesse o que sempre gostei: estudar o ambiente marinho. Agradeço também a todas as divindades relacionadas ao mar, ou não, tais como o Dr. Zé Pilintra, Yemanjá, Nereu, Oceanus, Poseidom, Netuno, que me concederam perfeitos dias de coleta, ótimas condições de maré (mesmo quando não parecia que o seria) e fizeram as coisas darem certo quando tudo parecia que iria dar errado.

Ao meu orientador Márcio Reis Custódio, por aceitar a minha idéia mais que inusitada de trabalhar com um molusco parasita do espinho de um ouriço. Agradeço pelos ensinamentos, pelas conversas, pelos puxões de orelha quando necessário e principalmente pelas várias perguntas singulares e excelentes sugestões. Sei que me abriram a cabeça para outras possibilidades e sem elas, meu trabalho não seria do jeito que foi.

Aos meus pais, pelo apoio, incentivo e pelas palavras amigas e reconfortantes na hora do desespero. Agradeço também a minha namorada Licia Sales, que sempre me apoiou, entendeu e não me deixou abater, mesmo nas horas que isso parecia inevitável. Agradeço tudo que vc tem feito por mim. MUITO OBRIGADO.

Ao Dr. Enrique Rosas pelas conversas e ensinamentos sobre microbiologia e ao técnico Vagner Alberto, que sempre me socorreu quando precisei de ajuda com os reagentes ou aparelhos, e quando não era possível a ajuda, suas piadas sempre me alegravam.

Ao pessoal do laboratório, que sempre tornaram os meus “dias de bancada” mais alegres e ao pessoal da casa em que moro (Gustavo Viscaíno, Viviane Briguenti, Roberta Canário), que tornaram os “dias de estudo” mais suaves e proveitosos.

À Alessandra Majer, pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao Professor Dr. Alberto Ribeiro e ao técnico Waldir Caldeira (ambos do LME - IB-USP) pelo uso dos equipamentos e apoio com a microscopia eletrônica de transmissão, parte extremamente importante do meu trabalho.

À Professora Renata Guimarães, pela disponibilidade de sua infraestrutura.

Aos professores Fernando Ribeiro, Silvia Cristina e Renata Guimarães, pelos generosos e valiosos comentários na banca de qualificação.

Ao Dr. Arthur Anker, por permitir o uso de uma das suas maravilhosas fotos (capa da dissertação)

Aos funcionários do Cebimar, Instituto de Biociências e do Departamento de Fisiologia Geral, sem eles muitas coisas não existiriam.

Enfim, agradeço a todos que torceram por mim, mesmo sem eu saber, e àqueles que porventura não tenham sido aqui mencionados.

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO GERAL.....	03
1. Imunidade e sistema imune.....	04
2. Inflamação e processo inflamatório.....	09
3. Resposta imune a parasitas.....	11
4. Imunidade em Echinodermata.....	14
OBJETIVOS.....	19
CAPÍTULO I - Caracterização dos celomócitos do ouriço-do-mar <i>Eucidaris tribuloides</i> Lamarck, 1816.....	20
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Resultados.....	25
Discussão.....	41
Conclusões.....	48
CAPÍTULO II - Processo inflamatório no espinho de <i>Eucidaris tribuloides</i> Lamarck, 1816.....	52
Introdução.....	54
Material e Métodos.....	55
Resultados.....	59
Discussão.....	77
Conclusão.....	87
PERSPECTIVAS.....	89
REFERÊNCIAS.....	92
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	116
LISTA DE ABREVIATURAS.....	120

RESUMO

Assim como visto nos vertebrado, os invertebrados também possuem um sistema imune bastante complexo, apresentando respostas humorais e celulares. Esta última é a principal forma de defesa, envolvendo células amebóides móveis capazes de isolar e/ou eliminar material estranho. Em equinodermos, as células envolvidas nestas respostas são categorizadas como celomócitos, uma denominação genérica que engloba vários tipos celulares encontrados nas cavidades corporais e no tecido conjuntivo. Entretanto, além da função imune, são reportados como tendo outros papéis diversos, como excreção, digestão, transporte e estocagem de nutrientes e a síntese e deposição de fibras de colágeno e da matriz extracelular. Não existe consenso sobre quais os papéis específicos desempenhados por estas células num organismo saudável e nem diante de um processo inflamatório. Assim, o presente trabalho foi realizado para caracterizar o processo inflamatório no espinho de *Eucidaris tribuloides* causado por *Sabinella troglodytes*, um molusco ectoparasita no espinho. A primeira parte do trabalho traz a caracterização das células da cavidade celomática. Para investigá-las foi realizada uma abordagem integrada onde os celomócitos foram descritos por meio da utilização de células vivas, citoquímica e microscopia eletrônica de transmissão. Foram encontrados sete tipos celulares, sendo um novo e dois pouco conhecidos. Com esta abordagem inicial, foi possível obter as ferramentas necessárias para investigar o processo inflamatório. Para estudar o processo inflamatório no espinho de *E. tribuloides*, utilizou-se uma abordagem estrutural, combinando histologia, microscopia eletrônica de varredura e microtomografia computadorizada, assim como celular/molecular. Os dados indicam que a inflamação causada pelo molusco parece ser um evento local, que altera tanto a matriz orgânica quanto a calcária, mas parece não se propagar para a cavidade celomática do hospedeiro.

Palavras Chave: Echinodermata, espinho, Eulimidae, inflamação, ouriço-do-mar

ABSTRACT

The invertebrates, as well as vertebrates, also have a very complex immune system, presenting humoral and cellular responses. The latter is their main form of defense, involving mobile amoeboid cells capable of isolating and/or eliminating foreign material. In Echinodermata, the cells involved in these responses are categorized as coelomocytes. This is a generic term that encompasses various cell types found in the body cavities and connective tissue. However, in addition to immune function, they are reported as having various other roles, such as excretion, digestion, transport and nutrient storage and the synthesis and deposition of collagen fibers and extracellular matrix. There is no consensus on what the specific role played by each one of these cells in healthy individuals and the knowledge about the inflammatory process is much worse. Thus, the present study was performed to characterize the inflammatory process in the spine of *Eucidaris tribuloides* caused by *Sabinella troglodytes*, a spine ectoparasites gastropod. The first part of the study provides the characterization of the cells of the coelomic cavity. To investigate them, an integrated approach was used, where the coelomocytes were described through the use of living cells, immunocytochemistry and transmission electron microscopy. Seven cell types were found: one new and two poorly known. This initial approach enables us to obtain the necessary tools to investigate the inflammatory process. To study the inflammatory process in the spine of *E. tribuloides*, we used a structural approach, combining histology, scanning electron microscopy and computed microtomography, and the cellular/molecular one. The data indicate that inflammation caused by snail appears to be a local event, which alters both the organic and calcareous matrix, but does not seem to be reflected within the coelomic cavity of the host.

Keywords: Echinodermata, Eulimidae, inflammation, sea urchin, spine.

INTRODUÇÃO

“...solving the self/nonself problem became perhaps the most critical driving force in the evolution of the modern immune system” (Paul, 2010).

Apesar de utilizada em um contexto um pouco distante do original, essa frase retrata perfeitamente o quão importante se tornou mecanismo de reconhecimento, ao longo da evolução dos seres vivos. A habilidade em diferenciar o que é próprio do que é estranho (*self and nonself*) é uma característica que permeia os grupos biológicos e pode ser encarado como o passo inicial dos mecanismos imunológicos. Assim, estes processos se mostram fundamentais durante a evolução dos mecanismos de imunidade inata e são filogeneticamente bastante conservados (Stuart e Ezekowitz, 2008; Dzik, 2010). Em diferentes graus de organização e particularidades, podem ser observados em fungos (Kahmann e Bölker, 1996; Hall *et al.*, 2010), plantas (Karban e Shiojiri, 2009; Sanabria *et al.*, 2010), protozoários (Waddell e Duffy, 1986; Chen *et al.*, 2007) e animais. Nestes últimos, ocorre desde os grupos mais basais, tais como esponjas (Amano, 1990) e cnidários (Rinkevich, 2012) até os mais derivados.

Além de reconhecer uma partícula como estranha, ter a capacidade de eliminá-la (fagocitose) também é de suma importância. A fagocitose pode ser sucintamente definida como o processo pelo qual partículas são reconhecidas e internalizadas por uma determinada célula (Stuart e Ezekowitz, 2008). Elie Metchnikoff foi o primeiro a sugerir-la como um mecanismo evolutivo destinado a proteção (Metchnikoff, 1884). Este fenômeno é universal dentro do reino animal, contudo, sua origem parece preceder seu surgimento, uma vez que mecanismos muito similares são observados em seres unicelulares (Chen *et al.*, 2007). Um exemplo da ancestralidade deste mecanismo é vista na comparação entre amebas e macrófagos, uma vez que ambos são capazes de: (i) reconhecer seu alvo através de receptores de superfície (Allen e Dawidowicz, 1990) e (ii) eliminá-lo por meio da produção de radicais de oxigênio (Davies *et al.*, 1991).

Assim, é possível observar que muitos dos mecanismos geralmente considerados como sendo específicos do sistema imune de metazoários mais derivados, na verdade, surgiram para atender funções completamente distintas, sendo subsequentemente integrados ao sistema imune. Isto pode ser visto com os mecanismos de reconhecimento *self/nonself* e fagocitose. Ambos os processos são altamente especializados em vertebrados, mas suas origens parecem anteceder o surgimento de

organismos multicelulares, e, por conseguinte, anterior a qualquer esboço de sistema imunológico.

1 – Imunidade e sistema imune

A palavra imunidade, originada do latim (*immunitate*), pode significar privilégio, isenção, liberdade ou prerrogativa. No entanto, a conotação biológica ainda é a mais comumente associada ao termo, significando “o estado de um organismo que resiste a infecções ou infestações, por possuir anticorpos específicos contra o agente agressor” (Michaelis, 2009). Dicionários específicos da área médica mostram um significado bastante similar para esta palavra, sendo definida como: “*Acquired or innate resistance or protection from a pathogenic microorganism or its products or from the effects of toxic substances such as snake or insect venom*” (Cruse e Lewis, 2009). Em contrapartida, livros textos que abordam o tema podem apresentar conceitos muito mais concisos, cuja definição é: a resistência a doenças, mais especificamente as doenças infecciosas (Abbas e Lichtman, 2012). Assim, pode-se observar que a imunologia, que é o ramo da ciência destinado a estudar a imunidade e seus mecanismos subjacentes, visa entender os processos fisiológicos pelos quais os animais mantêm a homeostase frente a microorganismos invasores (Parham, 2009).

É conhecido o fato de que, para a maioria das infecções, o número de indivíduos comprometidos é bem menor que o de expostos, indicando que a maioria dos organismos tem condições de combater esses agentes e impedir a sua progressão (Janeway, 2001; Machado *et al.*, 2004). Para se entender como ocorre o processo de combate às infecções, é necessário conhecer as partes que formam o sistema imune. Este é composto de órgãos/tecidos, células e moléculas, tais como os gânglios linfáticos, os fagócitos e os anticorpos respectivamente, que medeiam à resistência no indivíduo. Sendo assim, pode-se dizer que a função fisiológica do sistema imunológico é prevenir infecções e erradicar as já estabelecidas (Abbas e Lichtman, 2012). Para atuar contra infecções, animais se utilizam de dois mecanismos distintos: o sistema imune inato e o adquirido.

1.1 – Imunidade inata

A imunidade inata, também conhecida como imunidade nativa ou natural, é assim denominada devido ao fato de que todo organismo saudável a possui e esta sempre se encontra preparada para bloquear e/ou eliminar rapidamente os

microorganismos invasores. O conhecimento dos mecanismos e processos relacionados a imunidade inata em vertebrados é muito amplo. Sabe-se que em mamíferos, a primeira barreira da imunidade inata pode ser física ou química e isto é visto com as barreiras epiteliais (epitélio e mucosas) e o suco gástrico, respectivamente (Diamond *et al.*, 2000; Algood e Cover, 2006). O epitélio atua tanto por meio da contínua formação de células queratinizadas (Shetty e Gokul, 2012) quanto através da produção de substâncias antimicrobianas, tais como as defensinas (Klotman e Chang, 2006). Em contrapartida, o suco gástrico é efetivo como barreira, pois diminui o pH da cavidade estomacal até valores muito baixos, e este meio ácido inibe o crescimento da maioria dos microorganismos (Algood e Cover, 2006).

Caso um microorganismo consiga ultrapassar tais barreiras em um hospedeiro vertebrado, e chegar ao seu meio interno (*e.g.* tecidos ou corrente sanguínea), entra em ação o segundo nível da imunidade inata, no qual se encontram os fagócitos, as células *natural killer* (NK) e diversas proteínas plasmáticas, como por exemplo, o sistema complemento (Janeway *et al.*, 2001; Greenberg e Grinstein, 2002; Hamerman *et al.*, 2005). Nos mamíferos, as principais células fagocitárias são os neutrófilos e monócitos. Os neutrófilos são o primeiro tipo celular a responder a maioria das infecções, principalmente às causadas por fungos e bactérias. São capazes de infiltrar em tecidos infectados, fagocitando os patógenos e morrendo após algumas horas (Kumar e Sharma, 2010). Os monócitos também possuem o mesmo tipo de atividade fagocítica, contudo, eles se diferenciam em macrófagos ao entrar nos tecidos (Van Ginderachter *et al.*, 2006). As células NK são um tipo de linfócito, responsáveis pelo reconhecimento e destruição de células danificadas ou infectadas por microorganismos, principalmente vírus e protozoários (Korbel *et al.*, 2004). Em contrapartida, o sistema complemento é composto por proteínas plasmáticas ligadas à membrana, que são de extrema importância na defesa contra microorganismos invasores (Janeway *et al.*, 2001).

Similarmente aos vertebrados, invertebrados também utilizam a imunidade inata como a primeira linha de defesa (Salzet, 2001; Iwanaga e Lee, 2005). A epiderme poder ser encarada como a barreira inicial que os microorganismos devem superar a fim de infectá-los. Em artrópodes, esta defesa já se inicia com a cutícula, que pode ser mais espessada, menos reticulada ou conter uma maior concentração de melanina. Neste último aspecto, este pigmento pode exibir papel tanto físico, fortificando a cutícula, quanto químico, uma vez que este pigmento também é tóxico para microorganismos (Moret e Moreau, 2012). Além disso, o trato intestinal também é recoberto por uma

matriz quitinosa, que formam a membrana peritrófica, diminuindo assim o acesso de microorganismos através da alimentação. Também já se sabe que insetos são capazes de produzir moléculas similares a defensinas (Bulet *et al.*, 1999). Somando-se a isso, o lumen do trato intestinal é mantido como um ambiente hostil, graças à secreção de lisosimas e espécies reativas de oxigênio (Daffre *et al.*, 1994; Há *et al.*, 2005).

Caso um agente infeccioso consiga invadir os tecidos de um invertebrado, entra em ação o segundo nível da imunidade inata (os fagócitos) capazes de engolfar qualquer partícula estranha (Reade, 1968). A fagocitose, como descrita por Ellie Metchnikoff, é um mecanismo ancestral de defesa, sendo observado desde Porifera até grupos mais derivados, tais como Mollusca e Insecta (Amano, 1990; Sauvé *et al.*, 2002; Rosales, 2011). Porém, diferentemente do observado em mamíferos, invertebrados não possuem células altamente especializadas em fagocitose, tais como os neutrófilos e monócitos. Estes fagócitos especializados parecem ter surgido nos vertebrados basais, como por exemplo, os ciclostomados (Takahashi, 2001). Assim, nos invertebrados, as células que exercem a função de fagocitose, são grosseiramente chamadas de amebócitos ou fagócitos. Contudo a nomenclatura varia muito a depender do grupo em questão (Söderhäll, 2010). Além dos fagócitos, uma possível célula *natural killer* (Porchet-Henneré *et al.*, 1992; Khalturin *et al.*, 2003) já foi registrada. Foi observado que a ascídia *Botryllus schlosseri* expressa a proteína CD94, um receptor transmembrana relacionado ao receptor de lectina tipo-C (Khalturin *et al.*, 2003). Esta proteína é um marcador característico das células *NK* de vertebrados (Biassoni *et al.*, 2001). Um arcabouço de sistema complemento também já foi detectado (Nonaka e Yoshizaki, 2004; Nonaka, 2011). Foi visto um aumento da fagocitose pelos celomócitos de equinodermos quando leveduras opsonizadas com a proteína C3 do sistema complemento de mamíferos foram oferecidas a estas células (Bertheussen, 1982). Já nos artrópodes, o sistema profenoloxidase (proPO) é conhecido, e atua similarmente ao sistema complemento de vertebrados. Este sistema consiste de proteínas e capazes de se ligar a polisacarídeos e outros compostos associados a microorganismos (Cerenius e Söderhäll, 2004).

Apesar da comprovada eficiência de todos os mecanismos citados, eles não são efetivos em todas as situações de infecção. Assim como seus hospedeiros, os microorganismos patogênicos também sofreram pressões evolutivas, que os direcionaram a maneiras cada vez mais eficientes de resistir e/ou burlar as defesas proporcionadas pela imunidade inata (Hornef *et al.*, 2002). Concomitante a isso, a

imunidade inata também não é capaz de lidar com substâncias estranhas e não infecciosas. Nesse sentido, o sistema imunológico adquirido é necessário para combater estes tipos de desordem.

1.2 – Imunidade adquirida

A imunidade inata lida com aspectos comuns a classes de organismos invasores, meramente reconhecendo como estranho algo que consiga chegar ao meio interno. O sistema imune adquirido por outro lado tem uma alta especificidade pelos seus alvos, sendo capaz de tratar exclusivamente de cada substância produzida por um dado microorganismo ou de substâncias não infecciosas (Eales, 2003). Em mamíferos, sabe-se que a imunidade adquirida tem dois componentes principais: os linfócitos T e B, e os anticorpos produzidos por este último, que são liberados na circulação e nas mucosas. Devido a isso, em vertebrados, a imunidade adquirida é dividida em dois ramos: humoral e celular (Dempsey *et al.*, 2003).

A imunidade humoral tem como componentes principais os anticorpos (imunoglobulinas-Ig) e os linfócitos B. A síntese de anticorpos começa após os antígenos passarem pelos órgãos linfóides e estimularem os linfócitos. Estes se diferenciam em plasmócitos secretores, que passam a produzir diferentes tipos de imunoglobulinas (Bishop *et al.*, 2003). Estes anticorpos são secretados no sistema circulatório e nas mucosas, neutralizando e destruindo os microorganismos e toxinas presentes fora da célula. Assim, uma das funções mais importantes da imunidade humoral é impedir que patógenos presentes nos fluídos corporais consigam ter acesso as células ou ao tecido conjuntivo do hospedeiro, evitando assim o estabelecimento de infecções (Rote, 2012). Contudo, quando os microorganismos se encontram no interior de suas células alvo, os anticorpos não têm mais nenhum efeito direto sobre eles, e neste caso, entra em ação a imunidade celular.

A imunidade celular recebe este nome, pois, seus principais efetores são os linfócitos-T. No estado de repouso estas células são precursores inativos que necessitam ser estimuladas por antígenos, e geralmente por outros sinais, antes que eles se tornem completamente ativadas. Estes linfócitos dividem-se em duas categorias, cujas funções são distintas, mas complementares em muitas ocasiões (Rote, 2012). Os linfócitos-T auxiliares (*helper T cells*) possuem um receptor CD4 em sua superfície e são diretamente responsáveis pela ativação dos macrófagos, fazendo com que a atividade microbicida deste último seja aumentada e atuam indiretamente na produção de

anticorpos. Estes linfócitos produzem citocinas e expressam moléculas de superfície, as quais se ligam a receptores nos linfócitos B, estimulando a síntese de imunoglobulinas, ou a macrófagos, promovendo a morte dos microorganismos fagocitados (Broere *et al.*, 2011). Já os linfócitos T citotóxicos (*cytotoxic T cells*) sintetizam os receptores CD8, e sua função é destruir células que contenham patógenos ou proteínas microbianas em seu citoplasma. As células T citotóxicas reconhecem os peptídeos associados ao complexo maior de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex – MHC*) presentes nas células infectadas e as induzem a entrar em apoptose, erradicando assim o reservatório de infecção (Sigal *et al.*, 1999; Zhang e Bevan, 2011).

Com relação à imunidade adquirida, o conhecimento para os invertebrados é bastante restrito. Primeiramente, tem-se admitido que eles contam somente com a imunidade inata, não possuindo o sistema imune adaptativo. Isto também implica na ausência de linfócitos e de um sistema humoral baseado em anticorpos (Murphy *et al.*, 2007; Schmid-Hempel, 2011). De fato, invertebrados não possuem as tão conhecidas imunoglobulinas presentes em vertebrados (Ota *et al.*, 2000). No entanto, alguns estudos vêm mostrando que apesar de não terem tais proteínas, estes animais possuem moléculas naturalmente presentes em seus fluidos corporais que apresentam similaridades com as imunoglobulinas de vertebrados (Smith e Taylor, 1975). Tais moléculas parecem ser as lectinas (Arason, 1996), caracterizadas como sendo glicoproteínas que portam um ou mais sítios de ligação a açúcares e que são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados (Malagoli *et al.*, 2010). Em invertebrados, as lectinas têm sido sugeridas por atuarem na resposta imune através da indução da aglutinação de bactérias ou da atuação como opsoninas e aumento da atividade fagocítica dos celomócitos (Bayne, 1990). Assim, de uma maneira geral, mesmo não apresentando moléculas tão específicas e diversificadas quanto às imunoglobulinas dos vertebrados, as lectinas dos invertebrados parecem exercer muito bem este papel. Adicionalmente, estudos com o genoma de *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* tem identificado superfamílias de imunoglobulinas nestes dois filos (Vogel *et al.*, 2003).

Nos invertebrados, a imunidade celular é muito conhecida, sendo encarada como o principal mecanismo de combate a infecções. Estes animais também são ditos por não possuírem linfócitos, tal como visto em vertebrados. Porém, células similares a linfócitos (*“lymphocyte-like” cells* - LLC) têm sido encontradas em alguns grupos e têm-se visto que suas funções são bastante semelhantes as dos linfócitos de vertebrados.

Estudos morfológicos das LLC têm mostrado uma enorme similaridade (Scippa *et al.*, 1982). Além disso, em tunicados, estas células têm sido relacionadas a três tipos de eventos muito importantes: (i) rejeição de aloenxertos (Raftos *et al.*, 1987a; 1987b) e não fusão entre colônias (Sabbadin *et al.*, 1992); (ii) citotoxicidade, possuindo mecanismos similares aos observados em células T de vertebrados (Parrinello *et al.*, 1993; 1994) e (iii) proliferação celular em resposta a mitógenos (Tam *et al.*, 1976). Pode-se somar a estes eventos a existência de um arcabouço do complexo maior de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex-like Systems*) (Raftos e Briscoe, 1990; Raftos, 1994).

Assim, é possível ver que o sistema imunológico é um complexo e intrincado conjunto de mecanismos, destinados a manter o correto funcionamento dos organismos. Primeiramente se observa a ação da imunidade inata, destinada ao combate de corpos estranhos, mas que não apresentam especificidade aos seus alvos. Caso esta primeira etapa da defesa não consiga conter o invasor, entra em ação a imunidade adquirida, com seus dois tipos de mecanismos, a fim de tornar a resposta imune mais eficiente. Para os mamíferos, pode-se ver uma dualidade de mecanismos: de um lado estão os linfócitos B, produzindo anticorpos que atacam os microorganismos e substâncias não infecciosas presentes na corrente sanguínea e do outro os linfócitos T (auxiliares e citotóxicos), que combatem os microorganismos intracelulares. Nos invertebrados, os mesmos princípios e às vezes até os mesmos mecanismos são observados. A imunidade innata se constitui como sua primeira linha de defesa, porém a imunidade celular é o principal mecanismo a combater infecções. Assim, pode ser visto que o sistema imune destes organismos exibe uma “simplicidade” real, que só pode ser correlacionada com os vertebrados mais basais.

2 – Processo inflamatório

A inflamação é uma resposta dos tecidos conjuntivos vascularizados a agressões de diversas naturezas, visando destruir, diluir ou limitar a disseminação do agente agressor. Além da função voltada para a defesa, a resposta inflamatória deflagra uma série de fenômenos que atingem o auge após a eliminação do agente estressor, visando o reparo dos tecidos lesados (Medzhitov, 2008; Ashley *et al.*, 2012).

Em vertebrados, principalmente mamíferos, os mecanismos teciduais, celulares e moleculares subjacentes ao processo inflamatórios são relativamente bem conhecidos (Lawrence *et al.*, 2002; Medzhitov, 2008; Ricciotti e Fitzgerald, 2011;

Ashley *et al.*, 2012). Sabe-se que fenômenos vasculares e celulares tais como o movimento de proteínas do plasma e de leucócitos do sangue, para o tecido extravascular, que levam ao surgimento de quatro sinais cardeais para a detecção da inflamação, principalmente observados em mamíferos: calor, vermelhidão, inchaço (edema) dor e por último a perda de função (Lawrence *et al.*, 2002; Luengo, 2005).

No entanto, quando se trata do processo inflamatório em invertebrados, a situação é complicada, pois, nem mesmo a definição comumente utilizada para o processo pode ser empregada, uma vez que muitos dos táxons de invertebrados, nem sequer possuem um sistema circulatório. Assim, para o estudo dos mecanismos inflamatórios em invertebrados, um conceito “mais simplificado” e abrangente deve ser utilizado. A definição de inflamação, elaborada por Ellie Metchnikoff, satisfaz a grande variedade de padrões corporais observados entre os invertebrados (Metchnikoff, 1968a, 1968b). Este autor definiu o processo inflamatório como sendo: uma migração celular seguida de fagocitose. Assim, sabendo-se que a fagocitose é observada desde os metazoários mais simples (Wilson, 1907), até os mais derivados (Sauvé *et al.*, 2002), esta definição se mostra mais adequada para o estudo da inflamação em animais não vertebrados.

De maneira geral, a resposta inflamatória em invertebrados tem dois processos principais: fagocitose e encapsulamento. As células envolvidas no primeiro processo são os fagócitos, que na maioria, mas não em todos os invertebrados, são compostos por um único tipo. Contudo, o bivalve *Mytilus edulis* e o tunicado *Ciona intestinalis* possuem dois tipos, descritos como granulócitos basofílicos e eosinofílicos (Rowley, 1996) e amebócitos hialinos e granulares (Rowley, 1981). Após a fagocitose, o processo evolui para a degradação intracelular do material fagocitado, com os fagócitos produzindo diversos compostos reativos tais como radicais de oxigênio, óxido nítrico e enzimas hidrolíticas (Cheng *et al.*, 1975; Radomski *et al.*, 1991; Pipe, 1992). O encapsulamento consiste primeiramente na atividade de células granulares que envolvem o alvo e liberam fatores pró-inflamatórios e após isso, se dá o encapsulamento de fato, que é mediado por fagócitos, que efetivamente envolvem e isolam o corpo estranho (Ratcliffe e Rowley, 1985; Pech e Strand, 1996). Na ascídia *Ciona intestinalis*, parece existir certa especificidade em relação ao material incapsulado. Em reações de encapsulamento frente a endoparasitas, a cápsula formada parece ser constituída por epitélio similar ao dos canais ciliados (Dudley, 1968). Em contrapartida, em experimentos induzindo a mesma resposta, por meio da injeção de

eritrócitos de ovelha, o processo ocorreu por meio da infiltração de hemócitos na área, isolamento do material estranho, culminando na degranulação e liberação de substâncias para destruir o corpo estranho ao mesmo tempo em havia o reparo do ferimento (De Leo *et al.*, 1996).

Já os mecanismos moleculares inerentes ao processo inflamatório de invertebrados não tem sido muito estudados, mas sabe-se que estes organismos são capazes de produzir vários mediadores inflamatórios. Existem moléculas pró-inflamatórias similares a citocinas (*Cytokine-like molecules*). Na áscidia solitária *Syela clava*, moléculas similares a interleucina (IL-1 α e IL-1 β) foram encontradas e a hemolinfa deste animal foi capaz de estimular a proliferação mitogênica dos hemócitos deste invertebrado assim como timócitos de roedores (Raftos *et al.*, 1991). No bivalve *Mytilus edulis*, a estimulação de seus hemócitos por meio do desafio com lipopolissacarídeos é capaz de causar a liberação de TNF ou fatores similares a interleucina (Hughes *et al.*, 1991). Estas moléculas são capazes de alterar o comportamento aderente (Hughes *et al.*, 1990) e estimular atividade quimiotática dos seus celomócitos (Stefano *et al.*, 1993). Além das citocinas, são registrados nos invertebrados, o sistema de ativação da profenoloxidase, que consiste na formação de quinonas tóxicas, intermediárias na formação da melanina (Taylor, 1969) e eicosanóides, fatores altamente envolvidos nas reações imunes, especificamente na formação de nódulos, de insetos (Miller *et al.*, 1994).

Novamente, é possível observar que, similarmente ao observado para vertebrados, os invertebrados são capazes de reações inflamatórias bastante intrincadas, comtam com um repertório de processos e mecanismos muito complexos.

3 – Resposta imune a parasitas

Na área médica, o termo parasita tem sido utilizado para se referir a eucariotos unicelulares e metazoários patogênicos. Estes organismos podem ser considerados os invasores biologicamente mais sofisticados que o sistema imune dos vertebrados já encontrou (Sacks e Sher, 2002; Zambrano-Villa *et al.*, 2002). Apesar da sua diversidade filogenética, organismos parasitas compartilham muitas características biológicas (Poulin e Morand, 2000; Poulin, 2006). Frequentemente, estes animais apresentam ciclos de vida complexos, consistindo de estágios morfológicos e antigênicos muito distintos (Parker *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004; Gatton e Cheng, 2004) que produzem infecções crônicas, garantindo assim a transmissão entre seus hospedeiros. O sistema

imunológico desempenha um papel central na determinação do sucesso de infecções parasitárias, através do estabelecimento de um equilíbrio crítico destinado a garantir a sobrevivência tanto do hospedeiro como do patógeno.

Uma vez que os parasitas tenham suplantado as defesas inatas de um hospedeiro vertebrado, a resposta imune humoral e a celular são invariavelmente induzidas, geralmente contra uma ampla gama de componentes antigênicos de cada patógeno. O grande problema é que, devido à natureza da relação parasita-hospedeiro, poucos (e algumas vezes nenhum) destes processos são capazes de erradicar os parasitas. Estes mecanismos efetores podem ser amplamente classificados de acordo com o tipo de parasita (endo ou ectoparasita) contra o qual eles são direcionados.

3.1 – Endoparasitas

Parasitas extracelulares compreendem um grande grupo compostos pelos mais diversos táxons (i.e. Platyhelminthes, Acanthocephala, Nematoda, Nematomorpha). Devido à variação de tamanho, locais de preferência, e mecanismos de evasão da resposta imune, não é surpreendente que a resistência contra muitos desses patógenos, muitas vezes requer ambos os mecanismos celulares e humorais (Montesano *et al.*, 1999; MacDonald *et al.*, 2002). Resistência a infecção parasitária é mediada em parte por fatores solúveis preexistentes, que reconhecem e destroem invasores ou os marcam para serem eliminados pelas células efectoras. A ativação do complemento é a primeira linha de defesa contra os parasitas extracelulares. Além desta cascata, outros produtos do SC são utilizados para desencadear resposta imune celular no local da infecção.

Helmintos parasitas são muito grandes para serem fagocitados e alguns estudos têm sugerido que em vez dos macrófagos, os eosinófilos poderiam desempenhar uma função importante na defesa contra estes organismos. Estas células são capazes de matar várias espécies diferentes helmintos, quando na presença de anticorpos e de moléculas do sistema complemento (Klion e Nutman, 2002). Outras células do sistema imune, tais como as células *natural killer* e os linfócitos T também são apontados como efetores na luta contra parasitas extracelulares (Scalise *et al.*, 1992; Kasper *et al.*, 1996; Hunter *et al.*, 1997; Scharton-Kersten e Sher, 1997).

Considerando os invertebrados como hospedeiros, o conhecimento acerca dos mecanismos de defesa contra infecções parasitárias é limitado, mas sabe-se que eles também utilizam mecanismos celulares e humorais. A maior parte do que se sabe é derivado de estudos com artrópodes. Em relação aos endoparasitas, insetos são capazes

de reconhecer e combater tais microorganismos, primeiramente pelo reconhecimento de moléculas características dos parasitas, tais como os lipopolissacarídeos e os padrões moleculares associados a patógenos (*Microbe-associated molecular pattern – MAMP*) (Kim *et al.*, 2008; Pal e Wu, 2009). No caso de infecções por metazoários parasitas (*e.g.* Nematoda) a imunidade humoral e celular também entram em ação. No caso da primeira, já foi registrado que o mosquito *Aedes aegypti*, é capaz de produzir defensinas quando esta infectada com o nemátóidio *Brugia pahangi* (Chalk *et al.*, 1994). Além das defensinas, também existe aumento na concentração de cecropinas e transferinas, em mosquitos parasitados por outros nematóides (Chalk *et al.*, 1995; Magalhães *et al.*, 2008). Em relação a imunidade celular, situação muito similar acontecem em invertebrados. Devido ao tamanho avantajado de certos endoparasitas, a fagocitose não consegue ser realizada com eficiência. Assim, nas espécies *A. aegypti* e *Armigeres subalbatus*, infectadas por *Dirofilaria immitis* e *B. malayi* respectivamente, existe uma interação entre os hemócitos estes nemátodes parasitas (Christensen e Forton, 1986; Zhao *et al.*, 1995). O processo, caracterizado como captura e destruição dos parasitas, consiste numa interação do sistema imune humoral (melanização) e celular (encapsulamento) do hospedeiro e o nematóide (Liu *et al.*, 1998).

Contudo, apesar dos eficientes mecanismos imunes, muitos endoparasitas desenvolveram estratégias sofisticadas para driblar este tipo de ataque, tanto em hospedeiros invertebrados (Aliota *et al.*, 2007; Erickson *et al.*, 2009) que sabidamente possuem o sistema imune mais “simplificado”, como em vertebrados (Joiner, 1988; Pearce *et al.*, 1990; Saraiva *et al.*, 1995; Goto e Sanches, 2013), onde as respostas mais sofisticadas são encontradas.

3.2 – Ectoparasitas

Além dos organismos invasores que habitam as cavidades internas do corpo, denominados assim de endoparasitas, existem parasitas que se fixam à parte externa e lá sobrevivem, sendo conhecidos como ectoparasitas (Rohde, 2005). Como já detalhado anteriormente, é possível observar que os hospedeiros apresentam complexas respostas imunes para lidar com infecções parasitárias. Contudo, diferente do que poderia se esperar, ectoparasitas também desencadeiam intrincadas reações imunes (Wikel, 1999). De uma forma generalizada, mamíferos respondem a artrópodes ectoparasitas, evocando a maioria dos recursos oferecidos pelo sistema imune, tais como os linfócitos T, B, mastócitos, granulócitos, sistema complemento e produção de anticorpos (Arlan, 1996;

Jones, 1996; Sandeman, 1996; Wikel, 1996; Wrenn, 1996). Porém, apesar do amplo repertório de defesas imunes em seus hospedeiros, estes parasitas também são capazes de driblar o sistema imunológico de seus alvos. Por exemplo, a picada de um inseto, em geral, desencadeia uma coceira local. Contudo, a saliva do carrapato *Ixodes dammini* contém carboxipeptidase, capaz de hidrolisar a bradiquinina, que é um mediador envolvido em tal sensação (Ribeiro *et al.*, 1985).

Estudos sobre as respostas imunes de invertebrados frente a ectoparasitas são quase inesistentes. Mesmo com artrópodes, um dos grupos melhor estudados quando se fala de respostas imunes, o conhecimento é pequeno. Um estudo com a abelha *Apis mellifera* (Yang e Cox-Foster, 2005) mostrou que indivíduos parasitados pelo ácaro *Varroa destructor* tornam-se imunossuprimidos. Neste trabalho, foi analisada a expressão de genes codificando peptídios antimicrobianos (abaecinas, defensinas e himenoptaecina) e enzimas relacionadas à imunidade (fenol oxidase, glicose desidrogenase, glicose oxigenase e lisozima). Os resultados mostraram que houve uma diminuição nos marcadores analisados e isto indica que ectoparasitas também são capazes de prejudicar hospedeiros invertebrados

Assim, durante infestações parasitárias, é visível que o sistema imune é completamente capaz de identificar e responder a tais agentes estressores. Contudo, em situações naturais, que são o resultado de um longo processo evolutivo entre parasitas e hospedeiros, a resposta imune deste último fornece somente um moderado nível de proteção e raramente erradica todos os parasitas (Allen, 1994) e algumas vezes pode ser diminuída, tornando o hospedeiro imunossuprimido (Yang e Cox-Foster, 2005). O que geralmente se observa é um equilíbrio entre as respostas imunológicas dos hospedeiros e sua eficácia em combater os parasitas, transformando-se assim em uma espécie de inflamação crônica.

4 – Imunidade em Echinodermata

A percepção acerca das respostas imunes em invertebrados tem mudado drasticamente nos últimos anos. Inicialmente acreditava-se que estes organismos contavam somente com o reconhecimento não-específico, contudo, é agora conhecido que o sistema imunológico destes animais é muito mais complexo e diversificado do que se podia imaginar (Hoffmann e Reichhart, 2002; Ghosh *et al.*, 2011). Neste contexto, é possível encontrar mecanismos ou princípios similares aos descritos para vertebrados (Iwanaga & Lee, 2005). Metchnikoff (1892) observou a atividade fagocítica

de arqueócitos (Porifera) e notou que estas células são capazes de reconhecer e eliminar partículas estranhas ao organismo. Assim, a partir de seus estudos pioneiros, a resposta imune em invertebrados começou a ser desvendada ao passo que abordagens evolutivas dos mecanismos imunológicos ganharam destaque (Gigli e Austen, 1971; Smith e Davidson, 1992; Müller e Müller, 2003; Litman *et al.*, 2005). O estudo da imunidade em Echinodermata também começou com os experimentos de Ellie Metchnikoff (1968a; 1968b) que ao inserir um espinho de rosa em uma larva de estrela do mar, observou algum tempo depois que este objeto foi “atacado” por células da cavidade celomática da larva (Beck e Habicht, 1996).

Equinodermos podem ser definidos como animais celomados, não coloniais, inicialmente bilaterais, pentarradialmente simétricos quando adultos e exclusivamente marinhos (ainda que algumas formas suportem a água salobra) (Hyman, 1955; Fell & Pawson, 1966; Pawson, 2007). Como sinapomorfias, pode-se citar a presença do sistema vascular aquíífero, que se origina do celoma (hidrocele) e pode ser entendido como um sistema de canais revestido por epitélio e preenchido por fluido semelhante à água do mar. No entanto contêm proteínas e aminoácidos, além dos celomócitos, que formam a linha de frente do seu sistema imune (Fell & Pawson, 1966; Endean, 1966). Outra sinapomorfia importante é o endoesqueleto de carbonato de cálcio, que é derivado da mesoderme e coberto por uma epiderme frequentemente ciliada. Ele é composto de cristais de calcita magnésiana que formam o estereoma. Este endoesqueleto é poroso, sendo preenchido por tecido vivo, o estroma. (Hyman, 1955; Fell & Pawson, 1966; Pawson, 2007).

Atualmente, os Echinodermata, juntamente com os Hemichordata, são considerados os grupos mais antigos na evolução dos Deuterostomia (Chea *et al.*, 2005; Edgecombe *et al.*, 2011). Esta posição basal dos equinodermos os tornam importantes para entendimento da evolução dos padrões e mecanismos relacionados aos vertebrados (Long *et al.*, 2003; Whittaker *et al.*, 2006; Ikuta, 2011), e um importante aspecto a ser desvendado é a evolução do sistema imune (Smith e Davidson, 1992; Smith e Davidson, 1994; Vetvicka e Sima, 1998).

O sistema imune dos Echinodermata, assim como o de outros invertebrados, tem as células da cavidade celomática como sendo seu principal mecanismo de defesa. De maneira geral, equinodermos são ditos por possuir seis categorias de células celômicas: hemócitos, células cristal, células progenitoras, esferulócitos e células vibráteis (Smith, 1981; Chia e Xing, 1996). Os celomócitos são ditos por possuir

diversas funções (Smith *et al.*, 2010; Ramirez-Gomes e García-Arrarás, 2010), mas pouquíssimos são os trabalhos que abordam especificamente estas questões (Arizza *et al.*, 2007).

4.1 – Imunidade inata

Em echinodermos, a imunidade inata também se constitui como a primeira linha de defesa. Assim como outros visto para outros invertebrados (Moret e Moreau, 2012), equinodermos parecem apresentar defesas epiteliais atuando como primeira barreira para a invasão de microorganismos. Sabe-se que estes organismos possuem, mesmo que muito fina, uma cutícula que parece estar relacionada com proteção contra abrasão mecânica (Campbell e Crawford, 1991) e invasão de microorganismos (McKenzie e Grigolava, 1996). Além desta barreira física, existe a secreção de moléculas biologicamente ativas, que parece ter a função de proteção contra microorganismos (Canicatti e D'Ancona, 1990). O segundo nível de imunidade innata em Echinodermata é composto pelos fagócitos. Nestes animais, não existem indícios de célula tão especializadas como os neutrófilos ou monócitos, e os amebócitos fagocíticos (fagócitos) são os responsáveis, entre outras coisas (Ramírez-Gómez e García-Arrarás, 2010), pela regeneração de ferimento (Johnson e Chapman, 1970) e pela fagocitose de corpos estranhos (Borges *et al.*, 2002). Além disso, um sistema complemento muito intrincado é encontrado neste filo (Gross *et al.*, 1999). Já foi documentado que, após a injeção de eritrócitos opsonizados pela proteína C3 humana, o ouriço *S. droebachiensis* mostrou um aumento na atividade fagocítica (Bertheussen, 1981; 1982; Bertheussen e Seljelid, 1982). Isto sugere que os celomócitos deste ouriço possuem os receptores para C3b or C3bi.

4.2 – Imunidade adaptativa

Com relação à imunidade adaptativa, invertebrado de uma maneira geral, são encarados por não a possuírem e equinodermos também seguem o padrão, tendo a imunidade celular como seu principal mecanismo de defesa. Recentemente foram identificadas células similares aos linfócitos B e T de vertebrados (Leclerc, 2012a; 2012b 2013). Além disso, células com potencial para atividade citotóxica (Arizza *et al.*, 2007) e a produção de anticorpos, já foram verificadas (Delmotte *et al.*, 1986; Leclerc, 2013; Vincent *et al.*, 2014). Estudos com os celomócitos do ouriço *Paracentrotus lividus*, mostraram atividade citotóxica para a fração contendo os esferulócitos

transparente (Arizza *et al.*, 2007). Neste trabalho foi visto que a fração enriquecida com tais esferulócitos quando na presença de amebócitos, apresentou alta atividade citotóxica contra eritrócitos de coelho e células tumorais da linhagem K562, através da liberação de lisinas. Em se ratando da produção de anticorpos, desde 1973, existem indícios de que equinodermos são capazes de respostas mais específicas através da produção de fatores humorais liberados no líquido celomático. No entanto, so recentemente (Leclerc, 1973; 2013; Vicent *et al.*, 2014) esta questão foi de fato desvendada. Foi encontrado, na estrela do mar *Asterias Rubens*, o gene Ig kappa e sua possível sequência de aminoácidos foi então deduzida (Vicent *et al.*, 2014).

4.3 – Inflamação e reações a parasitas

A fagocitose e o encapsulamento também são os principais mecanismos inflamatórios observados em equinodermos. A capacidade fagocítica já é muito conhecida nestes organismos (Chia e Xing, 1996; Gross *et al.*, 1999) e trabalhos mostrando que equinodermos tem a capacidade de encapsular corpos estranhos também não são incomuns (Bertheussen, 1981; Canicatti e D'Ancona, 1989). No que diz respeito aos aspectos moleculares do processo inflamatório em equinodermos, pouco é sabido. Conhece-se mediadores inflamatórios, como por exemplo, as moléculas similares a citocinas. Já foi observado que, o fluido celomático de *Asterias forbesi* possui fatores similares a citocinas, denominado de “*sea star factor*”, que foram capazes de ativar macrófagos e estimular quimiotaxia em monócitos de vertebrados (Prendergast e Liu, 1976) e esta molécula também é capaz de desencadear processos similares a uma reação inflamatória.

Com relação aos organismos parasitando o equinodermos, a maioria dos trabalhos foram feitos no sentido de identificar o simbiote ou caracterizar a associação (Jangoux, 1987a; 1987b). Poucos são os trabalhos tratando dos aspectos fisiológicos ou imunes da interação. Destes, boa parte tratam de endoparasitas, principalmente bactérias e protozoários (Jellett *et al.*, 1978; Taylor e Bang, 1978; Messer e Wardlaw, 1980; Yui e Bayne, 1983) e comumente apresentam uma abordagem morfológico-estrutural, restritas a caracterização das modificações teciduais na área lesada. Investigações dos aspectos moleculares inerentes as infecções parasitárias são muito raras.

Ponderando a quantidade de registros os abordando ectoparasitas de equinodermos (Jangoux, 1987a; 1987b), pode-se considerar que são quase inesistentes trabalhos sobre a resposta fisiológicas dos hospedeiros frente a estas infecções. Um

exemplo muito claro pode ser visto com os moluscos eulimídios que são gastrópodes parasitas específicos de Echinodermata. É visível que a taxonomia do grupo caminha a largos passos (Waren, 1983), relatos de associação (Queiroz *et al.*, 2011; 2013) e aspectos do desenvolvimento (Queiroz e Sales, 2013) são relativamente comuns, mas pouco se sabe sobre o que estes moluscos provocam a seus hospedeiros. *Sabinella traoglodytes* é um destacado exemplo de como estes parasitas podem alterar o hospedeiro. Este eulimídio vive dentro de galhas formadas nos espinhos do ouriço *Eucidaris tribuloides*, cujas alterações morfológicas são bastante evidentes, mas os aspectos fisiológicos são completamente desconhecidos

Assim, o presente trabalho foi realizado para caracterizar o processo inflamatório no espinho de *Eucidaris tribuloides* e será apresentado em dois capítulos. O primeiro traz a caracterização das células da cavidade celomática e para investigá-las foi realizada uma abordagem integrada. Os celomócitos foram descritos por meio da utilização de células vivas, citoquímica e microscopia eletrônica de transmissão. Com este capítulo foi possível obter as ferramentas necessárias para investigar o processo inflamatório. O capítulo II trata da inflamação do espinho, utilizando abordagem estrutural (histologia, microscopia eletrônica de varredura e microtomografia computadorizada) e celular/molecular. Os dados obtidos neste último indicam que a inflamação causada pelo molusco parece ser um evento local, não se refletindo dentro da cavidade celomática do hospedeiro.

OBJETIVOS

Investigar as respostas fisiológicas de equinodermos frente ao parasitismo por moluscos eulimídios, caracterizando:

- As alterações quantitativas e qualitativas nos celomócitos;
- As modificações estruturais e teciduais na área da lesão;
- A expressão de marcadores ligados a processos inflamatórios.

Capítulo I

Caracterização dos celomócitos do ouriço-do-mar

Eucidaris tribuloides Lamarck, 1816

RESUMO

Nos equinodermos, o líquido celomático e seus componentes celulares estão envolvidos em diversas funções, tais como nutrição e imunidade. Estas células são denominadas de celomócitos e neste filo existem registros de seis principais tipos: fagócitos, hemócitos, células cristal, células progenitoras, esferulócitos e células vibráteis. Comumente são estudadas por meio de células vivas em suspensão ou microscopia eletrônica de transmissão (MET) e procedimentos citoquímicos, são raramente utilizados. Assim, o presente capítulo visa caracterizar os celomócitos presentes no fluido celomático de *Eucidaris tribuloides* por meio de três técnicas distintas, mas integradas: suspensão de células visvas, preparações citoquímicas e microscopia eletrônica de transmissão. Foram identificados sete tipos diferentes de celomócitos, totalizando quatro grandes categorias: fagócitos, células progenitoras, células vibráteis e esferulócitos. Esta última apresentou quatro subpopulações: *vermelho*, *transparente*, *granular* e uma ainda não descrita: o esferulócito *irregular*. Para os esferulócitos (exceto o irregular) e a célula vibrátil, observou-se um processo contínuo de maturação e preenchimento citoplasmático respectivamente. Os esferulócitos foram divididos em três categorias, *inicial*, *intermediário* e *final*, cuja maturação consiste numa contínua diminuição do tamanho nuclear concomitante ao aumento do tamanho das esférulas citoplasmáticas. Já a célula vibrátil foi categorizada de acordo com o nível de preenchimento do citoplasma em *baixo*, *médio* e *alto*. O processo começa com células de núcleo pequeno, citoplasma grande, homogêneo e uma baixa razão núcleo/citoplasma ($R_{N/C}$), e segue até células com núcleo grande, citoplasma pequeno e uma alta ($R_{N/C}$). Assim, é possível observar que a falta de correspondência entre células vivas e MET têm se mostrado como o grande obstáculo no reconhecimento de novos tipos celulares e no estudo de suas respectivas funções. Pela utilização de suspensão de células vivas, preparações citoquímicas e MET, foi possível observar tipos novos (esferulócitos granular e irregular), pouco abordados (a célula progenitora) e o processo de maturação. Portanto, este tipo de abordagem integrativa se mostrou extremamente necessária para o estudo dos diferentes tipos de celomócitos em Echinoidea, podendo ser estendida para Echinodermata.

Palavras chave: Celomócitos, esferulócitos, processo de maturação

INTRODUÇÃO

O filo Echinodermata é formado por organismos deuterostomados basais exclusivamente marinhos (Edgecombe *et al.*, 2011), cujas características distintivas são: endoesqueleto composto por carbonato de cálcio na forma de calcita, sistema vascular aquífero e simetria radial pentâmera (Pawson, 2007). Estes animais são desprovidos de sistemas respiratório e circulatório especializados, como visto nos deuterostômios mais derivados (*e.g.* Vertebrata) contudo, estas funções são realizadas pelo fluido celomático e seus componentes celulares (Endean, 1966). Além das funções citadas, o celoma também participa nos processos de nutrição e imunidade, onde os celomócitos (definidos como células livres que circulam na cavidade celomática) são os principais componentes no mecanismo de resposta imune (Arizza *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2010).

Existem registros de seis principais tipos de celomócitos em equinodermos: fagócitos (ou amebócitos fagocíticos), hemócitos, células cristal, células progenitoras, esferulócitos e células vibráteis (Smith, 1981; Chia e Xing, 1996; Xing *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2010). Contudo, alguns tipos celulares são restritos a certos grupos taxonômicos. Um exemplo é visto com a classe Echinoidea (ouriço-do-mar), que apresenta somente três grandes categorias de celomócitos: os fagócitos, as células vibráteis e os esferulócitos. Este último é subdividido em duas categorias: esferulócitos vermelhos e transparentes (Johnson, 1969a; 1969b; Smith, 1981; Chia e Xing, 1996).

Apesar das funções fundamentais que os celomócitos desempenham na fisiologia dos equinodermos, tais como fagocitose ou encapsulamento, trabalhos que delimitem funções específicas para estas células ainda são muito raros. Mesmo dados acerca de sua origem e capacidade de diferenciação são desconhecidos ou estão sobre intensos debates (Chia e Xing, 1996; Silva, 2013). Para que estas questões possam ser melhor abordadas, é necessário que se tenha uma base sólida de conhecimento das características destas células e sua variabilidade.

Usualmente, os celomócitos são definidos somente com base em sua morfologia e características citoplasmáticas (*e.g.* amebócito petalóide ou filiforme, esferulócito vermelho ou transparente) (Liebman, 1950; Johnson, 1969a; 1969b; Service e Wardlaw, 1984). Grande parte destes estudos são feitos utilizando duas metodologias básicas: observações de células vivas em suspensão (Johnson, 1969a; Bertheussen e Seljelid, 1978; Smith, 1981; Pinsino *et al.*, 2008; McCaughey e Bodnar, 2012) ou microscopia eletrônica de transmissão (Chien *et al.*, 1970; Vethamany e Fung, 1972; Heatfield e

Travis, 1975a, 1975b). Outras técnicas, como os procedimentos citoquímicos, são raramente utilizados (Liebman, 1950; Holland *et al.*, 1965; Johnson, 1969b).

Os métodos citoquímicos são capazes de combinar aspectos particulares de cada uma das técnicas consagradas no estudo dos celomócitos de Echinodermata. Pode-se observar um grande número de células em um mesmo campo, tal como é feito em suspensões; e informações sobre a morfologia e a natureza química dos componentes celulares podem ser obtidas, assim como é visto em microscopia eletrônica de transmissão. No entanto, não existem estudos integrando estas abordagens para o estudo de celomócitos em Echinoidea. Neste contexto, o objetivo deste capítulo é caracterizar os celomócitos do ouriço-do-mar *Eucidaris tribuloides* Lamarck, 1816, utilizando para isso a observação de células vivas, células submetidas a diferentes técnicas de coloração e a microscopia eletrônica de transmissão.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas e extração de líquido celomático

Dez espécimes do ouriço *Eucidaris tribuloides* foram coletados no Canal de São Sebastião e mantidos em temperatura ambiente num aquário marinho no Laboratório de Biologia Celular de Invertebrados Marinhos, IB-USP. O fluido celômico foi coletado através da inserção da agulha de uma seringa previamente carregada com 1,5 ml de uma solução isosmótica anticoagulante (0,02 M EDTA, NaCl 460mM, Na₂SO₄ 7mM, KCl 10mM, HEPES 10mM, pH 8,2 - Dunham e Weissmann, 1986) na membrana peristomial do ouriço. Foi retirada a mesma quantidade de fluido celomático (totalizando 3 ml), e a densidade celular foi ajustada para 5×10^5 cells/ml, utilizando-se a câmara de Neubauer e a mesma solução anticoagulante.

Microscopia de luz

Foram examinadas células vivas em suspensão e lâminas de citocentrifugado. Para a observação de células vivas, o fluido celomático foi delicadamente espalhado sobre uma lâmina imediatamente após ser coletado e 20 células de cada tipo foram medidas a partir do sistema de imagens digitais (Opton). Algumas das preparações também foram observadas por microscopia de contraste de fase no microscópio invertido Nikon TE 300. Lâminas de citocentrifugado foram preparadas usando uma citocentrífuga (Fanen 248, 100 µl por poço, 80 x g / 5 min) e então fixadas por 45

minutos em vapor de formol. Em seguida, ou as lâminas foram montadas imediatamente (Entellan, Merck) sem mais preparações ou então foram coradas com Azul de Toluidina, Hematoxilina e Eosina ou Tricromo de Mallory (Martoja & Martoja 1967, Behmer *et al.* 1976). Para a observação das células vibráteis, modificações deste procedimento foram realizadas a fim de uma melhor preservação do flagelo. Após a retirada do líquido celomático, uma parte foi fixada por 3h em glutaraldeído 2,5% a temperatura ambiente antes da preparação das lâminas de citocentrifugado. A partir de então, o procedimento foi igual ao das preparações fixadas em vapor de formol.

Os tipos celulares foram determinados por meio da morfologia apresentada em tais preparações. As identificações basearam-se na forma geral e nas características nucleares e das inclusões citoplasmáticas, assim como descrito na literatura (*e.g.* Liebman, 1950; Holland *et al.*, 1965; Johnson, 1969b). Possíveis estágios de diferenciação foram observados para algumas subpopulações de esferulócito e para a célula vibrátil. Estes estágios foram determinados de acordo com suas características citoquímicas e diferenças estruturais do conteúdo citoplasmático destas células. Mensurações foram realizadas em lâminas de citocentrifugado, onde 50 células de cada estágio de diferenciação foram medidas, usando o mesmo sistema de imagem digital mencionado previamente.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O fluido celômico foi coletado e imediatamente fixado em glutaraldeído 2,5% por 12h, em temperatura ambiente. Os celomócitos foram então ressuspensos em solução anticoagulante, embebidos em ágar 2,5% e pós-fixados com tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato por 2h a 4°C (Taupin, 2008). Os celomócitos foram então desidratados em uma série gradativa de etanol (50, 70, 90 e 100%) e posteriormente embebidos em resina (Embed-812, EMS). Seções ultrafinas (5 to 7 μ m) foram coradas com acetato de uranila por 30 min e contrastadas com citrato de chumbo por 5 min. Em seguida, os cortes foram analisados em um microscópio eletrônico Zeiss EM900.

Análise estatística

Dados do diâmetro nuclear, diâmetro citoplasmático e da Razão núcleo/citoplasma ($R_{N/C}$), provenientes de lâminas de citocentrifugado, são apresentados como média $\pm$ desvio padrão para estruturas grandes (*e.g.* núcleo ou citoplasma) ou como diâmetro máximo e mínimo para as menores (*e.g.* esférulas). Uma análise de

variância (One-way ANOVA. GraphPad InStat Statistical Software v3.0) foi utilizada para testar as diferenças entre o diâmetro do núcleo dos diferentes estágios de maturação dos esferulócitos (*inicial*, *intermediário* e *final*) e do nível de preenchimento citoplasmático da célula vibrátil (*baixo*, *médio* e *alto*). Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

RESULTADOS

Foram identificados sete tipos diferentes de celomócitos no líquido celomático de *Eucidaris tribuloides*, totalizando quatro grandes categorias: fagócitos, células progenitoras, células vibráteis e esferulócitos. Esta última se subdivide em quatro tipos: *vermelho*, *transparente*, *granular* e uma subpopulação ainda não identificada, tratada aqui como esferulócito *irregular*. Para os esferulócitos (exceto o irregular) e a célula vibrátil, foi possível observar um processo contínuo de maturação e preenchimento citoplasmático respectivamente, dividido em três categorias. Nos esferulócitos, estes estágios foram denominados de: *inicial* (células com o maior diâmetro nuclear e citoplasma reticulado e/ou sem esférulas); *intermediário* (células cujo diâmetro do núcleo diminui ao passo que o citoplasma é preenchido e torna-se mais esferuloso); *final* (células com o menor diâmetro nuclear, comumente periférico e cujo citoplasma é bastante esferuloso). O diâmetro do núcleo entre estes estágios de maturação diferiu significativamente ($P < 0.05$) (Fig. 1).

Figura 1 – Diâmetro do núcleo dos esferulócitos de *Eucidaris tribuloides* (exceto o esferulócito irregular). Para cada tipo celular, letras diferentes indicam significância estatística entre os estágios de maturação ($p < 0.05$).

Para a célula vibrátil, os estágios de preenchimento do citoplasma foram avaliados através da afinidade ao azul de toluidina e denominados de uma forma geral pela razão núcleo/citoplasma, como: *baixo* (com um pequeno diâmetro do núcleo, grande diâmetro citoplasmático, com aparência homogênea e um baixo $R_{N/C}$); *médio* (com valores intermediários de diâmetro nuclear e citoplasmático, com aspecto heterogêneo devido a algumas regiões de alta intensidade ao corante e um $R_{N/C}$ médio) e *alto* (com diâmetro nuclear maior e diâmetro citoplasmático pequeno, mas que possuem a maior $R_{N/C}$ e a afinidade ao azul de toluidina muito alta). O diâmetro do núcleo não foi significativamente diferente ($P = 0.0744$), mas houve diferenças para o diâmetro do citoplasma ($P = 0.0003$) e para a Razão núcleo/citoplasma ($P = 0.0001$) (Fig. 2).

Figura 2 – Diâmetros do núcleo (A); do citoplasma (B) e Razão núcleo/citoplasma - $R_{N/C}$ - (C), da célula vibrátil de *Eucidaris tribuloides*. Letras diferentes indicam significância estatística entre os estágios de preenchimento ($p < 0.05$).

Fagócitos

Células vivas (Fig. 3A-F) e preparações não coradas (Fig. 3G): Este celomócito apresenta duas morfologias diferentes quando em suspensão: petalóide e filopodial (Fig. 3A e B). Contudo, ao passo que estas células espraíam, podem ser observadas três subpopulações distintas: fagócitos pequenos, células discoidais e poligonais (Fig. 3C-E respectivamente). O núcleo teve forma e posição variáveis, podendo ser bem evidente, arredondado e central ou pouco evidente, excêntrico e alongado, medindo (4,4 – 7,9 µm). O citoplasma foi bastante evidente, principalmente nas células discoidais e poligonais e variou muito em diâmetro, dependendo principalmente da subpopulação

Figura 3 – Fagócito. (A-E) Célula viva em contraste de fase; (F) Célula viva; (G) Célula fixada e não corada; (H-J) Célula corada com Azul de Toluidina, Hematoxilina e Eosina e Tricromo de Mallory respectivamente; (K-N) Microscopia Eletrônica de Transmissão. (K) Célula fagocitando; (L) Detalhe evidenciando algumas organelas e o núcleo; (M) Fagócito com o citoplasma bastante vacuolizado; (N) Fagócito com uma célula vibrátil sendo digerida. Legenda: CV – célula vibrátil; CN – cristal nuclear; ET – esferulócito transparente; EV – esferulócito vermelho; M - mitocôndria; MF – material fagocitado; N = núcleo, Nu – nucléolo; RER – retículo endoplasmático rugoso, Seta – membrana nuclear. Escala: A-J = 10 μ m; K e M = 2 μ m; L = 1 μ m; N = 5 μ m.

considerada e do tempo de espraio. Foi comum a observação de fagócitos cujo citoplasma continha outros tipos de celomócitos (Fig. 3F). Células fixadas e não coradas têm um núcleo grande e avermelhado. O citoplasma também é avermelhado, espraio e apresenta muitos vacúolos, o que lhe confere uma aparência reticulada.

Preparações coradas (Fig. 3H-J): Núcleo grande ($6,5 \pm 0,61 \mu\text{m}$), pouco condensado, com posição bastante variável (central, subcentral ou periférico) e afinidade média ao azul de toluidina e hematoxilina e eosina, mas baixa ao tricromo de Mallory (Fig. 3H-J). Algumas vezes é possível ver um nucléolo (Fig. 3I). O citoplasma é espalhado, mas de formato variável, bastante vacuolizado em algumas células (Fig. 3H) e não apresenta afinidade a nenhum dos corantes utilizados.

Microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 3K-N): Célula geralmente arredondada ou oval, com núcleo grande, geralmente subcentral ou periférico (Fig. 3K, M-N), apresentando muita cromatina periférica. Algumas vezes é possível observar um cristal intranuclear (Fig. 3M) e um nucléolo (Fig. 3N). O citoplasma pode ser bem espalhado e vacuolizado (Fig. 3M), conter material desconhecido proveniente de atividade fagocítica (Fig. 3K e L) ou até mesmo outros celomócitos (Fig. 3N). Muitas mitocôndrias também foram observadas.

Células progenitoras

Células vivas (Fig. 4A) e preparações não coradas (Fig. 4B): Células arredondadas ou ovais, muito pequenas ($5,8-7,6 \mu\text{m}$), sendo geralmente confundidas com detritos. Quando visualizado em contraste de fase, o núcleo, que é dificilmente visível, ocupa a parte central da célula e comumente tem cor esverdeada ou amarelo-esverdeada. O citoplasma é tênue e apresenta-se refringente, com cor amarelada ou esverdeada. Não foram observados movimentos para este celomócito. Células fixadas e não coradas têm um núcleo grande, central e avermelhado, e o citoplasma resume-se a uma fina camada margeando o núcleo (Fig. 4B).

Preparações coradas (Fig. 4C-E): Núcleo grande ($5,7 \pm 1,14 \mu\text{m}$), pouco condensado e central, com afinidade média ao azul de toluidina e hematoxilina e eosina e baixa ao tricromo de Mallory (Fig. 4E). O citoplasma é pequeno, com diâmetro de $9,0 \pm 1,9 \mu\text{m}$ e limita-se a uma estreita faixa adjacente ao núcleo. Esta célula apresenta uma alta razão núcleo/citoplasma ($0,64 \pm 0,09$).

Figura 4 – Célula progenitora. (A) Célula viva em contraste de fase; (B) Célula fixada e não corada; (C-E) Célula corada com Azul de Toluidina, Hematoxilina e Eosina e Tricromo de Mallory respectivamente; (F) Microscopia Eletrônica de Transmissão Legenda: M - mitocôndria; N = núcleo, RER – retículo endoplasmático rugoso, Seta – membrana nuclear. Escala: A-E = 10 μ m; F = 1 μ m.

Microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 4F): Formato geralmente redondo, mas pode ser oval. O núcleo é central e bastante grande em comparação com a célula (Fig 4F), com muita cromatina periférica condensada e geralmente com a membrana nuclear bem evidente. O citoplasma é pequeno e foi possível observar algumas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso.

Esferulócitos

Esferulócito vermelho

Células vivas (Fig. 5A) e preparações não coradas (Fig. 5B): As células vivas têm formato esférico a oval, com um diâmetro de $11,58 \pm 2,77 \mu\text{m}$. O núcleo, quando visível, é arredondado e frequentemente excêntrico, possuindo $3,1\text{-}3,8 \mu\text{m}$ de diâmetro. O citoplasma é preenchido com esférulas de $1,54 \pm 0,55 \mu\text{m}$, cujo conteúdo é um pigmento vermelho denominado Equinocromo-A (Fig. 5A). Quando essas células são tratadas sem solução anticoagulante apresentam um formato alongado com movimentos amebóides bastante pronunciados. Células fixadas e não coradas têm um núcleo periférico e avermelhado e o citoplasma é marrom e desorganizado, com aspecto achatado (Fig. 5B).

Microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 5A-D): As células têm formato oval, com um núcleo grande e periférico (Fig. 5A-C). A cromatina é condensada, distribuída em aglomerados e algumas vezes foi possível ver um nucléolo. Em algumas células, o citoplasma mostrou vacúolos aparentemente vazios, enquanto outros estavam preenchidos com uma grande quantidade de esférulas de tamanhos diferentes e com um conteúdo bastante elétron-denso (Fig. 5A-C). Uma grande quantidade de mitocôndrias (Fig. 5C, D), um Complexo de Golgi bem desenvolvido e pseudópodes (Fig. 5A, B) puderam ser observados. Uma possível sequência de maturação, com os estágios inicial, intermediário e final correspondendo aos das preparações citoquímicas, foi também observada (Fig. 5A-C).

Preparações coradas: Estágio inicial (Fig. 6A, G e M): Núcleo geralmente central, condensado, com uma alta afinidade ao azul de toluidina e com um diâmetro de $5,0 \pm 0,43 \mu\text{m}$. Ele não cora com os demais corantes, contudo apresenta uma coloração avermelhada, provavelmente devido à presença do Equinocromo-A. O citoplasma é bastante espreado, cuja aparência reticulada é bem característica. Estágio intermediário (Fig. 6B-E; H-K e N-Q): Núcleo levemente condensado, excêntrico (sendo periférico em alguns casos), com um pequeno nucléolo (Fig. 6E), apresentando forte afinidade ao azul de toluidina e medindo $3,9 \pm 0,43 \mu\text{m}$ de diâmetro. O citoplasma é disperso e a aparência reticulada inicial diminui durante a maturação, à medida que ocorre um aumento nas esférulas, que coram somente com azul de toluidina. Estágio final (Fig. 6F,

L e R): núcleo pequeno e periférico ($2.8 \pm 0.39 \mu\text{m}$), com menor afinidade ao azul de toluidina que o citoplasma circundante e levemente eosinofílico/acidofílico com os demais corantes. Citoplasma com muitas esférulas, que mostram alta afinidade ao azul de toluidina, mas pouca para os outros corantes.

Figura 5 – Esferulócito vermelho. (A) Célula viva em contraste de fase; (B) Célula fixada e não corada; (C-F) microscopia eletrônica de transmissão. (C) Estágio inicial; (D) Estágio intermediário; (E) Estágio final; (F) Detalhe da célula no estágio final. Legenda: M - mitocôndria; N - núcleo; V - vacúolo vazio; VI - vacúolo inicial, VF - vacúolo final; Setas - vacúolo cheio; Asterisco – pseudópodes. Escalas: A e B = 10 μm ; C e D = 2 μm ; E = 1 μm ; F = 0,5 μm .

Figura 6 – Esferulócito vermelho corado em diferentes estágios do processo de maturação. (A, G e M). Estágio inicial; (B-E, H-K e N-Q) Estágio intermediário; (F, L e R) Estágio final. (A-F) Azul de Toluidina; (G-L) Hematoxilina e Eosina; (M-R) Tricromo de Mallory. Escala = 10 μ m.

Esferulócito transparente

Células vivas (Fig. 7A) e preparações não coradas (Fig. 7B): Esta célula é muito semelhante ao esferulócito anterior, possuindo uma forma esférica a oval, com aproximadamente $12,36 \pm 1,1$ μ m de diâmetro. O núcleo é redondo, freqüentemente excêntrico e mede entre 3.2-3.8 μ m. O citoplasma é levemente achatado e preenchido por esférulas hialinas medindo $2,22 \pm 0,31$ μ m de diâmetro (Fig. 7A), cujo conteúdo é desconhecido. A morfologia também é bastante similar à do esferulócito vermelho, pois quando são tratadas sem solução anticoagulante, apresentam movimentos amebóides e forma alongada. Células fixadas e não coradas têm um núcleo avermelhado e periférico e o citoplasma é organizado com uma coloração esverdeada (Fig. 7B).

Microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 7A-D): Célula com formato arredondado, cujo núcleo é pequeno e periférico (Fig. 7A), similarmente ao encontrado nas preparações coradas (Fig. 7L). O citoplasma apresenta uma grande quantidade de vacúolos, preenchidos com um material centralizado e elétron-denso (Fig. 7C e D). Foi possível observar poucas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e um grande complexo de Golgi (Fig. 7B-D). Além das organelas citadas, também foi observado uma possível seqüência de maturação vesicular próximo ao Complexo de Golgi, onde um núcleo vesicular central é formado e torna-se mais elétron-denso (Fig. 7D).

Figura 7 – Esferulócito transparente. (A) Célula viva; (B) Célula fixada e não corada; (C-F) microscopia eletrônica de transmissão. (C) Visão geral da célula mostrando o núcleo periférico; (D) Esférulas em detalhe; (E) Complexo de Golgi; (F) Diferentes estágios de maturação das vesículas próximas ao Complexo de Golgi. Legenda: **G** - Complexo de Golgi; **M** - Mitocôndria; **N** - Núcleo; **RER** – Retículo Endoplasmático Rugoso; 1-3 Maturação das vesículas (esférulas) Escala: A e B = 10 μ m; C = 2 μ m; D-F = 0,5 μ m.

Células coradas: Estágio inicial (Fig. 8A, E e I): núcleo excêntrico, pouco condensado, medindo $4,5 \pm 0,46 \mu\text{m}$ de diâmetro e com alta afinidade ao azul de toluidina e a Hematoxilina. O citoplasma é disperso, não apresenta uma delimitação clara. É muito reticulado, com retículos maiores que os do esferulócito vermelho no mesmo estágio, e não apresenta afinidade a nenhum dos corantes utilizados. Estágio intermediário (Fig. 8B-C; F-G e J-K): Núcleo menor que o do estágio anterior ($4,0 \pm 0,54 \mu\text{m}$), periférico e pouco condensado, com nucléolo algumas vezes visível e também sem afinidade ao tricromo de Mallory. O citoplasma é disperso homogeneamente, mas perde esta característica ao longo do processo de maturação, tornando-se visivelmente mais compacto e esferuloso. Mostra afinidade ao azul de metila presente no tricromo de Mallory e à hematoxilina e eosina. Estágio final (Fig. 8D, H e L): Núcleo pequeno, condensado e geralmente centralizado, medindo $2,6 \pm 0,27 \mu\text{m}$ de diâmetro. Citoplasma bastante organizado, mostrando esférulas bem desenvolvidas e com a mesma afinidade que o estágio anterior, mas com um núcleo central mais escuro (Fig. 8L).

Figura 8 - Esferulócito transparente corado em diferentes estágios do processo de maturação. (A, E e I) Estágio inicial; (B-C, F-G e J-K) Estágio intermediário; (D, H e L) Estágio final. (A-D) Azul de Toluidina; (E-H) Hematoxilina e Eosina; (I-L) Tricromo de Mallory. Escala = $10 \mu\text{m}$.

Esferulócito granular

Células vivas (Fig. 9A) e preparações não coradas (Fig. 9B): Poucas células deste tipo de esferulócito foram detectadas neste tipo de preparação. Apresentam uma forma arredondada, de aproximadamente 12,2 μm de diâmetro. O núcleo é arredondado, periférico e tem entre 3,4-4,0 μm . O citoplasma é preenchido por grandes esférulas (1,54 $\pm$ 0,55 μm) de conteúdo amarronzado cuja natureza é desconhecida (Fig. 9A). Para este esferulócito não foram observados movimentos amebóides. Células não coradas mostram um núcleo grande, avermelhado e periférico. O citoplasma é preenchido com esférulas esverdeadas bem delimitadas (Fig. 9B).

Microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 9A-E): Células ovais ou arredondadas, com um núcleo grande e de formato regular, situado na periferia pelo menos nos estágios intermediário e final (Fig. 9E-G). A cromatina é condensada, distribuída em aglomerados e a observação de um nucléolo não é incomum, algumas vezes possuindo uma estrutura elétron-densa (Fig. 9F). O citoplasma é preenchido com esférulas possuindo um conteúdo bastante elétron-denso cujo diâmetro aumenta ao longo do processo de maturação, provavelmente por fusão vesicular (Fig. 9C-G). Um grande número de mitocôndrias, polirribossomos ou ribossomos livres, e retículo endoplasmático rugoso foram observados. Também foi possível detectar uma possível sequência de maturação, similar a observada em preparações citoquímicas e dividida em estágio inicial (Fig. 9C e D), intermediário (Fig. 9E e F) e final (Fig. 9G).

Células coradas: Estágio inicial (Fig. 10A, D e G): O núcleo é grande (6,4 $\pm$ 0,58 μm), arredondado, centralizado, pouco condensado e apresenta uma leve afinidade ao azul de toluidina e a hematoxilina e eosina. O citoplasma é compacto, claramente delimitado e tem uma aparência homogênea. Não tem afinidade ao azul de toluidina, mostrando apenas uma coloração amarelo-acinzentada, mas cora levemente com hematoxilina e eosina e com a fucsina ácida do tricromo de Mallory. *Estágio intermediário* (Fig. 10B, E e H): o diâmetro do núcleo é menor que o do estágio anterior (5,4 $\pm$ 0,6 μm). Geralmente está localizado na periferia e possui afinidade intermediária ao azul de toluidina (Fig. 10B) e leve com os demais corantes. O citoplasma mostra o início da formação das esférulas e tem afinidade a fucsina ácida do tricromo de Mallory e a hematoxilina e eosina, mas não ao azul de toluidina. *Estágio final* (Fig. 10C, F e I): núcleo sempre periférico e mais condensado, medindo 5 $\pm$ 0,38 μm de diâmetro. O citoplasma é

organizado, apresentando esférulas individualizadas bem desenvolvidas e de conteúdo desconhecido, com alta afinidade a fucsina ácida do tricromo de Mallory.

Figura 9 - Esferulócito granular. (A) Célula viva; (B) Célula fixada e não corada; (C-G) microscopia eletrônica de transmissão. (A e B) Estágio inicial; (C e D) Estágio intermediário; (E) Estágio final. Legenda: N - núcleo; P - poliribossomos; RER – retículo endoplasmático rugoso; V – vacúolo vazio. Escala: A e B = 10 µm; C e E-F = 2 µm; D = 0,5 µm.

Figura 10 - Esferulócito granular corado em diferentes estágios do processo de maturação. (A, D e G) Estágio inicial; (B, E e H) Estágio intermediário; (C, F e I) Estágio final. (A-C) Azul de Toluidina; (D-F) Hematoxilina e Eosina; (G-I) Tricromo de Mallory. Escala = 10 μ m.

Esferulócito irregular

Células vivas (Fig. 11A e B) e preparações não coradas (Fig. 11C): Este esferulócito não foi muito abundante nas preparações. Células vivas são geralmente arredondadas, mas de estrutura bastante irregular (Fig. 11A e B). O núcleo é grande, amarronzado e subcentral (Fig. 11B) e o citoplasma mede $18,6 \pm 2,6 \mu$ m, com esférulas evidentes, possuindo coloração verde-amarronzada e medindo $1,5-2,7 \mu$ m. Em preparações não coradas, mostram um núcleo avermelhado subcentral a periférico, que possui um cristal alongado em seu interior. O citoplasma não possui uma delimitação clara e é composto por um aglomerado de esférulas de tamanhos variados, mas bem estruturadas, com coloração amarronzada ou cinza-esverdeada (Fig. 2C).

Figura 11 - Esferulócito irregular. (A) Célula viva; (B) Célula viva em contraste de fase, evidenciado o núcleo; (C) Célula fixada e não corada; (D-F) Célula corada com Azul de Toluidina, Hematoxilina e Eosina e Tricromo de Mallory respectivamente; (G) Microscopia eletrônica de transmissão. Legenda: N - núcleo; V1 - esférula tipo I; V2 - esférula tipo II. Escala: A-F = 10 µm; G = 1 µm.

Células coradas (Fig 11D-F): Núcleo grande ($4,7 \pm 0,8 \mu\text{m}$), pouco condensado e subcentral a periférico. Algumas vezes não é visível. Tem afinidade média ao azul de toluidina e a hematoxilina e eosina e alta à fucsina ácida do tricromo de Mallory. Um

cristal alongado (1,24 - 3,53 μm) esteve geralmente presente dentro do núcleo, apresentando uma coloração amarelo-esverdeada com azul de toluidina, amarronzada com hematoxilina e eosina e rósea com tricromo de Mallory (Fig 11D-F). Este cristal pode ocupar 30-70% do diâmetro nuclear. O citoplasma é composto por esférulas de tamanhos diferentes, com afinidade variável ao azul de toluidina e tricromo de Mallory. Em contrapartida, o citoplasma parece não ter afinidade a hematoxilina e eosina (Fig. 11E), apresentando coloração similar as das células não coradas (Fig. 11C e E).

Microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 11G): Célula com formato geralmente redondo, mas pode ser oval. O núcleo é grande, periférico e a cromatina parece ser homogênea (Fig 11F). O citoplasma é preenchido por muitas esférulas que aparentemente são de dois tipos. O tipo I (V1) é preenchida por um material elétron-denso e homogêneo. Já o tipo II (V2) tem regiões similares a anterior e regiões mais elétron-densas. Não foi observada nenhuma organela neste celomócito.

Célula vibrátil

Células vivas (Fig. 12A): Célula esférica, medindo $7,7 \pm 0,39 \mu\text{m}$ de diâmetro. O núcleo foi raramente observado, mas o citoplasma é preenchido por muitas esférulas opalescentes que medem por volta de $1 \mu\text{m}$ de diâmetro. Este celomócito tem um flagelo longo e fino, que varia entre 22.6 e 34.6 μm . A célula vibrátil nada ativamente por meio do batimento do flagelo que são muito sensíveis a fixação e perdidos facilmente durante a manipulação do fluido celômico.

Células coradas: (Fig. 12B-F): O núcleo é geralmente central a subcentral, pouco condensado, medindo $4.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$ e com baixa afinidade à hematoxilina e eosina e a fucsina ácida presente no tricromo de Mallory. O citoplasma apresentou um aspecto reticulado, com diâmetro médio de $10.85 \pm 1.9 \mu\text{m}$, sem afinidade à hematoxilina e eosina e com baixa afinidade ao azul de metila presente no tricromo (Fig. 12B-C). Com o azul de toluidina, foi possível observar três estágios de maturação, diretamente relacionados com o nível de preenchimento do citoplasma (Fig. 12E-F). Baixo preenchimento (Fig. 12D): Núcleo central, com alta afinidade ao corante, medindo 4,23

Figura 12 – Célula vibrátil. (A) Célula viva; (B-F) Célula corada com Hematoxilina e Eosina, Tricromo de Mallory e Azul de Toluidina, respectivamente (G-O) Microscopia eletrônica de transmissão. (G-I) Célula inteira evidenciando o núcleo; (J-L) Esférulas em detalhe; (M e N) Flagelo em vista transversal e longitudinal respectivamente; (O) Região de inserção do flagelo. Legenda: **EED** - esfera elétron-densa; **F** - flagelo; **M** - mitocôndria; **N** - núcleo; **NG** - núcleo granular; **NGF** - núcleo granular em formação; **NL** - núcleo lobado; **V** - vacúolo. Escala: A-F = 10 μ m G e H = 2 μ m; I e J = 1 μ m; K, L, N e O = 0.5 μ m; M = 0.2 μ m.

$\pm 0,51 \mu\text{m}$. O citoplasma apresenta uma leve metacromasia, mostrando um aspecto homogêneo, coloração arroxeada uniforme, diâmetro de $11,7 \pm 1,4 \mu\text{m}$ e a $R_{N/C}$ foi de 0,35. Médio preenchimento (Fig. 12E): Núcleo similar ao estágio anterior, mas com um diâmetro maior ($4,5 \pm 0,7 \mu\text{m}$). O citoplasma apresenta metacromasia mais intensa que no estágio anterior, com pontos de alta afinidade, diâmetro médio de $11,2 \pm 2,1 \mu\text{m}$ e $R_{N/C}$ de 0,4. Alto preenchimento (Fig. 12F): Núcleo com $4,74 \pm 0,8 \mu\text{m}$ de diâmetro e centralizado. O citoplasma tem o menor diâmetro ($9,5 \pm 1,5 \mu\text{m}$) e mostra o maior nível de metacromasia, apresentando uma coloração roxa escura e homogênea. Neste estágio, a Razão núcleo/citoplasma foi a mais alta (0,5).

Microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 12G-O): Célula frequentemente esférica, mas pode ser oval, com núcleo central e de formato irregular. A cromatina fica dispersa ao longo da membrana nuclear e foi possível observar um núcleo lobado (Fig. 12G-I). No entanto, um nucléolo não foi visto. O citoplasma contém esférulas de tamanho similar, sendo cada uma preenchida por um material filamentososo e irregular (Fig. 12G-J). Contudo, algumas esférulas apresentam uma região esférica na sua periferia, de elétrons-densidade diferente e cujo interior contém uma área extremamente elétrons-densa (Fig. 12K). Esta área parece ser formada através da condensação de partes da esférula (Fig. 12L). O flagelo, com a organização usual de microtúbulos nestas estruturas (9+2), pôde ser visto (Fig. 12M), além do corpo basal (Fig. 12O).

DISCUSSÃO

Desde o clássico trabalho de Metchnikoff (1893) sobre fagocitose, muitos estudos foram realizados na tentativa de identificar e descrever os celomócitos em Echinodermata (*e.g.* Kindred, 1921; 1924; Boolotian e Geise, 1958; Endean, 1966; Smith, 1981; Smith *et al.*, 2010). No entanto, somente células vivas em suspensão ou microscopia eletrônica de transmissão têm sido comumente utilizadas, enquanto que abordagens citoquímicas são muito raras. Estudos utilizando células fixadas e não coradas nunca foram feitos até o momento, e nossas observações utilizando este procedimento mostram que os diferentes tipos de celomócitos encontrados possuem uma morfologia nuclear e citoplasmática muito peculiar, podendo de fato ser identificados por esse método.

A abordagem citoquímica, através da utilização de citocentrifugado, permitiu a aquisição de dados relevantes sobre celomócitos novos ou poucos conhecidos (*viz.* esferulócito granular, célula progenitora). Além disso, possibilitou o conhecimento de aspectos do desenvolvimento de algumas subpopulações (estágios de maturação). De maneira geral, foi difícil estabelecer comparações com trabalhos anteriores, devido à ampla variação nas técnicas utilizadas. O que foi dito por Johnson (1969b) para os esferulócitos, “*fixatives have a profound effect on both staining and cytochemical reactions of the spherule cells*”, também é válido para a maioria dos celomócitos. Contudo, apesar destes problemas metodológicos, para os diversos tipos celulares observado, a morfologia do núcleo e do citoplasma foram estáveis e bastante similares às descritas para outras espécies (Liebman, 1950; Holland *et al.*, 1965; Johnson, 1969b). São, portanto, caracteres úteis para a identificação dos celomócitos.

Caracterização dos celomócitos de *Eucidaris tribuloides*

As características gerais dos fagócitos, da célula progenitora, dos esferulócitos vermelho e transparente e da célula vibrátil, observados em *E. tribuloides*, estão de acordo com as descritas para outros equinóides em trabalhos anteriores (Kindred 1924; Liebman, 1950; Johnson, 1969a; Bertheussen e Seljelid, 1978; Edds, 1993; Gross *et al.*, 2000; Matranga *et al.*, 2000; Brockton *et al.*, 2008; McCaughey e Bodnar, 2012). Os fagócitos apresentaram as mesmas características nucleares e citoplasmáticas encontradas em *Arbacia punctulata*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *S. franciscanus*, *S. droebachiensis*, tanto em preparações coradas (Liebman, 1950; Holland *et al.*, 1965; Johnson, 1969b) como em microscopia eletrônica de transmissão (Chien *et al.*, 1970; Vethamany e Fung 1972; Hatfield e Travis, 1975a). Apesar da boa correspondência com a bibliografia, a observação das subpopulações de fagócitos (célula discoidal, poligonal e fagócitos pequenos) só foi possível por meio da utilização de suspensão de células vivas (*cf.* Fig. 2C-E), uma vez que elas só são diferenciáveis após espraimento. Atualmente, estas subcategorias têm sido bastante estudadas por técnicas tais como microscopia de fluorescência e confocal (Edds, 1993; Gross *et al.*, 2000; Brockton *et al.*, 2008), que tem revelado padrões diferenciados na organização dos filamentos de actina para a célula discoidal e poligonal (Edds, 1993). Já o fagócito pequeno apresenta alta atividade dos genes Sp064 e 185/333, cuja expressão é induzida após exposição à lipopolisacarídeos (Gross *et al.*, 2000; Brockton *et al.*, 2008; Smith, 2012; Majeske *et al.*, 2013).

O termo “célula progenitora” é aqui empregado seguindo a caracterização adotada por Smith (1981). A morfologia deste celomócito foi bastante uniforme, cujo núcleo grande, central e geralmente arredondado foi sempre evidente, cercado por uma tênue porção de citoplasma (*cf.* Fig. 4B-E). Nos estudos citoquímicos realizados até o momento (Liebman, 1950; Holland *et al.*, 1965; Johnson, 1969b), não existe referência a células com tal morfologia. Em contrapartida, vários estudos com MEV têm mostrado células com as características citadas, embora recebendo outras identificações. Este celomócito, geralmente denominado de linfócito, foi visto nos ouriços *S. droebachiensis*, *Sphaerechinus granularis*, *Paracentrotus lividus*, *Echinus esculentus* (Fabre *et al.*, 1969; Vethamany e Fung 1972; Smith, 1981) e nas holotúrias *Apostichopus japonicus*, *Cucumaria japonica* e *C. miniata* (Fontaine e Lambert, 1977; Eliseikina e Magarlamov, 2002).

O esferulócito vermelho de *E. tribuloides* apresentou o mesmo aspecto achatado descrito para tal célula em *Arbacia punctata* (Liebman, 1950) e a coloração foi similar à encontrada para os esferulócito “Tipo I”, presente em duas espécies do gênero *Strongylocentrotus* (Johnson, 1969b). No nível ultra-estrutural, as mesmas características são descritas para *S. purpuratus*. Contudo, nesta espécie o núcleo é subcentral, com cromatina pouco condensada e o conteúdo das esférulas não foi visível, com poucas apresentando um material grosseiro ou até mesmo um cristal (Hatfield e Travis, 1975b). O esferulócito transparente foi similar ao de *A. punctata* quando corado com tricromo de Mallory (Liebman, 1950) e sua morfologia foi bastante similar ao esferulócito “Tipo II” encontrado nas espécies de *Strongylocentrotus* (Johnson, 1969b). Por outro lado, as análises de microscopia eletrônica de varredura mostraram diferenças entre este celomócito e o encontrado nos equinóides *S. droebachiensis* e *S. purpuratus* (Vethamany e Fung 1972; Hatfield e Travis, 1975b, respectivamente).

Os esferulócitos aqui denominados como granular e irregular são muito diferentes dos tipos comumente descritos para Echinoidea. No primeiro, as esférulas são bem delimitadas e o núcleo foi sempre visível (*cf.* Fig. 9A). Esta célula tem morfologia nuclear e citoplasmática similar ao “*green spherulocyte*” de *A. punctata* (Liebman, 1950). Contudo, células cujas esférulas contivessem material de coloração natural verde-limão, como descrito para *A. punctata*, não foram observadas em *E. tribuloides*. Nesta última espécie, a célula que mais se aproxima das características descritas para o esferulócito verde de *A. punctata* é o esferulócito irregular. As reações citoquímicas foram muito singulares para o esferulócito granular. As esférulas não coraram com azul

de toluidina, mostrando apenas uma coloração amarelada/acinzentada, mas mostraram afinidade aos outros corantes. Nos poucos estudos com este tipo de abordagem (Liebman, 1950; Holland *et al.*, 1965; Johnson, 1969b), não existe referência a células com estas características. No nível ultra-estrutural, existe relato de um celomócito, descrito para *S. droebachiensis* e nomeado de *granulocyte* (Vethamany e Fung, 1972), que é similar ao estágio final do esferulócito granular de *E. tribuloides*. Contudo, diferente do que foi observado para *S. droebachiensis*, por meio de MET, este tipo celular não é tão raro como dito pelos autores e foi frequentemente detectada em preparações citoquímicas e MET de *E. tribuloides*. É possível que o granulócito descrito para *S. droebachiensis* represente somente o estágio final, com pequenas inclusões citoplasmáticas (*grânulos. cf.* Fig. 9C) e os estágios intermediários não foram incluídos.

No esferulócito irregular, as esférulas são pouco organizadas, o que lhe confere tal aparência, e o núcleo nem sempre é visível. Apesar da coloração natural esverdeada, esta célula pouco se assemelha ao “*green spherulocyte*” de *A. punctata*, e tem morfologia similar a um dos esferulócitos encontrados na holotúria *Cucumaria normani* (Smith, 1981). As reações aos corantes também foram muito singulares neste celomócito, cujo núcleo e citoplasma apresentaram afinidade somente ao azul de toluidina e ao tricromo de Mallory. O esferulócito verde de *A. punctata* também exibiu afinidade ao tricromo de Mallory, contudo, o núcleo e as esférulas citoplasmáticas apresentaram uma coloração vermelho-alaranja, completamente diferente do núcleo arroxeado e das esférulas verde-amaronzadas observadas no esferulócito irregular de *E. tribuloides*. Também foi marcante neste esferulócito, a presença bastante freqüente de um cristalóide intranuclear. Embora estruturas similares já tenham sido encontradas em outros equinóides (Karasaki, 1965; Borges *et al.*, 2010) sabe-se pouco sobre sua origem ou o papel fisiológico (Karasaki, 1965). Tem sido proposto que sua função envolveria a remoção de metais pesados, síntese de uréia (Bachmann e Goldschmid, 1978) ou transporte de íons de ferro (Karasaki 1965). Apesar do pouco entendimento desta estrutura, é possível correlacionar o aumento da sua freqüência com poluição ambiental (Borges *et al.*, 2010). No nível ultra-estrutural, o esferulócito irregular de *E. tribuloides* se aproxima da caracterização feita por Chien *et al.* (1970) para o “*second unidentified type*” encontrado em *Strongylocentrotus franciscanus*. Pode-se especular se o que foi identificado aqui como esferulócito irregular, poderia na verdade se tratar de um resto celular ou de outro esferulócito degranulando. Com base na constância em que foi encontrado nas preparações de citocentrifugado, no quase sempre presente cristalóide

intranuclear e na correspondência entre as características observadas em MET, citocentrifugados e células vivas, acreditamos que se trata realmente de um tipo celular distinto e não de um artefato nas preparações.

A morfologia da célula vibrátil, quando corada com azul de toluidina, foi muito similar a de outros ouriços, tais como *A. punctata*, *S. purpuratus*, *S. franciscanus*, e *S. droebachiensis* (Liebman, 1950; Holland *et al.*, 1965; Johnson, 1969b; Vethamany e Fung, 1972). A maioria destes estudos também indicou a presença de polissacarídeos complexos nas esférulas citoplasmáticas desta célula, através do uso de diversos corantes, assim como mostrado aqui pela metacromasia com azul de toluidina. Apesar de não ter descrito em detalhes, Holland *et al.* (1965) também conseguiu observar diferentes graus de afinidade do citoplasma ao azul de toluidina, que no presente trabalho parece estar correlacionado com o estágio de preenchimento/maturação da célula.

A ultra-estrutura, observada em microscopia eletrônica de transmissão, da célula vibrátil de *E. tribuloides* foi muito similar a de *S. franciscanus* e *S. droebachiensis* (Chien *et al.*, 1970; Vethamany e Fung, 1972). Devido ao flagelo não ser sempre observado com esta metodologia, as características primordiais para a identificação deste celomócito são: 1) um núcleo grande, irregular e centralizado, com cromatina condensada; 2) as grandes esférulas citoplasmáticas preenchidas com um fino material filamentososo onde algumas vezes é possível ver uma esfera periférica de elétrondensidade diferente da área anterior, cujo interior apresenta um material mais elétron-denso. Vethamany e Fung (1972) propõem que a formação desta área extremamente elétron-densa seria devido a uma possível desidratação gradual da região, culminando na formação deste “núcleo granular”. As duas características apresentadas acima, e presentes nos principais trabalhos sobre esta célula (Chien *et al.*, 1970; Vethamany e Fung, 1972), se mostraram muito confiáveis na identificação da célula vibrátil quando observada em MEV. Tendo isto em vista, é possível inferir que, possivelmente, houve um erro na identificação da célula vibrátil de *Echinus esculentus* (Smith, 1981), onde ela foi identificada como um esferulócito transparente.

Além das características citoquímicas e ultra-estruturais, os diâmetros nuclear e citoplasmático, assim como a Razão núcleo/citoplasma também forneceram bons dados, corroborando o processo de maturação. Mudanças no tamanho do núcleo, como visto nos esferulócitos, podem ser diretamente relacionadas com níveis de transcrição de RNA (Sato *et al.*, 1994; Schmidt e Schibler, 1995; Webster *et al.*, 2009) e isso pode se

encaixar na dinâmica destes celomócitos. As células no estágio inicial contêm esférulas de aparência vazia e um núcleo grande, indicando intensa produção de RNA, enquanto que o estágio final mostra esférulas cheias e um núcleo pequeno e condensado, mostrando uma diminuição neste processo. Um padrão similar foi visto nos hemócitos da holotúria *Eupentacta quiqueseimita*, que apresentavam o maior diâmetro nuclear em células muito imaturas, intermediário em células imaturas e o menor diâmetro em hemócitos maduros (Fontane e Hall, 1981). No caso do esferulócito granular, esta célula parece manter um tamanho nuclear relativamente grande, quando em comparação com o esferulócito vermelho e transparente. Este fato pode indicar que esta célula não reduz seu processo de transcrição e, portanto, teria um papel diferente dos outros esferulócitos (produção/liberação versus produção/armazenamento?).

Para a célula vibrátil, a Razão núcleo/citoplasma, somada com as características citoquímicas, mostrou-se muito útil para a delimitação dos estágios de maturação. Assim como visto em outros táxons (*e.g.* Bivalves ou Insetos), este parâmetro tem sido utilizado como caráter de identificação dos celomócitos (Allam *et al.*, 2002; Falleiros *et al.*, 2003). Ainda assim, não existem trabalhos com equinodermos que tenham utilizado morfometria para fins de identificação das células ou de seus estágios de desenvolvimento.

Origem e função das células celômicas em Echinodermata

Apesar das evidências experimentais ainda serem limitadas, duas principais tendências têm se estabelecido acerca da origem e formação dos celomócitos no filo Echinodermata (Smith, 1981; Chia e Xing, 1996; Matranga *et al.*, 2005; Ramírez-Gómez e García-Arrarás, 2010; Silva, 2013). A primeira hipótese, mais antiga, trata desta origem como sendo a partir da divisão celular dos próprios celomócitos (Kollmann, 1908; Fergusson, 1964) e alguns trabalhos apontam a existência de proliferação celular no líquido celomático de *S. purpuratus* (Holland *et al.*, 1965). Este estudo, utilizando timidina radioativa, indica que os fagócitos e os esferulócitos vermelhos e transparentes de *S. purpuratus* são capazes de sintetizar DNA. No entanto não existem trabalhos mostrando figuras mitóticas nas células celômicas de Echinodermata, e celomócitos com tal característica não foram observadas nas preparações de *E. tribuloides*.

A segunda considera a origem dos diversos tipos de células como sendo produto da atividade de um tecido ou órgão celomopoiético específico. Células com

características semelhantes à célula progenitora de *E. tribuloides* já foram encontradas em outros equinodermos (Fabre *et al.*, 1969; Vethamany e Fung 1972; Fontaine e Lambert, 1977; Smith, 1981; Eliseikina e Magarlamov, 2002). Para Crinoidea e Ophiuroidea, o corpo esponjoso e as glândulas axiais respectivamente, são os locais indicados como sendo produtores destas células (Cuénot, 1887; 1891). Em Asteroidea, o corpo de Tiedmann (Tiedemann, 1816; Cuénot, 1887) e o epitélio celômico (Vanden Bossche e Jangoux, 1976) seriam as prováveis fontes. Nos Holothuroidea, não existem evidências claras acerca dos locais de origem. A vesícula de Poli (Cuénot, 1891), o tecido conectivo das árvores respiratórias (Herouard, 1889; Endean, 1958) e o tecido conectivo do sistema hemal (Hetzl, 1965) são apontados como prováveis candidatos. Contudo, se a árvore respiratória é de fato o local de proliferação, não é o único, pois este órgão está ausente em alguns dos táxons dentro de Holothuroidea, tais como as ordens Apodida e Elasipodida (Hyman, 1955; Feral e Massin 1982).

Já nos Echinoidea, as células do peritônio (Geddes, 1880; Liebman, 1950; Holland *et al.*, 1965) e o tecido conectivo dérmico (Schinke, 1950) já foram apontados como fonte de celomócitos. No entanto, o órgão axial parece ser o principal candidato a esta função (Kollmann, 1908; Millot, 1969; Silva, 2013). Isso parece ter sido demonstrado em Asteroidea (*Asterias rubens*), cujo órgão axial pode ser estimulado por mitógenos, dando origem a celomócitos semelhantes à célula progenitora de *E. tribuloides* (Panijel *et al.*, 1977; Brillouet *et al.*, 1981). Portanto, o órgão axial conteria uma fração totipotente e as células progenitoras, pluripotentes, então se diferenciariam nos demais tipos encontrados no celoma.

Com relação ao papel exercido pelos celomócitos na manutenção da homeostase dos equinodermos, muitos trabalhos de revisão foram feitos e abordam esta questão de uma maneira generalizada (Endean, 1966; Smith, 1981; Ramírez-Gómez e García-Arrarás, 2010; Smith *et al.*, 2010). Uma compilação dos principais funções descritas para estas células pode ser vista na Tabela I. Apesar da relativa quantidade de revisões, a maior parte dos dados ainda se baseia em trabalhos de observação direta (*e.g.* coagulação atribuída à célula vibrátil; Bertheussen e Seljelid, 1978), com poucos estudos experimentais para verificar funções. Mesmo os trabalhos que o fazem, ainda esbarram nas dificuldades encontradas até o momento para o isolamento das subpopulações e manutenção de culturas viáveis dos celomócitos (Bertheussen e Seljelid, 1978; Chia e Xing, 1996; Arizza *et al.*, 2007). Assim, para se acessar qual a real função que cada celomócito realiza na fisiologia dos Echinodermata, ainda se faz

necessário primeiro identificar as subpopulações existentes e desenvolver técnicas para isolar estas células.

Tabela I - Sumário dos principais tipos de celomócitos registrados em Echinodermata e suas respectivas funções.

Tipo celular		Função	% no Líquido celomático				
Fagócito	Célula discoidal	Fagocitose, encapsulamento, opsonização, rejeição de	40-80 ¹	-	-	30 ⁴	80-95 ⁵
	Célula Poligonal	enxertos, quimiotaxia, atividade antibacterial,	-	67 ²	-		
	Fagócito pequeno	coagulação	-	-	80 ³		
Célula progenitora		Célula-tronco	-	-	-	60 ⁴	-
Esferulócito vermelho		Transporte de oxigênio, atividade antibacterial	7-40 ¹	8 ²	4.7 ³	-	-
Esferulócito transparente		Citotoxicidade, Coagulação, atividade antibacterial, inflamação, cicatrização de feridas, remodelamento da MEC,	3.7-25 ¹	6.5 ²	7.8 ³	5 ⁴	-
Célula vibrátil		Movimento do fluido celomático, coagulação	11.9-20 ¹	18.5 ²	7.5 ³	1 ⁴	-

Adaptado de Ramírez-Gómez e García-Arrarás, 2010 e Smith *et al.*, 2010. 1 - *Strongylocentrotus purpuratus*; 2 - *S. droebachiensis*; 3 - *Paracentrotus lividus*; 4 - *Holothuria glaberrima*; 5 - *Asterias rubens*.

CONCLUSÕES

Equinóides são descritos como apresentando somente três principais tipos de celomócitos: fagócitos, esferulócitos e a célula vibrátil (Smith, 1981; Chia e Xing, 1996; Smith *et al.*, 2010). Contudo, como pôde ser visto ao longo do texto e resumido abaixo (Tabela II), este número pode ser bem maior. Um exemplo deste fato é visto com os fagócitos, onde estudos recentes usando marcadores celulares e microscopia confocal tem mostrado a existência de no mínimo três subpopulações: fagócitos pequenos e

Tabela II – Quadro comparativo dos tipos celulares encontrados no líquido celomático de *Eucidaris tribuloides*. Legenda: AT – Azul de toluidina; HE – Hematoxilina e Eosina; TM – Tricrômio de Mallory

Tipo celular	Forma geral (célula viva)	Forma geral (Citocentrifugado)	Citoplasma (Citocentrifugado)	Núcleo (Citocentrifugado)
Fagócito	Fagócito Pequeno	Célula pequena, núcleo central e citoplasma com muitos filopódios (Fig. 3C)	Diffícil de serem diferenciadas por meio de citocentrifugado. Fagócitos em geral são células grandes, com citoplasma bastante espraído e núcleo bem evidente	Grande, com cromatina pouco condensada e de posição bastante variável. Algumas vezes é possível observar um nucléolo.
	Célula Discoidal	Célula pequena, arredondado ou oval com citoplasma espraído (Fig. 3D)		
	Célula poligonal	Célula pequena com citoplasma espraído e poligonal (quadrado ou retangular) (Fig. 3E)		
Célula progenitora		Célula muito pequena com formato esférico ou oval e um tênue citoplasma refringente (Fig. 4A).	Célula pequena, composta primordialmente de núcleo. Citoplasma é pouco visível	Muito pouco evidente e sem afinidade a nenhum dos corantes. Central, grande e com cromatina pouco condensada.
Esferulócitos	Vermelho	Formato arredondado ou amebóide, com esférulas citoplasmáticas avermelhadas (Fig. 5A).	Varia com o estágio, mas é arredondada, com núcleo geralmente periférico	Espraído e composto por esférulas cujo nível de preenchimento varia com o estágio de maturação e não coram com HE e TM. Geralmente periférico e diminui de tamanho ao longo da maturação
	Transparente	Formato arredondado ou amebóide, com esférulas citoplasmáticas transparentes (Fig. 7A).	Varia com o estágio, mas é arredondada, com núcleo geralmente periférico	Espraído mas com um forte aspecto tridimensional, devido às esférulas citoplasmáticas
	Granular	Formato arredondado com esférulas citoplasmáticas grandes e amarronzadas (Fig. 9A)	Varia com o estágio, mas é arredondada, com núcleo grande e geralmente periférico	Espraído nas fases iniciais e bastante esferuloso na fase final. Esférulas com afinidade ao HE e TM. Grande e pouco condensado. Central no estágio inicial e periférico nos demais.
	Irregular	Visivelmente irregular com esférulas citoplasmáticas esverdeadas/amarronzadas em microscopia de luz (Fig. 11A).	Célula bastante espraída cujo citoplasma é formado por um aglomerado de esférulas	Citoplasma bastante espraído, formado por um aglomerado de esférulas com afinidade somente ao AT e TM. Núcleo pequeno, geralmente periférico e possui um cristalóide intranuclear bastante evidente
Célula vibrátil		Célula arredondada, com muitas esférulas citoplasmáticas e com um flagelo evidente (Fig. 12A).	Célula bastante espraída, com núcleo geralmente centralizado.	Citoplasma com aspecto reticulado, somente com afinidade ao AT. Núcleo pequeno e geralmente centralizado.

células discoidais e poligonais (Edds, 1993; Henson *et al.*, 1992; 1999; 2003; Brockton *et al.*, 2008).

Em relação aos esferulócitos, somente duas subpopulações são atualmente aceitas, sendo diferenciadas, devido ao seu conteúdo citoplasmático contrastante. O esferulócito vermelho tem um pigmento avermelhado (Equinocromo-A) e o transparente tem um conteúdo hialino de composição desconhecida (Smith, 1981; Chia e Xing, 1996; Smith *et al.*, 2010). Por outro lado, existem alguns trabalhos utilizando MEV, que já registraram cinco tipos de células esferulosas (Chien *et al.*, 1970; Vethamany e Fung, 1972; Hatfield e Travis, 1975b). Ainda assim, o conhecimento sobre esta grande categoria celular é muito limitado, e o mesmo se aplica aos celomócitos como um todo. Um dos possíveis motivos da controvérsia entre células vivas e MET, parece residir no quase completo desconhecimento do conteúdo citoplasmático dos esferulócitos. Estudos com *Thyone briareus*, *Diadema antillarum* e *Holothuria forskali* (Millot, 1950; Jacobson e Millot 1953; Millot, 1953) perceberam que os coágulos formados após a retirada e exposição do líquido celomático ao ar, tornavam-se cada vez mais escuros com o passar do tempo. Este fato parece estar relacionado ao processo de oxidação ou redução do conteúdo dos esferóides (Jacobson e Millot, 1953), e neste mesmo estudo os autores sugerem que: “*the fact that the coelomic fluid when first withdrawn is usually leads us to suspect that the spheroids are largely, if not entirely, colorless in vivo, and a varying proportion developing their bright red color when freely exposed to air*”. Para o esferulócito vermelho, isto parece não se aplicar. Contudo, assim como já foi descoberto para os fagócitos, parece que o “esferulócito transparente”, representa de fato mais de uma subpopulação. Nós também sugerimos isso, uma vez que o esferulócito granular foi facilmente encontrado em citocentrifugados, mas foi detectado pouquíssimas vezes em preparações com células vivas, provavelmente pela semelhança com o transparente. É de extrema importância determinar quantos tipos de celomócitos existem no líquido celomático de Echinoidea, a fim de estabelecer possíveis processos de maturação e as reais funções exercidas por estas células. A falta de correspondência entre células vivas e preparações de microscopia eletrônica têm se mostrado como um grande obstáculo no reconhecimento de novos tipos celulares e no estudo de suas respectivas funções. Utilizando suspensão de células vivas, preparações citoquímicas e microscopia eletrônica de transmissão, fomos capazes de encontrar dois tipos novos (esferulócitos granular e irregular), um tipo

pouco abordado (a célula progenitora) e processos de maturação (esferulócitos e célula vibrátil). Portanto, este tipo de abordagem integrativa se mostra necessária para a caracterização dos diferentes tipos de celomócitos presentes na classe Echinoidea.

Capítulo II

Processo inflamatório no espinho de *Eucidaris tribuloides*

Lamarck, 1816

Resumo

O processo inflamatório pode ser caracterizado como a resposta imune mais precoce diante uma infecção, lesão, estresse ou mau funcionamento do tecido. Sabe-se muito sobre os processos e mecanismos teciduais e moleculares subjacentes a inflamação de vertebrados, contudo, o conhecimento da inflamação em invertebrados se restringe a estudos morfológico/estruturais. É possível observar que nem mesmo a definição comumente aplicada em trabalhos avançados sobre inflamação pode ser utilizada para o estudo dos mesmos processos em invertebrados. Em equinodermos, o conhecimento acerca do processo inflamatório é muito escasso, e o pouco que se sabe é referente à carapaça ou cavidade celomática. Estudos utilizando o espinho como modelo são inesistentes. Neste contexto, o objetivo deste capítulo é caracterizar o processo inflamatório natural no espinho primário de *Eucidaris tribuloides* (Lamarck, 1816) parasitado pelo gastrópode *Sabinella troglodytes* (Thiele, 1925). Para tal, foi feita uma abordagem estrutural utilizando histologia, microscopia eletrônica de varredura e microtomografia computadorizada além da análise da proporção dos tipos celulares na cavidade celomática e da expressão de dois marcadores ligados a processos inflamatórios: AIF e MAPK-p38. Com as análises histológicas, foi possível observar que o molusco modifica a estrutura orgânica do espinho, alterando a organização dos tecidos e dos celomócitos. O ouriço por sua vez, apresentou mecanismos específicos de defesa a presença do parasita por meio de uma resposta celular elaborada, com os dois tipos de esferulócitos tendo função diferentes no processo. A parte calcária também é afetada, uma vez que no espinho parasitado, foi possível observar alterações significativas em diversos locais, tais como a camada radial e a medula, e que não se limitaram somente a região do dano, sendo visíveis por todo o espinho. Já em relação à cavidade celomática, não foi possível observar efeito da presença do parasita, pois, tanto a proporção de celomócitos quanto a expressão dos marcadores AIF e MAPK-p38 não mostraram diferenças entre os grupos analisados. Assim, foi visível que em nível local, as respostas foram muito elaboradas. Já em nível sistêmico, não foi possível observar modificações. Isto parece indicar, que assim como visto em vertebrados, equinodermos são capazes de ter respostas locais, sem envolver todo o organismo.

Palavras-chave: Eulimidae, inflamação, parasitismo, resposta celular, alteração morfológica.

INTRODUÇÃO

A inflamação pode ser caracterizada como a resposta imune mais precoce diante uma infecção, lesão, estresse ou mau funcionamento tissular (Medzhitov, 2008; Ricciotti e FitzGerald, 2011). Este processo consiste numa cascata altamente regulada de processos imunológicos, fisiológicos e comportamentais, que são controlados por moléculas sinalizadoras denominadas de citocinas (Ashley *et al.*, 2012). Seu principal objetivo é neutralizar o agente causador e remover o tecido danificado, a fim de restaurar a homeostase (Soehnlein e Lindbon, 2010). Desta forma, a inflamação é vista como uma desordem complexa envolvendo componentes moleculares, celulares e teciduais, sendo uma ação inespecífica a um determinado dano (injúria, trauma, infecção parasitária, dentre outros) cujos agentes responsáveis podem ser químicos, físicos ou biológicos (Zhou *et. al.*, 2007; Medzhitov, 2008; Lima *et. al.*, 2009). Essa inespecificidade sugere que, possivelmente, a resposta inflamatória pode ter evoluído como um mecanismo generalizado para lidar com danos ou mau funcionamento tissular.

Nos vertebrados, a inflamação tem indícios macroscópicos (aumento de temperatura, inchaço, vermelhidão e dor) e em nível tecidual existe um aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, culminando na acumulação de fluido e recrutamento de leucócitos para a área lesada (Ottaviani *et al.*, 2010; Ashley *et al.*, 2012). Como definido por Elie Metchnikoff, nos invertebrados, o processo inflamatório é comparativamente mais simplificado (Metchnikoff, 1968a, 1968b). Tem-se visto que estes organismos apresentam sofisticadas respostas imunes humorais (Leclerc e Reichhart, 2004), sendo capazes de produzir diversos tipos de moléculas de defesa (Iwanaga e Lee, 2005). Contudo, o principal mecanismo de manutenção da homeostase, é a resposta imune celular, tendo dois mecanismos principais de ação: fagocitose e encapsulamento (Ratcliffe *et al.*, 1985; Rowle, 1996). O primeiro é realizado por células denominadas fagócitos, que são geralmente grandes e possuem movimento amebóide evidente (Rowle, 1996). O segundo consiste na degranulação, realizada por células granulosas, seguido pelo encistamento nos casos onde o agente causador não pode ser prontamente eliminado (Schmit e Ratcliffe, 1977).

Dentre os invertebrados, o filo Echinodermata agrupa organismos deuterostômios, essencialmente marinhos, que apresentam simetria pentarradial quando adultos (Pawson, 2007). Equinodermos também apresentam intrincados mecanismos de

imunidade humoral (Canicatti, 1990; 1991; Schillaci e Arizza, 2013), no entanto, a resposta celular é considerada a principal estratégia imunológica nestes animais (Gliński e Jarosz, 2000; Smith *et al.*, 2006). Existem estudos tratando dos seus tipos celulares (Smith, 1981; Chia e Xing, 1996; Smith *et al.*, 2006; 2010). Contudo, são poucos os trabalhos abordando inflamação ou respostas a agentes infecciosos nestes invertebrados. Dos poucos trabalhos existentes, grande parte se restringe a identificar ou descrever os aspectos biológicos do patógeno/parasita (Maes and Jangoux, 1984; Tajima *et al.*, 1997; 1998; Takeuchi *et al.*, 1999; Becker *et al.*, 2007). Somente um trabalho trata das respostas fisiológicas de equinodermos frente a infecções, utilizando o espinho como modelo (Johnson e Chapman, 1970a). Neste contexto, o objetivo deste capítulo é caracterizar o processo inflamatório no espinho primário de *Eucidaris tribuloides* (Lamarck, 1816) parasitado pelo gastrópode *Sabinella troglodytes* (Thiele, 1925). Estes gastrópodes pertencem à família Eulimidae, um táxon que compreende parasitas específicos de Echinodermata. Esta espécie em particular tem uma relação espécie-específica com *E. tribuloides*, com todo seu ciclo de vida associado aos espinhos do ouriço hospedeiro (Warén, 1983). Para detalhar esta relação, foi feita uma abordagem estrutural utilizando histologia, microscopia eletrônica de varredura e microtomografia computadorizada; e a análise da expressão de dois marcadores ligados a processos inflamatórios, AIF-1 e pp38-MAPK.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos organismos e do material analisado.

Ouriços cidaróides da espécie *Eucidaris tribuloides* foram coletados na Praia do Porto da Barra, Salvador-Bahia (13°00'15"S, 38°31'58"O), por meio de mergulho livre. O procedimento consistiu na verificação e captura de 15 indivíduos sadios e de 15 indivíduos parasitados pelo gastrópode *Sabinella troglodytes* (Fig. 1A e B). Os equinóides, juntamente com os parasitas, foram acondicionados individualmente em sacos plásticos e levados para o Laboratório de Invertebrados Marinhos (LABIMAR - UFBA). No laboratório, os organismos foram acondicionados em aquários e posteriormente checados para a quantidade de galhas (espinhos parasitados), e depois foram coletados o líquido celomático e os espinhos sadios e parasitados, com suas respectivas placas interbulacrais. Uma vez que todo espinho parasitado tinha uma

aspecto de espinho “jovem” (não continham simbiossitos aderidos à parte externa), só foram coletados espinhos sadios na mesma situação.

Coleta e contagem das células da cavidade celomática perivisceral

O líquido celomático de 10 indivíduos de cada grupo (sadio e parasitado) foi retirado e ajustado para 5×10^5 cel/ml, seguindo o procedimento descrito anteriormente (cf. Capítulo I). Após o ajuste, a estimativa de densidade dos tipos celulares presentes na cavidade celomática de *E. tribuloides* se deu através da contagem, em câmara de Neubauer, dos quatro tipos principais de celomócitos: fagócitos, célula vibrátil, esferulócito vermelho e transparente. Os resultados foram expressos como porcentagem dos tipos celulares.

Análise histológica e ultra-estrutural

Histologia: Os espinhos sadios e parasitados foram coletados e imediatamente fixados em glutaraldeído 2,5% diluído em água do mar filtrada (0,22 μ m), por no mínimo 24h. Posteriormente, foram descalcificados em EDTA 5% diluído em água do mar artificial livre de cálcio e magnésio (NaCl 460mM, Na₂SO₄ 7mM, KCl 10mM, HEPES 10mM, pH 8,2 - Dunham & Weissmann 1986. Filtrada em 0,22 μ m). O processo de descalcificação levou entre 72 e 96h. Feito isso, os espinhos foram desidratados em uma série crescente de etanol (50-100%) (30 min. em cada concentração) e clarificadas com Xilol + Etanol (1:1) (30 min.) e Xilol 100% (30 min., duas vezes). Em seguida, as amostras foram imersas para inclusão em Paraplast (SIGMA) fundido, por 12 horas em estufa a 60°C. Após a inclusão, os espinhos foram emblocados e mantidos a temperatura ambiente, sendo então montados nos suportes. Para a realização dos cortes, os espinhos foram divididos em três partes: ápice, meio e base. A partir do comprimento total do espinho, os sadios foram divididos em três partes iguais. Já os parasitados, a parte apical era sempre aquela acima do dano (galha), o meio era a parte da lesão, e a parte basal era aquela situada abaixo da galha. Os cortes foram realizados em micrótomo manual (10 μ m de espessura), sendo as fitas colocadas em lâminas contendo uma fina camada de albumina e então desparafinizadas com Xilol 100% (40 min., duas vezes). Em seguida, as seções foram hidratadas em uma série decrescente de etanol (100-50%) por 30 min. em cada concentração, e posteriormente coradas com Tricromo de Mallory ou Azul de Toluidina 0,1% (Martoja & Martoja 1967, Behmer et al. 1976).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): O material fixado em glutaraldeído 2,5% foi seco em temperatura ambiente. Os espinhos foram cortados em três partes, seguindo os mesmos critérios adotados para o procedimento histológico. Além dos espinhos em seção transversal, foram analisadas a parte basal, a placa interambulacral da carapaça e a articulação do tipo bola-e-soquete, que é composta pelo soquete (parte mais proximal do espinho) e pelo tubérculo (protuberância sobre a placa da carapaça). O material analisado foi montado em um suporte (*stub*) coberto com fita dupla face, e posteriormente metalizados com ouro. As fotografias foram obtidas a partir de um microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo DSM 940.

Microtomografia computadorizada (μ CT): Espinhos sadios, parasitados e placas interambulacrais foram escaneados por 1h (cada peça) numa resolução de 9 μ m em um microtomógrafo de raios-X (Skyscan 1176) com uma duração de exposição em cada nível durante a rotação 250 ms (360°, 438 μ A, 57 kV, bmp-files). O conjunto de dados obtidos foram reconstruídos em imagens tridimensionais pelo software NRecon da Skyscan. A densidade dos espinhos é mostrada em um gradiente de tons de cinza, onde baixas densidades aparecem em tons escuros e altas densidades aparecem em tons claros.

Caracterização quantitativa das estruturas do espinho

Contagem de celomócitos: Nos cortes histológicos, foram realizadas contagens do número de esferulócitos presentes em cada região (ápice, meio e base) do espinho sadio e parasitado. As contagens foram realizadas por meio de fotomicrografias dos cortes do espinho (objetiva de imersão, 100X). Foram amostradas as três porções de cada corte: medula, camada radial e periferia. Nos cortes do ápice do espinho (tanto o sadio quanto o parasitado), devido ao tamanho reduzido, somente medula e a periferia foram observadas. Os resultados são mostrados como número de células por unidade de área (cel/u.a), onde cada unidade de área é equivalente a área obtida em cada fotografia (40 μ m²).

Mensuração dos poros da medula e do córtex do espinho: A diâmetro dos poros da medula e da camada radial do espinho foi medido a partir das imagens de MEV usando o software ImageJ, seguindo Grossmann e Nebelsick (2013). Foram realizadas 20 medidas em cada região (ápice, meio e base) de espinhos sadios e parasitados. Devido à camada radial nos espinhos parasitados apresentar uma morfologia

diferenciada em MEV, esta região foi subdividida em camada radial interna e externa. Seguindo este padrão, o mesmo foi feito para espinhos sadios, a fim de se verificar diferença entre os grupos.

Análise da expressão de marcadores ligados a processos inflamatórios

Coleta das amostras: Dos 30 animais coletados (15 sadios e 15 parasitados), cinco indivíduos de cada grupo foram separados para coleta de material destinado a análise da expressão de marcadores ligados a processos inflamatórios: AIF-1 (*Allograft Inflammatory Factor-1*) e pp38-MAPK (*phosphorylated p-38 mitogen-activated protein kinase*). Dos organismos separados, foram retiradas amostras do intestino e do líquido celomático. O intestino foi imediatamente fixado com RNA holder (BioAgency). Já a suspensão de células, depois de retirada seguindo o protocolo descrito no Capítulo I, foi centrifugada (80 x g / 5 min), o sobrenadante retirado e os *pellets* ressuspensos com RNA holder. Após a coleta, o material foi resfriado (4°C - 24h) e depois congelado a -20°C, até o momento das análises.

Quantificação das proteínas totais: Fragmentos do intestino (0,5 cm³) e alíquotas do fluido celomático (1,5 ml) foram colocados em microtubos. Para o tecido, foram adicionados 600 µl do tampão de extração (TBS – Tris Buffered Saline + EDTA 1mM + coquetel inibidor de protease (Amresco)) em cada amostra. As alíquotas de celomócitos foram centrifugadas (80 x g / 5 min), o sobrenadante descartado e a mesma quantidade de TBS foi adicionada. As amostras foram maceradas com pistilos plásticos, centrifugadas (4°C, 80 x g / 10 min) e o sobrenadante coletado para a determinação da quantidade de proteínas totais, através do método de Bradford (Sigma-Aldrich).

Imunoensaio: Um volume de 100 µl do extrato das amostras, contendo 50 µg de proteínas totais, foi adicionado em cada poço de uma placa (96 poços), que foi mantida por 24h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com uma solução tampão de fosfato (PBS – *Phosphate buffered saline*), contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Em seguida foram bloqueadas com leite em pó desnatado 1% (Molico, Nestlé) em PBS-T por 24h a 4°C. Posteriormente, foram adicionados 100 µl do anticorpo primário específico AIF (cabra anti-AIF-1) ou pp-38 MAPK (coelho anti-pp38), diluídos na proporção de 1:500 em PBS-T com 0,1% de leite desnatado e as placas foram incubadas por 2:30h a 29°C. As placas foram novamente lavadas três vezes com PBS-T, receberam o anticorpo secundário específico, conjugados com peroxidase (HRP

anti coelho ou anti-cabra), e foram novamente incubadas por 2:30h a 29°C. As reações foram reveladas utilizando TBM (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Pierce) como substrato por 10 min, interrompidas com H₂SO₄ 2M e lidas num leitor de placas Elisa (450nm).

Análise estatística

Para verificar o efeito de diferentes fatores sobre o diâmetro do poro foi realizada uma ANOVA multifatorial com o auxílio do programa Statistica. Neste caso, os fatores considerados foram: (1) ocorrência ou não de parasitismo, (2) região do espinho (ápice, meio e base) e (3) parte analisada do espinho (externa, medula e interna). No caso de diferenças significativas, o HSD de Tukey foi utilizado como teste a posteriori. Procedimento similar foi utilizado para testar um efeito do parasitismo (1º fator) sobre o número de células/ml para distintos tipos celulares (2º fator). Em contrapartida, uma ANOVA simples (one way ANOVA) foi realizada para verificar se existia diferença entre os níveis de expressão das proteínas de estresse AIF e p38 MAPK entre indivíduos sadios e parasitados.

RESULTADOS

Espinhos parasitados possuem uma morfologia bastante diferenciada quando comparados com os sadios (Fig. 1A e B; Fig. 2A-F). Os espinhos sadios são retilíneos, cilíndricos, com ornamentação em forma de nódulos achatados (Fig. 1I) e coloração amarronzada/avermelhada quando novos (Fig. 2 B-D). Os espinhos mais velhos são um pouco mais irregulares e esta ornamentação e a coloração geralmente se tornam obscurecidas pela incrustação por outros organismos (Fig. 2A). Em contrapartida, o espinho parasitado tem formatos diferentes, variando de pequeno e achatado (Fig. 1F) a comprido, com um crescimento anormal ao redor do local parasitado (Fig. 1C; Fig. 2E e F). Em campo, através de uma rápida observação, é possível diferenciar um ouriço parasitado de um sadio, uma vez que as galhas são bem evidentes e os moluscos, que possuem uma coloração esbranquiçada, destoam muito da cor avermelhada/amarronzada do espinho (Fig. 1B-D). No entanto, em alguns espinhos, foi possível observar que o crescimento da região lesada foi tão desordenado que chegou a fechar quase que

Figura 1 – *Eucidaris tribuloides* e o parasita *Sabinella troglodytes*. (A e B) Foto de campo de *E. tribuloides* sadio e parasitado, respectivamente; (C-E) Fotos de laboratório de um espinho parasitado. (C) Dois moluscos na galha; (D) Marcas de alimentação; (E) Massas de ovos em diferentes estágios de desenvolvimento no interior da galha. (F-I) Espinhos sadios e parasitados em MEV. (F) Espinho parasitado em visão panorâmica; (G) Região do danificada do espinho, evidenciando uma marca de alimentação; (H) marca de alimentação, mostrando o colar em detalhe; (I) Espinho sadio em visão panorâmica. Escala: C = 1,8 mm; D e I = 1,5 mm; E e G = 500μm; F = 1 mm; H = 50 μm.

Figura 2 – Morfologia do espinho de *Eucidaris tribuloides*. (A) Espinho sadio “velho”; (B) Espinho sadio “novo”; (C) Ornamentação em detalhe; (D) Região basal em detalhe; (E e F) Espinho sadio; (G-I) Espinho sadio em corte transversal (ápice, meio e base respectivamente); (J) Espinho sadio em corte longitudinal mostrando a diferença na organização dos canais da medula e da camada radial; (K e L) articulação do espinho, evidenciando o soquete (K) e a placa interambulacral e seu tubérculo (L). Escalas = A e B = 3 mm; G-I e K = 0,5 mm; D e J = 2 mm; C e L = 1mm. Legenda: CR = camada radial, M = medula.

completamente a entrada, confinando o molusco ao interior da galha e nestes casos, era muito difícil ver o molusco. Nos ouriços coletados, foram encontrados 22 espinhos parasitados, com uma média de $1,46 \pm 0,9$ galha por indivíduo e um máximo de quatro galhas em um único animal. Galhas sem parasitas não foram observadas em nenhum dos espécimes coletados.

Na maioria dos espinhos parasitados foi possível encontrar um casal de moluscos e muitas massas de ovos em diferentes estágios de desenvolvimento (Fig. 1C-E). Além disso, marcas de alimentação estavam visíveis (Fig. 1E, G e H) e trabalhos anteriores já mostraram que este molusco parece se alimentar do tecido presente no espinho (Queiroz, 2012). Além disso, alguns indivíduos juvenis (aparentemente recém-assentados) foram encontrados em espinhos que mostravam o início da formação da galha, uma vez que apresentavam um aspecto majoritariamente sadio, com um inchaço exatamente sob o molusco.

Para o estudo da fisiologia, o espinho foi dividido em diferentes regiões, a fim de tornar a investigação mais eficiente. Independente da condição (sadio ou parasitado) foi possível dividi-lo em três regiões: ápice, meio e base. Além disso, cada uma dessas regiões tem porções com características distintas, nomeadas diferentemente a depender da técnica utilizada. Nas seções histológicas, em todas as regiões, puderam ser observadas a periferia, porção mais externa que consiste na epiderme e suas mediações e a medula, situada na região central. Por outro lado, a camada radial, só pôde ser delimitada nos cortes do meio e da base. Nas análises de MEV, também foram observadas duas porções distintas vistas por toda a extensão do espinho: a camada radial, subdividida em externa e interna e a medula central. O córtex, porção envolvendo a camada radial externa, só esteve presente na base do espinho sadio.

Caracterização dos celomócitos do espinho

Com relação às células presentes nas seções histológicas do espinho sadio e parasitado de *Eucidaris tribuloides*, somente dois tipos foram distinguíveis: os esferulócitos transparente (ET) e granular (EG). O esferulócito vermelho não foi encontrado em nenhuma das lâminas e os fagócitos e esclerócitos não puderam ser identificados por meio desta técnica.

Esferulócito transparente (Fig. 3J e K): Célula arredondada ou alongada, cujo núcleo é geralmente central, mas pode estar periférico. O característico aspecto externo rugoso desta célula (similar ao observado em preparações de citocentrifugado) é

bastante visível. Com o azul de toluidina, o núcleo mostra maior afinidade ao corante que ao citoplasma, onde este último pode apresentar-se sem coloração (transparente).

Figura 3 – Corte transversal do espinho sadio e suas estruturas. (A-C) Ápice: (A) Visão panorâmica; (B) Epiderme em detalhe; (C) Medula em detalhe; (D-F) Meio: (D) Visão panorâmica; (E) Epiderme em detalhe; (F) Medula em detalhe; (G-I) Base: (G) Visão panorâmica; (H) Epiderme em detalhe; (I) Medula em detalhe; (J e K) Esferulócitos transparente (ET) e Granular (EG); (L-N) Fungos. Escalas: A, D e G = 500 µm; B, C, E, F, H, I, L-N = 40 µm J e K = 20 µm. Legenda: Seta = fungos.

Com o Tricromo de Mallory, o núcleo apresenta afinidade a fucsina ácida e o citoplasma tem afinidade ao azul de metila. Esferulócito granular (Fig. 3J e K): Celomócito geralmente arredondado, mas pode apresentar-se alongado. Com o azul de toluidina, o núcleo é visível e tem afinidade ao corante, mas o citoplasma mostra uma

coloração diferenciada, apresentando-se amarelado/esverdeado. Por outro lado, quando corado com Tricromo de Mallory o núcleo (quando evidente) tem uma coloração escura e o citoplasma apresenta afinidade a fucsina ácida. Possui um aspecto tridimensional evidente com o citoplasma formado por um conjunto de esférulas. Algumas células foram vistas liberando o conteúdo das suas inclusões para o meio (“degranulando”).

Organização dos espinhos sadios

Ápice (Fig. 3A-C): Periferia (Fig. 3B): Epitélio simples, composto por células geralmente retangulares (similar ao epitélio simples cúbico de vertebrados), com afinidade a fucsina ácida. A epiderme parece não estar ainda completamente estruturada, pois não apresenta um padrão visível de organização. Os esferulócitos transparentes ($20,3 \pm 2,57$ cel/u.a.) foram mais abundantes que os granulares ($6,93 \pm 5,76$ cel/u.a.) (Figura 4). Medula (Fig. 3C): Parece ter pouca matriz calcária e muito material orgânico (tecido conectivo e celomócitos). O esferulócito transparente teve uma densidade de $38,5 \pm 2,3$ cel/u.a. e para o granular, a densidade foi de $20,5 \pm 3,3$ cel/u.a. (Figura 4A). Fungos (Fig. 3L-N): Fungos foram vistos, geralmente em aglomerados, e apresentaram uma coloração amarronzada/esverdeada. Foram vistas estruturas similares a hifas e conídios. Os aglomerados restringiram-se as proximidades da epiderme e não foram vistos aglomerados de fungos na medula.

Meio (Fig. 3D-F): Periferia (Fig. 3D e E): Epiderme similar a do ápice, contudo é possível observar um início de estruturação, sendo mais evidente a sua composição monoestratificada e a organização em colunas. Camada radial: Parece ser uma região de transição entre a epiderme e a medula, contendo pouca matriz orgânica, quando comparado com a medula. Medula (Fig. 3D e F): Parece ter mais matriz calcária e menos tecido, quando comparado ao ápice. Em direção à medula, verifica-se que o material vivo está disposto em “colunas”. Isso seria moldado pela matriz calcária. Os esferulócitos transparente e granular têm uma distribuição crescente do exterior para o interior, com $15,6 \pm 3,3$ e $6,7 \pm 4,3$ cel/u.a. na epiderme; $16,9 \pm 1,6$ e $7,8 \pm 1,4$ cel/u.a. na camada radial e $23,9 \pm 15,3$ e $6,62 \pm 0,6$ cel/u.a. na medula (Figura 4B). Fungos (Fig. X): Poucos aglomerados de fungo nessa região. Quando vistos, sempre se situavam próximo à epiderme.

Figura 4 – Infográfico sobre as densidades de esferulócitos nas diferentes regiões do espinho. (A-C) Espinho Sadio; (D-F) Espinho parasitado. (A e D) Ápice; (B e E) Meio e (C e F) Base. Legenda: EG = esferulócito granular; ET = esferulócito transparente.

Base (Fig. 3G-I): Periferia (Fig. 3G e H): Epiderme similar em composição, quando comparada com as outras partes do espinho, contudo, a organização do tecido nesta região é a mais definida, apresentando uma estruturação em coluna (epitélio simples cúbico). *Camada radial:* Se mostra como uma região de transição entre a epiderme e a medula, onde a ocorrência de matriz orgânica é diminuída, quando comparado com o centro e não apresenta a organização em coluna da parte periférica *Medula (Fig. 3G e I):* Similar ao ápice e ao meio. Foi possível observar uma aglomeração de celomócitos nesta porção do corte. O esferulócito transparente mostrou o mesmo padrão, com menores densidades na periferia, aumentando em direção a medula ($16 \pm 4,5$; 19 ± 1 e 29 ± 9 cel/u.a., respectivamente). Em contrapartida, o esferulócito granular foi menos denso na periferia ($5,3 \pm 4,2$ cel/u.a.), mas na camada radial e na medula, os valores foram similares ($8,5 \pm 0,9$ e $9 \pm 1,7$ cel/u.a.) (Figura 4C). Foram observados alguns esferulócitos granulares que apresentaram uma afinidade intermediária à fucsina ácida.

Fungos (Fig. 3L-M): Aglomerados presentes apenas nas proximidades da epiderme. No interior foram vistos pouquíssimos aglomerados.

Organização dos espinhos parasitados

Ápice (Fig. 5A-D): Periferia (Fig. 5A-C): Epitélio simples, composto por células geralmente cúbicas, com afinidade a fucsina ácida. Foram observados dois tipos de organização na epiderme, a depender do local em que se situavam. A epiderme situada no lado onde o dano está localizado parece ser mais desestruturada, quando comparada com a epiderme do lado oposto da mesma região. Medula (Fig. 5D): Apresenta muito tecido conectivo. Parece ter menos matriz calcária e mais material vivo. Os esferulócitos transparentes e granulares tiveram uma densidade muito próxima, com 12 ± 2 e $10,7 \pm 1,7$ cel/u.a. na periferia, e $11,1 \pm 5,9$ e $8 \pm 0,6$ cel/u.a. na medula (Figura 4D). Fungos (Fig. 5A): A característica dos aglomerados de fungos é igual à do espinho sadio. No entanto, o que muda é a quantidade. Muito aglomerados de fungos na periferia e foi possível ver aglomerados na medula.

Meio (Fig. 5E-H): Periferia (Fig. 5E-G): Epiderme semelhante ao padrão visto no ápice parasitado, onde o epitélio a epiderme apresenta um aspecto diferenciado a depender da região. Na região do dano e nas proximidades, a epiderme é bem fina e bastante desestruturada, e a densidade de esferulócitos transparente é de $6,7 \pm 4,5$ cel/u.a. e $19,7 \pm 2,3$ cel/u.a. para os esferulócitos granulares (Figura 4E). Na região oposta, apresenta-se similar à vista no meio do espinho sadio (disposição dos tecidos e afinidade aos corantes), só que um pouco menos estruturada quando comparada a epiderme do espinho sadio e os esferulócitos transparente e granular tem valores semelhantes ($9,3 \pm 4,64$ e $8 \pm 0,7$ cel/u.a., respectivamente) (Figura 4E). Camada radial: Similar ao da mesma região do espinho sadio, contudo a disposição dos esferulócitos é diferenciada. Na direção do dano, os esferulócitos vermelhos e granulares estão mais concentrados ($14,1 \pm 2,2$ e $32,9 \pm 7,3$ cél/u.a.) que no lado oposto ($8,6 \pm 4,4$ e $7,3 \pm 4,2$ cél/u.a.) respectivamente (Figura 4E). Medula (Fig. 5H): Desgastada e com mais matriz orgânica que no espinho sadio. É evidente a desestruturação da medula nesta região, com uma densidade maior de esferulócitos na direção do dano (ET = $11,7 \pm 3,2$ cél/u.a.; EG = $18,9 \pm 7,6$ cél/u.a.), que na direção oposta (ET = $12,2 \pm 8,2$ cel/u.a.; EG = $9 \pm 5,5$ cel/u.a.) (Figura 4E).

Figura 5 – Corte transversal do espinho parasitado e suas estruturas. (A-D) Ápice; (E-H) Meio; (I-L) Base. (A, E e I) Visão panorâmica; (B, F e J) Epiderme do lado danificado; (C, G e K) Epiderme do lado oposto ao dano; (D, H e L) Medula; (M-P) Local da galha com seqüência de maturação do esferulócito granular; (Q-R) Local de alimentação do gastrópode (colar); (S) Esferulócito granular degranulando próximo à aglomerados de fungo. Escalas: A, E e I = 300 μ m; B-D, F-H, J, K, R e S = 40 μ m; L e Q = 100 μ m; M = 600 μ m; N-P = 20 μ m. Legenda: **Círculo branco** = concentração de esferulócitos na medula; **1** = estágio inicial; **2** = estágio intermediário; **3** = estágio final; **Seta branca** = collar.

Esferulócito transparente: Pouco abundantes na região da galha, quando comparados com a mesma região do espinho sadio. Mas apresentavam uma disposição diferenciada. Estavam muito concentrados em determinados pontos da área lesada, principalmente dentro da estrutura de colar construída pelo gastrópode (Fig. 5Q-R). Esferulócito granular: Foi possível perceber um sentido de migração, que pareciam se originar no centro da medula, deslocando-se em direção a área lesada. Na medula, foram observadas células com uma baixa afinidade a fucsina ácida. No córtex existiam células com uma afinidade intermediária a este corante e na periferia, a afinidade a fucsina ácida era muito alta. Foi evidente também que estas células geralmente estavam associadas a grupos de fungos e degranulando próximo a eles (Fig. 5M-P e S). Fungos (Fig. 5S): Muito evidentes por todo o espinho, inclusive no centro da medula.

Base (Fig. 5I-L): *Periferia* (Fig. 5I-K): Também tem uma estrutura diferenciada a depender da região considerada. No mesmo lado onde o dano está localizado, a epiderme é mais espessada e não tão organizada em colunas, mas na região diametralmente oposta, a epiderme é bem semelhante à do espinho sadio, só que um pouco menos estruturada. A quantidade de esferulócitos é bastante parecida com $9,8 \pm 5$ cel/u.a. para o esferulócito transparente e $8,9 \pm 5,2$ cel/u.a. para o granular (Figura 4F). Camada radial: É estruturalmente similar ao da mesma região do espinho sadio, mas aparenta ter menos matriz orgânica. Os esferulócitos têm densidades parecidas com a da camada radial do meio do mesmo espinho ($ET = 12,1 \pm 5,6$ cel/u.a.; $EG = 6,2 \pm 3,5$ cel/u.a.) (Figura 4F). Medula (Fig. 5L): Parece ter mais tecido conectivo, quando em comparação com o espinho sadio. As concentrações dos esferulócitos transparente e granular ($20,9 \pm 8,2$ e $8,2 \pm 2$ cel/ μm^2) foram um pouco menores (Figura 4F). Fungos (Fig. 5A): Muito aglomerados presentes na periferia do espinho e poucos aglomerados na medula, quando em comparação com o espinho sadio.

Microscopia eletrônica de varredura

Com a microscopia eletrônica de varredura foi possível observar divisões no estereoma do espinho, identificadas como medula, camada radial e córtex (Fig. 6A), seguindo a nomenclatura utilizada por David et al. (2009) e Grossmann e Nebelsick (2013). A medula é formada pelos poros centrais e de maior diâmetro; a camada radial é uma faixa única de poros que envolvem a medula. Contudo, no espinho parasitado, é visível uma divisão em duas porções distintas: a interna, composta por poros menores e

Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura da seção transversal do espinho sadio e parasitado de *Eucidaris tribuloides*. (A e B) Visão geral do ápice do espinho sadio e parasitado, evidenciando as diferentes regiões. (C-E) Espinho sadio: (C) Ápice; (D) Meio; (E) Base. (F-H) Espinho parasitado: (F) Ápice; (G) Meio; (H) Base. Escalas: A, C-H = 200 μ m; B = 500 μ m. Legenda: C = córtex; CRE = camada radial externa; CRI = camada radial interna; M = medula.

adjacentes a medula e a externa, formado por poros maiores. Na base do espinho sadio, existe a formação de uma estrutura que protege a camada radial, denominada de córtex (Fig. 6E). Em contrapartida, a parte basal, a placa interambulacral carapaça e a articulação do tipo bola-e-soquete foram bastante similares, não mostrando diferenças entre indivíduos sadios e parasitados.

Espinho sadio – Ápice (Fig. 6A e C): Camada radial formada por poros pequenos alinhados em sentido radial. Na camada radial externa os canais têm um diâmetro médio de $9,75 \pm 1,13 \mu\text{m}$ e na interna $8,89 \pm 0,96 \mu\text{m}$, que não diferem significativamente ($p > 0,05$) entre si, mas diferem do meio e da base. (Fig. 7). Em contraste, a medula tem poros com diâmetros bem maiores ($22,48 \pm 4,32 \mu\text{m}$) (Fig. 8). *Meio (Fig. 6D)*: Córtex similar ao do ápice, mas já é possível observar uma leve diferenciação na organização da camada radial externa e interna. Contudo, os diâmetros são estatisticamente similares ($14,13 \pm 2,43 \mu\text{m}$ e $13,46 \pm 0,76 \mu\text{m}$, respectivamente) (Fig. 7). A medula tem diâmetro médio de $26,04 \pm 5,65 \mu\text{m}$ (Fig. 8). *Base (Fig. 6E)*: O córtex é definido como sendo um espessamento calcário (aproximadamente $105 \mu\text{m}$), onde canais se agrupam em sentido longitudinal. Os poros da camada radial externa medem $13,81 \pm 2,01 \mu\text{m}$ e da interna são um pouco maiores $15,08 \pm 2,47 \mu\text{m}$ (Fig. 7), mas não possuem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Os poros da medula têm diâmetro de $29,17 \pm 4,90 \mu\text{m}$ (Fig. 8).

Espinho parasitado – Ápice (Fig. 6B e F): Camada radial visivelmente diferenciada em duas regiões (interna e externa). O diâmetro dos canais da camada radial externa ($17,30 \pm 2,14 \mu\text{m}$) e interna ($7,86 \pm 1,23 \mu\text{m}$) difere significativamente ($p < 0,05$) (Fig. 7) e a camada radial externa é visivelmente diferente da do espinho sadio ($p < 0,05$) (Fig. 7). A medula apresenta poros com diâmetro médio de $22,37 \pm 3,51 \mu\text{m}$ (Fig. 8) que são similares ao do espinho sadio ($p > 0,05$) (Fig. 8). *Meio (Fig. 6G)*: A camada radial é similar à do ápice do mesmo espinho (visivelmente dividida), cujo diâmetro médio é $18,41 \pm 2,48 \mu\text{m}$ para a camada radial externa e $9,42 \pm 1,31 \mu\text{m}$ para a interna (Fig. 7). Estas camadas diferem entre si e com as suas correspondentes no espinho sadio (Fig. 7). O diâmetro dos poros da medula é de $21,96 \pm 4,68 \mu\text{m}$ que é menor que o da medula do meio do espinho sadio (Fig. 8). *Base (Fig. 6H)*: Diferentemente do observado na seção da base do espinho sadio, o parasitado não tem a camada radial externa protegida pelo

córtex (Fig. 6E). A estrutura da camada radial é bastante similar a da base do espinho sadio. Não existe uma clara delimitação entre a parte externa e a interna, mesmo assim, existe uma diferença significativa ($p < 0,05$) no diâmetro dos poros ($14,40 \pm 1,90 \mu\text{m}$ e $9,13 \pm 1,64 \mu\text{m}$, respectivamente) (Fig. 7). A camada radial interna tem os poros com um diâmetro menor que a do espinho sadio ($p < 0,05$), mas a externa tem diâmetro similar ($p > 0,05$). A medula apresenta poros com diâmetro de $18,28 \pm 2,35 \mu\text{m}$ (Fig. 8), que são bem menores ($p < 0,05$) quando comparados com o do espinho sadio.

Figura 7 – Diâmetro dos poros do canal radial do espinho de *Eucidaris tribuloides*. Letras indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre regiões diferentes do espinho (ápice, meio e base). Barras horizontais indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre porções (interno ou externo) do espinho sadio e parasitado. Legenda: = **CRE** – camada radial externa; **CRI** – camada radial interna; **Par** – espinho parasitado; **Sad** – espinho sadio.

Região basal – Sadio (Fig. 9A-F): A região basal é morfologicamente complexa, sendo constituída pela base propriamente dita, um anel (*milled ring*) e um colar adjacente a este último (Fig. 9A). O soquete é composto de um anel calcário externo mais denso, cujas perfurações são esparsas e medem $3,39 \pm 0,46 \mu\text{m}$ de diâmetro. No centro deste anel, encontra-se um círculo de 1 mm de diâmetro cujas perfurações são bem maiores ($14,10 \pm 2,52 \mu\text{m}$) e bastante próximas (Fig. 9 D-F). **Parasitado (Fig. 9A-F):** Na região basal do espinho parasitado, não foi possível observar as mesmas estruturas observadas no espinho sadio (base, anel e colar) (Fig. 1F e 2E e F). Em contrapartida, o soquete

mostrou o mesmo padrão com relação à disposição das estruturas (anel externo e círculo interno) e das perfurações ($3,89 \pm 0,81 \mu\text{m}$ e $15,35 \pm 1,87 \mu\text{m}$ respectivamente).

Figura 8 – Diâmetro dos canais presente na medula do espinho de *Eucidaris tribuloides*. Letras indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre regiões diferentes do espinho (ápice, meio e base). Barras indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre espinhos diferentes (sadio e parasitado). Legenda = **Sa** – Diferença significativa no espinho sadio; **Pa** – diferença significativa no espinho parasitado.

Placa interambulacral – A região externa consiste numa placa ornamentada que porta um tubérculo na região central (Fig. 2L, 9G e 10N-O). O tubérculo é composto por uma auréola, a protuberância, a plataforma e o mamilo perfurado – “*mamelon*” (Smith, 1980). Na parte interna, a placa é lisa com uma concavidade em sua porção central (Fig. 10O), localizada exatamente sob o tubérculo. Em seção longitudinal, é possível observar uma diferenciação do estereoma: a parte periférica é composta por um estereoma mais denso enquanto que no centro, esta estrutura é mais porosa (Fig. 9J-K). O mamilo possui uma perfuração central de $930 \mu\text{m}$ (Fig. 9J-K), que abriga um ligamento colágeno destinado a melhorar a fixação do espinho (não mostrado aqui).

Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura da base do espinho (A-F) e da placa interambulacral (G-L). (A) Parte basal do espinho em vista panorâmica (B) e em seção longitudinal (C). Soquete em corte longitudinal; (D) Soquete em visão panorâmica; (E-F) Padrão de perfuração da periferia (E) e da região central do soquete (F); (G) Placa interambulacral em vista aboral; (H) Tubérculo em detalhe; (I) Fundo do tubérculo; (J-L) Placa da carapaça em seção longitudinal evidenciando o padrão de perfuração. Escala: A, B e J = 500 µm; C, F, H e K = 200 µm; D e G = 1 mm; I = 50 µm; L = 100 µm. Legendas: A = anel; Ba = base; Col = colar; CR = camada radial; M = medula.

Microtomografia computadorizada (μ -CT)

Nas análises de microtomografia computadorizada, foi possível observar regiões com diferentes densidades calcárias dentro de um mesmo espinho (Fig. 10). Regiões mais claras indicam locais de alta densidade e regiões mais escuras, baixas densidades. O espinho sadio é composto por um eixo interno de alta densidade (Fig. 10B-D), que se estende da base até o ápice, e que corresponde a uma área de deposição calcária mais densa que circunda a medula, e esta última é a área de menor densidade no espinho sadio. Em torno deste eixo mais denso, encontra-se a camada radial externa, que é uma região de baixa densidade e alguns espinhos apresentam ornamentações de alta densidade na parede externa (Fig. 10A, B e G). A região basal do espinho (base, anel e colar) é o local de maior densidade (Fig. 10F e M). O espinho parasitado também apresenta um eixo central de alta densidade, onde é possível observar marcas de alimentação feitas pelo molusco (Fig. 10I-K). A camada radial é bem maior no local da galha e também apresenta uma baixa densidade. A região basal apresenta uma alta densidade, similarmente ao observado no espinho sadio (Fig. 10L). Somente nas análises de μ -CT, foi possível observar a região da base e do anel com mais detalhes (Fig. 10H-K), uma vez que estas estruturas não foram observadas nem com o auxílio de lupa (Fig. 2E e F) nem por meio de MEV (Fig. 1F). A placa da carapaça teve estrutura similar em organismos sadios e parasitados, com uma densidade maior próximo as extremidades e menor na região central quando vista em seção longitudinal (Fig. 10N e O).

Porcentagem de celomócitos e expressão de marcadores ligados a processos inflamatórios

Na cavidade celomática de *Eucidaris tribuloides*, foi possível encontrar os quatro principais tipos de celomócitos descritos para a classe Echinoidea. A porcentagem de tipos celulares foi bastante similar entre os indivíduos sadios e parasitados, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) (Fig. 11). Os fagócitos foram o tipo mais abundante, contribuindo com $45,23 \pm 11,65$ e $52,06 \pm 18,96$ % das células em indivíduos sadios e parasitados respectivamente. A porcentagem de célula vibrátil foi de $32,25 \pm 13,58$ nos sadios e $29,71 \pm 15,52$ nos parasitados. Os esferulócitos vermelho e transparente foram os tipos celulares menos freqüentes, com $12,02 \pm 1,51$ e $11,15 \pm 3,7$ % nos animais sadios e $10,48 \pm 6,26$ e $7,05 \pm 4,62$ % nos parasitados, respectivamente (Fig. 11 e Tabela I).

Figura 10 – Microtomografia computadorizada de espinhos sadio, parasitado e da placa da carapaça de *Eucidaris tribuloides*. (A-G) Espinho sadio; (A) Raio-X do espinho sadio, evidenciando um eixo central mais denso; (B-F) Gradiente de densidade do espinho sadio; (H-L) Gradiente de densidade do espinho parasitado; (M) Base do espinho, evidenciando o soquete com maior densidade; (N-O) Placa da carapaça em vista aboral, evidenciando o tubérculo (N) e em vista oral (O). Escalas: A-F = 5 mm; G = 10 mm; H-L, N e O = 3 mm; M = 1,5 mm.

Figura 11 – Percentagem dos tipos celulares encontrados na cavidade celomática de *Eucidaris tribuloides*.

Tabela I – Percentagem de celomócitos encontrados no líquido celomático de *Eucidaris tribuloides*.

Tipo celular	Porcentagem no Líquido celomático	
	Sadio (Me ± D.P.)	Parasitado (Me ± D.P.)
Fagócitos	45,23 ± 11,65	52,06 ± 18,96
Célula vibrátil	32,25 ± 13,58	29,71 ± 15,52
Esferulócito vermelho	12,02 ± 1,51	11,15 ± 3,70
Esferulócito transparente	10,48 ± 6,26	7,05 ± 4,62

Legenda: Me = Média; D.P. = Desvio padrão

Em relação à expressão dos marcadores ligados a processos inflamatórios (AIF-1 e p38 MAPK), foi possível observar que não houve diferença ($p > 0,05$) entre os indivíduos sadios e os parasitados (Fig. 12), uma vez que os valores encontrados para ambas as proteínas foram bastante similares.

Figura 12 – Nível de expressão das proteínas **AIF-1** e **p38 - MAPK** no intestino de indivíduos sadios e parasitados da espécie *Eucidaris tribuloides*.

DISCUSSÃO

Os trabalhos que abordam o processo inflamatório em invertebrados, em sua grande maioria, se dão por meio da caracterização das modificações do local afetado, sendo a utilização de abordagens estruturais (histologia, MET e MEV) comum neste tipo de estudo (De Leo *et al.*, 1996; Di Bella e De Leo, 2000; Becker *et al.*, 2004; Ittoop *et al.*, 2007; Mydlarz *et al.*, 2008). Em equinodermos, no entanto, sabe-se muito pouco destes processos. O que é conhecido refere-se geralmente a ectoparasitas da carapaça e do tegumento (Jones *et al.*, 1985; Shimizu *et al.*, 1995; Becker *et al.*, 2004) ou a parasitas na cavidade celômica (Johnson, 1969c; Taylor e Bang, 1978; Jellett *et al.*, 1988). Somente um trabalho utiliza o espinho como modelo de estudo (Johnson e Chapman, 1970b). Contudo, este estudo se restringe a caracterização dos organismos que infectam o espinho, e muito pouco é comentado acerca das possíveis respostas contra os invasores.

Em relação ao espinho de Echinoidea, o estado do conhecimento é notadamente desigual. Análises apenas da parte calcária por MEV e μ CT têm sido comuns, uma vez que o interesse taxonômico (Coppard e Campbell, 2004; Vinnikova e Drozdov, 2011; David *et al.*, 2009) e biotecnológico (Lai *et al.*, 2007; Vecchio *et al.*, 2007; Presser *et*

al., 2011) motivam o estudo desta estrutura. Em contrapartida, o conhecimento da parte orgânica é visivelmente escasso, com poucos trabalhos se dedicando mesmo a aspectos estruturais básicos. Poucas foram às abordagens histológicas e somente *Echinus esculentus* e *Strongylocentrotus purpuratus* foram estudados (Pilkington, 1969; Heatfield, 1971; Heatfield e Travis, 1975a). O mesmo acontece nas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e detalhes ultraestruturais dos componentes celulares e teciduais são ainda restritos (Heatfield e Travis, 1975a, 1975b; Märkel e Röser, 1983a, 1983b). Abordagens fisiológicas do espinho seguem a mesma tendência, sendo extremamente raras (Märkel e Röser, 1983a; Johnson e Chapman, 1970a; 1970b; Heatfield, 1971).

Pouco é conhecido sobre como o espinho mantém sua homeostase. Sabe-se que esta estrutura, do ponto de vista mineralógico, comporta-se como um único cristal de calcita (Su *et al.*, 2000), mas em relação a fisiologia, esta homogeneidade não se aplica. Pôde ser visto neste trabalho, que o espinho é uma estrutura heterogênea, com respostas diferenciadas e regionalizações nem sempre tão evidente em condições normais. Assim, para o seu estudo, ele pode ser facilmente dividido em ápice, meio e base e em cada uma dessas regiões, podemos encontrar uma medula central e uma periferia. Já a camada radial, em preparações histológicas, só é efetivamente visível no meio e na base do espinho.

Alterações locais em resposta ao parasitismo

A comparação com trabalhos anteriores foi dificultada, devido às diferenças entre as metodologias utilizadas em tais estudos. Esse fato é bastante evidente quando consideramos a divisão aqui adotada (ápice, meio e base em corte transversal), a qual difere dos trabalhos já publicados (Heatfield, 1971; Heatfield e Travis, 1975a; Grossman e Nebelsick, 2013), que utilizam seções longitudinais. No entanto, de maneira geral, a morfologia e ultraestrutura do espinho de *E. tribuloides* foi similar a das espécies *Echinus esculentus* e *Strongylocentrotus purpuratus* (Pilkington, 1969; Heatfield, 1971; Heatfield e Travis, 1975a).

Em todos os tipos de abordagem aqui utilizados, o espinho parasitado diferiu consideravelmente do sadio. Foi possível observar que o hospedeiro responde em nível celular e estrutural a presença do parasita. O ápice do espinho sadio apresentou características similares às observadas em *S. purpuratus* (Heatfield, 1971; Heatfield e Travis, 1975a). Contrariamente, no que tange a organização da epiderme, o ápice

parasitado apresentou consideráveis diferenças na organização, mais evidentes no lado danificado. Os esferulócitos transparentes tiveram uma densidade elevada tanto na periferia quanto na medula do espinho sadio. Porém, os granulares foram pouco concentrados na periferia, enquanto que na medula sua quantidade aumentou consideravelmente. Células similares foram encontradas no espinho de *E. tribuloides* (Märkel e Röser, 1983b, Fig. 2), cujas características foram muito semelhantes as descritas no Cap I desta dissertação (cf. Fig. 9G). Celomócitos com características similares puderam ser observados também no espinho de *E. esculentus* (Pilkington, 1969), onde é relatada a presença de dois tipos de “granular cell body”. O primeiro tem forte afinidade ao ácido periódico de Schiff e se assemelha muito ao esferulócito transparente. O segundo não apresenta afinidade a este corante e mostrou esférulas muito refrativas, assemelhando-se muito ao observado para o esferulócito granular quando tratado com azul de toluidina. No espinho parasitado, a concentração de esferulócitos foi marcadamente diferente, apresentando valores similares tanto entre os dois tipos celulares observados quanto entre as porções do ápice (periferia e a medula).

A parte calcária do ápice foi evidentemente diferente entre os espinhos sadios e parasitados. No primeiro, a camada radial não se apresentou diferenciada em externa e interna, mas esta característica foi marcante no parasitado, cuja camada externa tem poros bem mais largos que a interna. Também foi possível observar que a camada radial apical sadia foi consideravelmente menor em relação ao meio e a base do mesmo espinho. Em relação à medula, o padrão estrutural foi similar entre espinhos sadios e parasitados. No entanto, o diâmetro da medula apical do espinho sadio foi menor quando comparada com o meio e a base e este mesmo padrão foi observado em *Phyllacanthus imperialis* (Grossman e Nebelsick, 2013). Trabalhos obtendo medidas do diâmetro dos poros da camada radial e da medula também foram realizados e utilizaram os ouriços *Plococidaris verticillata*, *Prionocidaris baculosa*, *Eucidaris metularia*, *P. imperialis* e *Heterocentrotus mammillatus* (Grossman e Nebelsick, 2013). No entanto, exceto para os dados de diâmetro da medula de *P. imperialis*, a comparação se torna impossibilitada, pois o autor não informa a região na qual as medidas foram obtidas.

Na região mediana do espinho sadio, é perceptível o aumento na organização da epiderme e dos tecidos internos, ao passo que no parasitado, a epiderme é visivelmente contrastante. Neste último, o epitélio da parte oposta ao dano tem uma organização levemente semelhante ao meio do sadio, com sua característica organização em colunas. Já no lado do dano, é consideravelmente fino e desestruturado, sem a organização

colunar. A medula parece ter menos matriz orgânica no espinho sadio que no parasitado. Em relação aos celomócitos, o espinho sadio mostrou a mesma tendência observada na região anterior. O ET foi a célula com maior densidade, aumentando ainda mais na medula. Diferentemente, o EG mostrou valores próximos por todas as porções desta região. No espinho parasitado, a resposta celular foi evidente. Na região oposta ao dano, as densidades dos esferulócitos transparente e granular foram próximas em todas as porções do espinho (periferia, camada radial e medula). Já nas proximidades do ferimento, é bastante visível que as proporções celulares foram alteradas. As concentrações do esferulócito granular aumentaram duas ou três vezes. Apesar de menos pronunciada, de maneira geral, também pôde ser observada uma resposta do esferulócito transparente que teve um padrão de organização diferenciado a depender do local considerado, como por exemplo, no colar produzido pelo molusco. Quantidades elevadas de celomócitos também foram vistas no espinho infectado de *S. franciscanus*, principalmente quando próximo de microorganismos invasores (Johnson e Chapman, 1970a). Também foi bastante evidente a migração, concomitante a maturação do EG, tendo a medula como ponto de partida, uma vez que lá foram vistas a maior parte das células com baixa afinidade a fucsina ácida do Tricromo de Mallory. Nas proximidades da periferia, esta célula foi freqüentemente observada degranulando quando próxima a aglomerados de fungos. Também foi visto que em espinho de ouriços cidaróides, infectados por fungos, a quantidade de esferulócitos na área infectada foi maior (Mortensen e Kolderup Rosenvinge, 1910).

A matriz calcária da região mediana do espinho sadio e parasitado foi estruturalmente similar aos seus respectivos ápices. No espinho sadio, a diferenciação em camada radial externa e interna continua pouco evidente e os dados do diâmetro dos poros confirmam esta afirmação. Estrutura bastante similar foi encontrada em um trabalho anterior utilizando *E. tribuloides* (Märkel e Röser, 1983a) e neste estudo é possível observar que a camada radial mais interna apresenta poros menores que os da camada externa. Em contrapartida, no espinho parasitado é evidente a diferenciação destas porções, que também é apoiado pelas medidas de diâmetro dos poros. A medula do sadio foi similar a já descrita para *E. tribuloides* (Märkel e Röser, 1983a) e para *P. imperialis* (Grossman e Nebelsick, 2013). Os poros na medula foram consideravelmente mais largos que os do ápice do mesmo espinho e do meio do espinho parasitado.

A base do espinho sadio de *E. tribuloides* apresentou uma epiderme simples e bem estruturada (Märkel e Röser, 1983b), cujos tecidos mostram a típica organização

em colunas vista no epitélio cuboidal de vertebrados. Esta característica foi também observado no espinho de *E. esculentus* (Pilkington, 1969). No parasitado, a organização teve o mesmo padrão visto até o momento: o lado danificado continuou sendo mais desestruturado que o lado não lesado. A medula parece ser a porção do espinho com mais matriz orgânica da região basal e este tipo de organização foi observada em ambas as categorias analisadas. Para os celomócitos, o padrão de distribuição foi bastante similar entre os espinhos sadios e parasitados. Houve uma densidade menor de ET na periferia e na camada radial e um aumento considerável na medula. Já para o EG, os valores densidade celular foram próximos por todas as porções de um mesmo espinho e também entre sadio e parasitado. No entanto, apesar do padrão de distribuição dos celomócitos serem parecidos entre os espinhos, a quantidade de células foi maior no espinho sadio.

Em relação à parte calcária, diferenças consideráveis foram notadas. A existência de um córtex foi vista somente na base do espinho sadio e a mesma estrutura já foi observada anteriormente em *E. tribuloides* (Märkel e Röser, 1983b - Fig. 1B-D), no entanto, o trabalho não cita a região amostrada. Mas devido às características, parece se tratar da parte basal. Já em *P. imperialis*, uma camada com estrutura similar a um córtex é observada em todo o espinho e aumenta a espessura no sentido base-ápice (Grossman e Nebelsick, 2013). O espinho parasitado não apresentou um córtex. A camada radial do espinho sadio teve o mesmo padrão visto nas outras regiões (sem diferenciação) e os valores de diâmetro dos poros também apóiam esta afirmação. Uma estruturação similar já foi observada em trabalhos anteriores com *E. tribuloides* (Märkel e Röser, 1983b). Já a camada radial do espinho parasitado foi muito diferente do observado até o momento. Apesar de o diâmetro da camada radial externa e interna diferir estatisticamente, o contraste na morfologia não é tão aberrante como visto no ápice e no meio do mesmo espinho. Pode-se observar também que, diferentemente do espinho sadio, onde é a camada radial do ápice que difere do meio e da base, no espinho parasitado, somente a CRE da base que é diferente. O diâmetro da medula da base do espinho sadio é um pouco maior que o do meio do mesmo espinho, mas não difere dele e este mesmo padrão é observado em *P. imperialis* (Grossman e Nebelsick, 2013). No entanto, é consideravelmente maior que o da base do parasitado e nesta categoria, é a medula da base que difere do ápice e do meio.

Análises da região basal e da placa interambulacral mostraram que estas estruturas foram bastante similares, independente do espinho ser sadio ou parasitado. A

região basal do espinho sadio foi idêntica ao já registrado em trabalhos anteriores com *E. tribuloides* (Märkel e Röser, 1983b). No espinho parasitado, contudo, as estruturas foram pouco visíveis. Já a articulação bola-e-soquete e a placa interambulacral (Märkel, 1981) foram estruturalmente similares entre as duas categorias.

Nas análises de microtomografia computadorizada (μ CT), foi possível perceber diferenças contrastantes entre espinhos sadios e parasitados. Em ambas as categorias, foram observadas um eixo cilíndrico cuja densidade foi maior na parte basal central e as camadas periféricas consistiam de material de baixa densidade. No espinho sadio é possível observar um cilindro delgado e mais denso na parte interior. Este mesmo padrão também é visível no espinho parasitado, contudo, este cilindro interno parece ter proporções maiores. De acordo com o observado para o espinho de *Phyllacanthus imperialis*, também foram notadas diferenças de densidade (Grosmann e Nebelsick, 2013), uma vez que a medula consiste na região de menor densidade encontrada. Isto pode ser validado para o espinho de *E. tribuloides* através das análises de MEV, que sempre mostram a medula como uma região de poros grandes e paredes finas. O mesmo padrão observado aqui por meio de MEV, também foi visto em trabalhos prévios com o mesmo ouriço (Märkel e Röser, 1983a; 1983b). Além disso, análises de μ CT revelaram o mesmo padrão para outras espécies de ouriços cidaróides (David *et al.*, 2009). Portanto, este cilindro de alta densidade parece ser o resultado da observação da camada radial interna, que mostrou diâmetros menores e paredes mais espessadas. Nas ilustrações do espinho de *E. tribuloides* (Märkel e Röser, 1983a) e de outros ouriços cidaróides (David *et al.*, 2009) também é possível ver este mesmo padrão. Este modelo também pode explicar o cilindro interno mais espesso no espinho parasitado em comparação com o sadio. Em espinhos parasitados, tanto a CRI e a medula possuem poros de menor diâmetro enquanto as paredes calcárias são mais espessas.

Já o fato da região mais periférica ter uma densidade menor, é explicado pela estruturação da CRE. No espinho sadio, é visível uma estreita camada menos densa na periferia. É possível observar isso nas análises de microscopia eletrônica e pode ser explicado pelo fato de que apesar da estrutura calcária aparentar ter a mesma espessura que a CRI, esta última tem poros menores. Este padrão também pôde ser observado tanto no espinho de *E. tribuloides* (Märkel e Röser, 1983a; 1983b) como nos de *Mesocentrotus nudus* e *M. franciscanus* (Vinikova e Drozdov, 2011). No espinho parasitado, esta camada periférica menos densa é mais visível devido tanto ao

crescimento anormal da região mediana (galha), quanto pelo diâmetro evidentemente maior dos poros da CRE.

A região basal se mostrou como o local de maior densidade em ambas as categorias analisadas. Isto é explicado devido à presença da base e do anel calcário no soquete, que possuem poros pequenos, o que torna o estereoma ainda mais denso. A parte mais porosa do soquete é o círculo interno com perfurações maiores, que são destinadas a fixação de um ligamento colágeno que auxilia no posicionamento do espinho (Takahashi, 1967; Motokawa, 1983). A placa interambulacral não apresentou diferença entre as categorias, apresentando uma densidade levemente maior na região periférica e menor na parte central. Já o assoalho do buraco no mamilo (*mamelon*) tem perfurações maiores, que servem como ponto de fixação para o ligamento de colágeno (Castillo *et al.*, 1995). Este tipo de estruturação destinado a ancoragem do ligamento de colágeno também pode ser visto no espinho de *Diadema setosum* (Motokawa, 1983).

Alterações sistêmicas em resposta ao parasitismo

Sabe-se muito pouco sobre alterações na cavidade celomática de equinodermos, provocadas por parasitoses. Vários grupos reconhecidamente parasitas, tais como bactérias, protozoários, platelmintos e nematódios, já foram registrados em simbiose com Echinodermata (Jangoux, 1987a; 1987b). No entanto, a maioria destes trabalhos registra apenas a associação do ponto de vista da zoologia, não fornecendo informações sobre a fisiologia do parasita ou do hospedeiro.

Sabe-se que bactérias (Messer e Wardlaw, 1980; Yui e Bayne, 1983) e protozoários (Jellett *et al.*, 1978; Taylor e Bang, 1978) são capazes de modificar as propriedades intrínsecas (coloração, pH, proporção de células) do líquido celomático em Echinodermata. Em *Echinus esculentus* e em *Strongylocentrotus purpuratus* infectados por bactérias Gram-negativas foi possível observar alterações na maioria dos tipos celulares (Messer e Wardlaw, 1980; Yui e Bayne, 1983). Nestas duas espécies, foi visto que fagócitos e esferulócitos vermelhos tiveram suas densidades diminuídas, as células vibráteis aumentaram, contudo, os esferulócitos transparentes não modificaram suas concentrações. Estudos com protozoários intracelômicos também mostraram alterações no líquido celomático. Em *S. droebachiensis* infectados com *Paramoeba invadens*, observou-se uma diminuição do número total de celomócitos, resultado da diminuição do número de células vibráteis e esferulócitos transparentes (Jellett *et al.*, 1988). Outras alterações mais superficiais podem ser também detectadas, como modificações na cor e

na capacidade de coagulação observadas no fluído celomático de *Asteria forbesi* (Asteroidea) infectadas com um ciliado parasita (Taylor e Bang, 1978). Em indivíduos parasitados de *E. tribuloides*, no entanto, as contagens dos principais tipos de celomócitos não mostraram diferenças significativas, e nem mesmo a densidade total de células (Sadio $5,12 \times 10^5$ cel/ml; parasitado $5,2 \times 10^5$ cel/ml – $p > 0,05$).

É conhecido que, além das respostas imunes celulares, os vertebrados também evocam mecanismos humorais para lidar com parasitas (Sendashonga e Black, 1982; Montesano *et al.*, 1999). Este padrão também ocorre em equinodermos, uma vez que indivíduos de *S. droebachiensis* infectados por *P. invadens*, mostraram níveis duas vezes mais elevados de proteínas totais no líquido celomático em comparação com indivíduos sadios (Jellet *et al.*, 1988). Considerando à expressão dos marcadores ligados ao processo inflamatório (pp38 MAPK e o AIF), pode-se observar que são expressos em algumas respostas de vertebrados contra parasitas (Herden *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005), mas em *E. tribuloides*, por outro lado, não foram detectadas diferenças na expressão destas proteínas entre indivíduos sadios e parasitados.

Uma vez que estas moléculas são muito conhecidas para vertebrados (Schluesener *et al.*, 1998; Roux e Blenis, 2004; Li *et al.*, 2013) e também muito conservadas no processo evolutivo, sendo encontradas desde os grupos mais basais (Kruse *et al.*, 1999; Böhm *et al.*, 2000) até os mais derivados (Gaitanaki, *et al.*, 2004; He *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013), inclusive em Echinodermata, (Caterina *et al.*, 2008; Ovando *et al.*, 2012), a utilização desta ferramenta para a identificação de indivíduos parasitados, se mostra interessante. Sabe-se que equinodermos são capazes de responder a parasitas, tanto em nível celular (Messer e Wardlaw, 1980; Yui e Bayne, 1983), como através do aumento da concentração de proteínas do líquido celomático (Jellet *et al.*, 1988). Desta forma, com base nos dados aqui obtidos, pode-se sugerir que o processo inflamatório em *E. tribuloides*, causado pelo eulimídeo *S. troglodytes*, se caracteriza como uma inflamação localizada, não tendo sido possível observar efeitos sistêmicos nos hospedeiro.

Aspectos fisiológicos do espinho e origem dos celomócitos

Fazendo uma análise integrada de todos os dados, é possível observar que o espinho apresenta regionalizações condizentes com seu estado/função fisiológica. O ápice parece ser de fato uma região morfologicamente diferente do resto do espinho, uma vez que ela funciona como uma zona de crescimento (Heatfield, 1971; Heatfield e

Travis, 1975a), e isto pôde ser visto em ambas as categorias. A parte mediana tem características de uma região em crescimento e a base parece ser um local fisiologicamente maduro, cujas características já atingiram o auge do desenvolvimento.

Em relação à parte calcária, a medula parece se comportar como uma via para a migração dos esferulócitos, e isso é afirmado com base no diâmetro maior dos poros (Märkel e Röser, 1983a; 1983b) e da elevada quantidade de células na região. Existem relatos sobre a possível migração de células no espinho de *S. franciscanus* e que este evento poderia ocorrer por meio dos poros da matriz calcária (Johnson e Chapman, 1970b). Além disso, é possível notar que no espinho de *S. purpuratus*, os celomócitos estão mais agrupados no eixo central (Heatfield, 1971). Considerando a camada radial, duas hipóteses devem ser ponderadas: (i) não existe diferenciação em CRE e CRI, e o observado é somente uma desorganização causada pela presença do parasita, ou (ii) estas camadas são morfologicamente similares em situações normais, mas existem diferenças funcionais que foram exacerbadas com a presença do parasita. Nós acreditamos que a segunda hipótese seria a mais plausível, uma vez que em trabalhos anteriores com *E. tribuloides* (Märkel e Röser, 1983a; 1983b) foi possível observar uma leve diferenciação estrutural na camada radial, com a parte mais interna tendo poros menores e a externa com poros maiores. No espinho parasitado a região do meio e da base vão sendo mais mineralizadas, com deposição de carbonato e a consequente diminuição do diâmetro dos poros da camada radial e medula. Este processo pode ser no sentido de reforçar a estrutura em resposta aos danos causados pelo parasita.

Já em relação à parte celular/tecidual, os esferulócitos transparentes e granulares parecem estar envolvidos no crescimento/manutenção da matriz calcária e na defesa, respectivamente. Isto é dito com base na alta concentração de esferulócitos transparentes no ápice e em determinados locais do espinho parasitado. Foi visto que, células com afinidade ao Ácido periódico de Shiff foram encontradas na área em regeneração do espinho de *S. franciscanus* (Johnson e Chapman, 1970a). Em contrapartida, o esferulócito granular teve sua densidade aumentada no ápice do espinho sadio (uma área em formação que precisa de defesa contra agentes invasores) e na região lesada do espinho parasitado. Também foi visto que em *S. franciscanus*, células identificadas como “*red spherule cells*”, tiveram altas densidades liberaram grânulos, quando próximas a microorganismos (Johnson e Chapman, 1970a). Trabalhos anteriores citam que esclerócitos e fagócitos seriam os tipos celulares responsáveis pela manutenção da parte calcária, (Heatfield e Travis, 1975a; Märkel e Röser, 1983a;

1983b), no entanto eles se utilizam de MET. Com histologia, não foi possível observar estas células e o mesmo problema para diferenciar os tipos celulares, e o mesmo problema foi visto em estudos com o espinho de *E. esculentus* (Pilkington, 1969). Em contrapartida, três tipos de células foram observadas no espinho de *S. franciscanus*: esclerócitos similares aos fagócitos do celoma, “*PAS positive red spherule cells*” e “*other cells with smaller, PAS-positive spherules or granules*” (Johnson e Chapman, 1970a). É um tanto estranho esferulócitos vermelhos terem afinidade ao ácido periódico de Shiff. Este corante tem afinidade a carboidratos e o esferulócito vermelho é preenchido com equinocromo-A, uma naftoquinona que tem propriedades físicoquímicas completamente diferentes das de carboidratos (McClendon, 1912; Millot, 1957; Yoshida, 1959).

Quanto à origem de celomócitos presentes no espinho, é possível pensar em duas hipóteses: (i) as células teriam origem na cavidade celômica e migrariam para o espinho; (ii) os celomócitos seriam originados no próprio espinho, através de algum tecido/zona celomopoiética. Nós acreditamos que a segunda hipótese seria a mais provável devido a um conjunto de fatores. O espinho faz contato com a carapaça somente em um ponto: a articulação bola-e-soquete (Takahashi, 1967; Motokawa, 1983; Castillo *et al.*, 1995). O soquete tem um anel externo muito denso de matriz calcária com perfurações esparsas e muito pequenas e somente o círculo central teria perfurações com condição para passar células. Contudo, este local é indicado como sendo o ponto de ancoramento no espinho, do ligamento de colágeno (Takahashi, 1967; Motokawa, 1983). Na outra extremidade, tem-se o tubérculo, que se encaixa perfeitamente no soquete e faz contato diretamente com a camada calcária mais densa do soquete, o anel calcário externo (Castillo *et al.*, 1995). No centro da protuberância, é possível ver o mamilo perfurado, por onde o ligamento de colágeno se insere e se fixa no fundo dessa cavidade (Märkel e Röser, 1983a; Castillo *et al.*, 1995). *In vivo*, parece que o feixe de fibras colágenas ocupa toda a área da perfuração. A este quadro, ainda adiciona-se a elevada densidade das zonas periféricas da placa interambulacral. Então, observando-se todos estes fatores, é possível notar como seria difícil para células migrarem da cavidade celômica, atravessando a placa interambulacral, cujas paredes externas são mais densas, chegar ao filamento de colágeno muito bem organizado (Castillo *et al.*, 1995) e passarem pelas perfurações do círculo interno do soquete.

Imaginar um centro local de origem para os celomócitos não é algo tão absurdo de se ponderar e parece ser uma hipótese mais parcimoniosa. Uma proposta de

múltiplos locais de origem para os celomócitos é, de fato, uma hipótese a ser considerada (cf. Cap I). Além disso, um trabalho com o espinho de *S. purpuratus*, traz a seguinte frase: “*The results of this study demonstrate the presence of a region of relatively high mitotic activity in the shaft of regenerating and whole spines at the level of the milled ring...*” (Heatfield, 1971). Esta região a qual o estudo se refere, provavelmente é a membrana de Prouho (Prouho, 1887; Märkel e Röser, 1983a). Esta membrana e sua função na reconstrução/absorção do esqueleto calcário do espinho de *E. tribuloides* foi estudada, mostrando que a regeneração desta estrutura seria iniciada ali. Além disso, os dados de contagem celular mostram a medula da base como sendo o local de maior densidade celular nesta região. Isso está de acordo com o esquema elaborado para *E. tribuloides* (Märkel e Röser, 1983a) onde, nas proximidades do colar, a membrana de Prouho seria arqueada na porção central da base do espinho (a medula). Tendo em vista a literatura e os dados obtidos neste trabalho, é possível considerar a região do colar, especificamente a membrana de Prouho, como um local de proliferação celular, que possivelmente seria o local de origem de todos os tipos de células encontrados no espinho, ao invés da migração destes celomócitos, se originando da cavidade celômica e se deslocando para a região afetada.

CONCLUSÕES

Diferentemente do visto atualmente para vertebrados, onde a maioria dos estudos faz uma abordagem molecular para o processo inflamatório, nos invertebrados, grande parte das informações ainda é obtida por meio de estudos morfológicos/estruturais (Di Bella e De Leo, 2000; Ittoop *et al.*, 2007; Mydlarz *et al.*, 2008; Palmer *et al.*, 2008) e esse padrão também é verdade para os equinodermos (Maes e Jangoux, 1984; Jones *et al.*, 1985; Bouland e Jangoux, 1988).

Neste estudo, ficou evidente que o espinho não é uniforme, apresentando complexas respostas inflamatórias em reação ao molusco parasita. As análises realizadas até o momento tratam o espinho como sendo uma estrutura única, que respondesse de forma igual a qualquer tipo de desafio. No entanto, como mostrado aqui, o espinho possui regionalizações, que podem ser observadas tanto no nível tecidual/celular, como no estrutural. O ápice se comporta como uma região diferenciada em relação ao resto do espinho, e um dano causado em uma determinada região altera toda a estrutura, desencadeando uma resposta celular complexa. Assim, foi possível

observar que tanto a matriz orgânica como a calcária foram alteradas, e apresentaram respostas tentando proteger o espinho de mais danos causados pelo gastrópode. Portanto, foi visível que em nível local, as respostas foram muito elaboradas. Já em nível sistêmico, não foi possível observar modificações. Isto parece indicar, que assim como visto em vertebrados, equinodermos são capazes de ter respostas locais, sem envolver todo o organismo.

PERSPECTIVAS

No presente trabalho, utilizando o ouriço *Eucidaris tribuloides* como modelo, foi possível observar fatos importantes com relação ao sistema imune e as respostas inflamatórias em Echinodermata. No que diz respeito aos efetores do sistema imune dos Echinodermata, os celomócitos, observou-se que o conhecimento ainda está longe de ser o ideal. Como foi mostrado no capítulo I, o conhecimento básico sobre qual o verdadeiro número de celomócitos presente na cavidade celomática de Echinoidea parece ser muito subestimado e isto pode ser devido às técnicas comumente utilizadas. Utilizando uma abordagem integrada, observaram-se dois tipos de celomócitos nunca antes observados (esferulócito granular e irregular) e um tipo pouco observado (célula progenitora). Além disso, para o estudo da morfologia destas células, as técnicas citoquímicas se mostraram muito importantes na separação dos tipos celulares, sendo mais eficientes que a observação de células vivas em suspensão e quase tão eficientes quanto à microscopia eletrônica de transmissão. Somando-se a tudo isso, ainda pode-se falar do processo de maturação, observado para a maioria dos esferulócitos (exceto o irregular) e para a célula vibrátil, fato nunca descrito para celomócitos de Echinodermata.

No entanto, apesar do conhecimento obtido aqui, muito ainda deve ser abordado a fim de melhorar o entendimento dos celomócitos dos equinodermos. Por exemplo, poder-se-ia utilizar microscopia eletrônica de varredura, assim como feito por Xing et al. (2008), como uma maneira de aprimorar a identificação dos celomócitos, principalmente dos esferulócitos. Também são poucos os dados relativos à origem dos celomócitos, e não se sabe ao certo nem mesmo se existiria um órgão celomopoietico, se estas células seriam originadas de células pré-existentes que circulam no líquido celomático (célula progenitora) ou se existiria uma mistura de ambas as possibilidades. Isto poderia, em parte, ser resolvido, tentando-se estudar, por meio de marcadores moleculares (Brown *et al.*, 2009; Bely e Sikes, 2010), este possível papel nas células progenitoras. Outro tópico importante no estudo dos celomócitos, principalmente em relação aos esferulócitos, seria a descoberta e utilização de marcadores moleculares específicos ou mais comuns aos esferulócitos, assim como atualmente conhecido para os linfócitos de vertebrados, que expressam as proteínas CD4 e CD8 em suas membranas (Miceli e Parnes, 1991), e também para os fagócitos de Echinodermata (Smith *et al.*, 2010). Conseguindo-se marcadores para os esferulócitos, um passo

subseqüente seria acompanhar e o processo de maturação destas células. Outras questões importantes com relação aos esferulócitos é conhecer o conteúdo de suas esférulas, o que ira proporcionar um salto enorme na direção do entendimento de suas funções.

Com relação à inflamação em equinodermos, é evidente que o conhecimento dos mecanismos é escasso e a situação se torna ainda pior quando se trata do espinho dos ouriços. Foi possível observar no capítulo II que, diferentemente do que se podia pensar, o espinho não se comporta como uma estrutura uniforme, tendo regionalizações e particularidades inerentes ao estado fisiológico de cada região. Por meio da histologia, foi visível como o ápice, meio e base são diferentes entre si, tanto em nível da organização tecidual como na distribuição dos celomócitos. Este fato foi ainda mais evidente no espinho parasitado, que apresentou respostas específicas a determinados desafios durante a invasão do espinho, tal como a cicatrização, possivelmente realizada pelos esferulócitos transparentes, e a defesa dos locais danificados, onde o esferulócito granular foi o principal envolvido. No nível da matriz calcária, o espinho sadio mostra aberrantes diferenças com relação ao parasitado, vistas na estruturação da camada radial externa e no diâmetro dos poros desta camada e da medula, que foram maiores no espinho sadio que no parasitado e as análises de μ CT também revelam o mesmo padrão. Já no nível sistêmico, a contagem dos principais tipos celulares e os níveis de expressão das proteínas AIF e MAPK-p38, ambos verificados a partir do celoma, não mostraram diferença entre indivíduos sadios e parasitados. Assim, os dados em conjunto indicam uma visível resposta inflamatória em nível local, mas não em nível sistêmico.

Contudo, apesar do grande avanço no entendimento da fisiologia do espinho e em suas respostas a agentes invasores, algumas questões ainda permaneceram sem respostas. Em estudos futuros, será necessário integrar a microscopia eletrônica de transmissão nas análises da matriz orgânica do espinho, uma vez que somente com histologia, não foi possível observar os demais tipos de celomócitos já descritos para esta estrutura (Märkel e Röser, 1983b) e se possível, também utilizar marcação específicas para cada tipo celular. Desvendar se os celomócitos presentes no espinho teriam origem na membrana de Phruhos ou migram da cavidade celomática também é um tópico importante e poderá ajudar em uma questão mais geral, que é: de onde vêm os celomócitos? Isto poderia ser realizado por meio de experimentos com regeneração de um espinho danificado e observação das funções desta membrana, por meio de marcação celular. Além disso, investigar um possível papel do filamento colagenoso

presente na articulação bola-e-soquete. Teria ele um papel similar na migração dos celomócitos ao observado na migração das células em Porifera (Leys e Reiswig, 1998)? Já em nível sistêmico, o estudo de outras moléculas envolvidas no processo de inflamação, tal como as citocinas poderiam ajudar a confirmar os nossos dados de que esse evento é local. Isso poderia ser realizado também no espinho, uma vez que encontrar baixos níveis dessas moléculas na cavidade celomática e nos espinhos sadios e altos no espinho parasitado poderia mostrar, definitivamente, o grau do processo inflamatório.

Assim, é possível perceber que, com relação às células da cavidade celomática, muito ainda deve ser realizado a fim de tentar aproximar, ou se possível, equiparar o nível de conhecimento dos equinodermos com o de vertebrados. Identificar e caracterizar todos os celomócitos e saber a natureza de seus conteúdos é o ponto chave para se começar. A partir disso, o estudo das funções específicas de cada tipo celular será impulsionado. Já com relação ao processo inflamatório, sobretudo no espinho, é evidente que não se conhece muito e que o trabalho aqui realizado somente abre as portas para um imenso e interessante campo de estudos, principalmente de infecções naturais, como a observada com o gastrópode *Sabinella trogodytes*.

REFERÊNCIAS

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. e Pillai, S. 2012. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. 4º Ed. Philadelphia, Pa: Saunders, 340 p.
- Algood, H.M.S e Cover, T.L. 2006. *Helicobacter pylori* Persistence: an Overview of Interactions between *H. pylori* and Host Immune Defenses. Clin. Microb. Rev., 19(4):597–613.
- Aliota, M.T.; Fuchs, J.F.; Mayhew, G.F. e Christensen, B.M. 2007. Mosquito transcriptome changes and filarial worm resistance in *Armigeres subalbatus*. BMC Gen., 8:463
- Allam, B.; Ashton-Alcox, K. A. e Ford, s. E. 2002. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. Fish Shell. Immun., 13(2):141-158.
- Allen, J.R. 1994. Host resistance to ectoparasites. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 13(4): 1287-1303.
- Allen, P.G. e Dawidowicz, E.A. 1990. Phagocytosis in *Acanthamoeba*: I. A mannose receptor is responsible for the binding and phagocytosis of yeast. J. Cell Physiol., 145:508–513.
- Amano, S. 1990. Self and Non-Self Recognition in a Calcareous Sponge, *Leucandra abratsbo*. Biol. Bull., 179: 272-278.
- Arason, G.J. 1996. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. Fish & Shellfish Immunol., 6: 277–289.
- Arizza, V.; Giaramita, F.; Parrinello, D.; Cammarata, M. e Parrinello N. 2007. Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. Comp. Biochem. Physiol. A, 147:389-394.
- Arlian, L.G. 1996. Immunology of scabies. In: Wikel, S.K. (ed.). The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships. Wallingford (UK): CAB International. 232-258 p.
- Ashley, N.T.; Weil, Z.M. e Nelson, R.J. 2012. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., 43: 385–406.
- Bachmann, S. e Goldschmid, A. 1978. Fine structure of the axial complex of *Sphaerechinus granularis* (Lam.) (Echinodermata: Echinoidea). Cell Tissue Res., 193:107–123.

- Bayne, C.J. 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *Biosci.*, 40:723-731.
- Beck, G. e Habicht, G.S. 1996. Evidence for Invertebrate Inflammatory Cytokines. *Adv. Comp. Envir. Physiol.*, 24:29-47.
- Beck, G. e Habicht, G.S. 1996. *Sci. Amer.*, 275(5):60-66.
- Becker, P.; Gillan, D.; Lanterbecq, D.; Jangoux, M.; Rasolofonirina, R.; Rakotovao, J. e Eeckhaut, I. 2004. The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata). *Aquac.*, 242:13 – 30.
- Becker, P.; Gillan, D.C. e Eeckhaut, I. 2007. Microbiological study of the body wall lesions of the echinoid *Tripneustes gratilla*. *Dis. Aquat. Org.*, 77: 73–82.
- Behmer, O.A.; Tolosa, E.M.C. e Freitas Neto, A.G. 1976. Manual de técnicas de histologia normal e patológica. EDART/EDUSP, São Paulo.
- Bely, A.E. e Sikes, J.M. 2010. Acoel and platyhelminth models for stem-cell research. *J. Biol.*, 9(2):1-4.
- Bertheussen, K. 1981. Endocytosis by echinoid phagocytes in vitro. I. Recognition of foreign matter. *Dev. Comp. Immunol.*, 5: 241±250.
- Bertheussen, K. 1982. Receptors for complement on echinoid phagocytes: II. Purified human complement mediates echinoid phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.* 6, 635–642.
- Bertheussen, K. e Seljelid, R. 1978. Echinoid phagocytes in vitro. *Exp. Cell Res.*, 111(2):401-412.
- Bertheussen, K. e Seljelid, R. 1982. Receptors for complement on echinoid phagocytes. I. The opsonic effect of vertebrate sera on echinoid phagocytosis. *Dev. Comp. Immunol.*, 6:423±431.
- Biassoni, R.; Cantoni, C.; Pende, D.; Sivori, S.; Parolini, S.; Vitale, M.; Bottino, C. e Moretta, A. 2001. Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol. Rev.*, 181:203–214.
- Bishop, G.A.; Haxhinasto, S.A.; Stunz, L.L. e Hostager, B.S. 2003. Antigen-Specific B-Lymphocyte Activation. *Crit. Rev. Immunol.*, 23(3):165–213.
- Böhm, M.; Schröder, H.C.; Müller, I.C.; Müller, W.E.G. e Gamulin, V. 2000. The mitogen-activated protein kinase p38 pathway is conserved in metazoans: Cloning and activation of p38 of the SAPK2 subfamily from the sponge *Suberites domuncula*. *Biol. Cell*, 92:95-104.

- Booolootian, R.A. e Geise, C.A. 1958. Coelomic corpuscles of echinoderms. Biol. Bull., 15:53-56.
- Borges, J.C.S.; Porto-Neto, L.R. Mangiaterra, M.B.C.D. 2002. Phagocytosis in vivo and in vitro in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* (Meissner) at 0°C. Polar Biol, 25:891–897.
- Borges, J.C.S.; Branco, P.C.; Pressinotti, L.N.; Severino, D. e Silva, J.R.M.C. 2010. Intranuclear crystalloids of Antarctic sea urchins as a biomarker for oil contamination. Polar Biol., 33:843–849.
- Bouland, C. e Jangoux, M. 1988. Infestation of *Asterias rubens* (Echinodermata) by the ciliate *Orchitophrya stellarum*: effect on gonads and host reaction. Dis. Aquat. Organ., 5: 239-242.
- Brillouet, C.; Luquet, G. e Leclerc, M. 1981. In vitro effect of mitogens on starfish axial organ cells evidence of lymphokine-like substances. In: Proceedings of the 1st Congress of Developmental and Comparative Immunology, Aberdeen. 159 -170 pp.
- Brockton, V.; Henson, J.H.; Raftos, D.A. Majeske, A.J.; Kim, Y e Smith, LC. 2008. Localization and diversity of 185/333 proteins from the purple sea urchin—unexpected protein-size range and protein expression in a new coelomocyte type. J. Cell Sci., 121(3): 339-348.
- Broere, F.; Apasov, S.G.; Sitkovsky, M.V. e van Éden, M. 2011. T cell subsets and T cell-mediated immunity. In: Nijkamp, F.P. e Parnham, M.J. (eds.). Principles of Immunopharmacology: 3° Ed. (estendida e revisada). 17-27 p.
- Brown, F.D.; Keeling, E.L.; Le, A.D. e Swalla, B.J. 2009. Whole body regeneration in a colonial ascidian, *Botrylloides violaceus* J. Exp. Zool. B: Mol. Dev. Evol., 312: 885–900
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L., and Hoffmann, D. 1999. Antimicrobial peptides in insects: structure and function, Dev. Comp. Immunol. 23: 329 – 344.
- Campbell SS, Crawford BJ. 1991. Ultrastructural study of the hyalin layer of the starfish embryo, *Pisaster ochraceus*. Anat. Rec., 231:125–135.
- Canicatti, C. 1990. Lysosomal enzyme pattern in *Holothuria polii* coelomocytes. J. Invert. Pathol., M56, 70–74.
- Canicatti, C. 1991. Binding properties of *Paracentrotus lividus* (Echinoidea) hemolysins. Comp. Biochem. Physiol., A, 98: 463–468.

- Canicatti, C. e D'Ancona, G. 1990. Biological protective substances in *Marthasterias glacialis* (Asteroidea) epidermal secretion. Journal of Zoology (Lond.), 222: 445-454.
- Canicatti, C. e D'Ancona, G. 1989. Cellular aspects of *Holothuria polii* immune response. J. Invert. Path., 53:152-158.
- Castillo, J. D.; Smith, D.S.; Vidal, A. M. e Sierra, C. 1995. Catch in the Primary Spines of the Sea Urchin *Eucidaris tribuloides*: A Brief Review and a New Interpretation. Biol. Bull., 188:120-127.
- Caterina, C.; Savona, R.; Ragusa, M.A.; Bosco, L. e Gianguzza F. 2008. p38 MAPK activation is required for *Paracentrotus lividus* skeletogenesis. Caryologia, 61(1): 74-81.
- Cerenius, L. e Söderhäll, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunol. Rev., 198:116-26.
- Chalk, R.; Townson, H. e Ham, P.J. 1995. *Brugia pahangi*: the effects of cecropins on microfilariae in vitro and in *Aedes aegypti*. Exp. Paras., 80:401-406.
- Chalk, R.; Townson, H.; Natori, S.; Desmond, H. e Ham, P.J. 1994. Purification of an insect defensin from the mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol., 24(4):403-410.
- Chea, H.K., Wright, C.V. e Swalla, B.J. 2005 Nodal signaling and the evolution of deuterostome gastrulation. Develop. Dynam., 234, 269-278.
- Chen, G.; Zhuchenko, O. e Kuspa, A. 2007. Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. Science 317: 678-681.
- Cheng, T.C.; Rodrick, G.E.; Foley, D.A. e Koehler, S.A. 1975. Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. J Invertebr Pathol., 25: 261-265.
- Chia, F. e Xing, J. 1996. Echinoderm Coelomocytes. Zool. Stud., 35(4): 231-254.
- Chien, P.K.; Johnson, P.T.; Holland, N.D. e Fayla, A.C. 1970. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*) IV. Ultrastructure of the coelomocytes. Protop., 71:419-442.
- Christensen, B.M. e Forton, K.F. 1986. Hemocyte-mediated melanization of microfilariae in *Aedes aegypti*. J. Paras., 72:220-225.
- Coppard, S.E. e Campbell, A.C. 2004. Taxonomic significance of spine morphology in the echinoid genera *Diadema* and *Echinothrix*. Invert. Biol., 123(4):357-371.

- Cruse, J.M. e Lewis, R.E. 2009. Illustrated dictionary of immunology. 3^o ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. 761 p.
- Cuenot, L. 1887. Études anatomiques et morphologiques sur les ophiures. Arch. Zool. Exp. Gen., ser. 2, 6:3-82.
- Cuenot, L. 1891. Études sur le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale (2^a partie: Invertébrés). Arch. Zool. Exp. Gen., ser. 2, 9:593-670.
- Daffre, S.; Kylsten, P.; Samakovlis, C. e Hultmark, D. 1994. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. Mol. Gen. Genet. 242:152–62.
- David, B.; Stock, S.R.; De Carlo, F.; Hétériér, V. e De Ridder, C. 2009. Microstructures of Antarctic cidaroid spines: diversity of shapes and ectosymbiont attachments. Mar Biol., 156: 1559–1572.
- Davies, B.; Chattings, L.S. e Edwards, S.W. 1991. Superoxide generation during phagocytosis by *Acanthamoeba castellanii*: similarities to the respiratory burst of immune phagocytes. J. Gen. Microbiol., 137: 705–710.
- De Leo, G.; Parrinello, N.; Parrinello, D.; Cassara', G.; e Di Bella, M.A. 1996. Encapsulation response of *Ciona intestinalis* (Ascidiacea) to intratunical erythrocyte injection. I. The inner capsular architecture. J. Invertebr. Pathol. 67:205–212.
- Delmotte, F.; Brillouet, C.; Leclerc, M.; Luquet, G. e Kader, J.C. 1986. Purification of an antibody-like protein from the sea star *Asterias rubens* (L.). Eur. J. Immunol., 16:1325–1330
- Dempsey, P.W.; Vaidya, S.A. e Cheng, G. 2003. *The art of war*: innate and adaptive responses. Cell. Mol. Life Sci., 60:2604–2621.
- Di Bella, M.A. e De Leo, G. 2000. Hemocyte Migration during Inflammatory-like Reaction of *Ciona intestinalis* (Tunicata, Ascidiacea). J. Invert. Pathol., 76:105–111.
- Diamond, G.; Legarda, G. e Ryan, L.K. 2000. The innate immune response of the respiratory epithelium. Immunol. Rev., 173:27–38.
- Dudley, P. L. 1968. A light and electron microscopic study of tissue interactions between a parasitic copepod *Scolecodes huntsmani* (Henderson), and its host ascidian *Styela gibbsii* (Stimpson). J. Morph., 124: 263–282.

- Dunham, P. e Weissman, G. 1986. Association of marine sponge cells induced by Ca pulses, Ca ionophores, and phorbol esters proceeds in the absence of external calcium. *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, 134:1319-1326.
- Dzik, J.M. 2010. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Bioch. Pol.*, 57(4):443-466.
- Eales, L. 2003. *Immunology for Life Scientists*. 2° ed. John Wiley & Sons Ltda. 337p.
- Edds K.T. 1993. Cell biology of echinoid coelomocytes. *J Invert. Pathol*, 61:173-178.
- Edgecombe, G.D.; Giribet, G.; Dunn, C.W.; Hejnol, A.; Kristensen, R.M.; Neves, R.C.; Rouse, G.W.; Worsaae, K. e Sørensen, M.V. 2011. Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Org. Divers. Evol.*, 22 p.
- Eliseikina, M.G e Magarlamov T.Y. 2002. Coelomocyte Morphology in the Holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). *Rus. J. Mar. Biol.*, 28(3):197–202.
- Endean, R. 1966. The coelomocytes and coelomic fluids. *In: Physiology of Echinodermata*, pp. 301-328 New York: Interscience.
- Endean, R., 1958. The coelomocytes of *Holothuria leucospilota*. *Quart. J. Micr. Sci.*, 99:47-60.
- Erickson, S.M.; Xi, Z.; Mayhew, G.F.; Ramirez, J.L.; Aliota, M.T.; Christensen, B.M. e Dimopoulos, G. 2009. Mosquito infection responses to developing filarial worms. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 3: e529
- Fabre, T.; Fayollas, M.; Richoille, G e Lecal, J. 1969. Ultrastructure des coelomocytes des quelques Echinoderms. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*, 105:234-262.
- Falleiros, A.M.F.; Bombonato, M.T.S. e Gregório, E.A. 2003. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Braz. Arch. Biol. Tech.*, 46(2):287-294.
- Fell, H.B. e Pawson, D.L. 1966. General biology of echinoderms. 1-48. *In: Boolotian, R. A. (Ed) Physiology of Echinodermata*. Interscience Publishers, N.Y.
- Feral, J.P. e Massin, C. 1982. Digestive system: Holothuroidea. *In: Jangoux, M.; Lawrence, J.M. (eds). Echinoderm nutrition*. Balkema, Rotterdam. pp 192–212.
- Ferguson, J.C. 1964. Nutrient transport in starfish. I. Properties of the coelomic fluid. - *Biol. Bull., Woods Hole*, 126: 33-56.
- Ferreira, M.U.; Nunes, M. S. e Wunderlich, G. 2004. Antigenic Diversity and Immune Evasion by Malaria Parasites. *Clin. Diag. Lab Immunol.*, 11(6):987–995.

- Fontaine, A.R. e Hall, B.D. 1981. The haemocyte of the holothurian *Eupentacta quiqueseMITA*: ultrastructure and maturation. Can. J. Zool., 59:1884-1891.
- Fontaine, A.R. e Lambert, P. 1977. The fine structure of the leukocyte of the holothurian *Cucumaria miniata*. Can. J. Zool., 55:1530-1544.
- Gaitanaki, C.; Kefaloyianni, E.; Marmari, A. e Beis, I. 2004. Various stressors rapidly activate the p38-MAPK signaling pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). Mol. Cell. Bioch., 260: 119–127.
- Gatton, M.L.; Cheng, Q. 2004. Investigating antigenic variation and other parasite-host interactions in *Plasmodium falciparum* infections in naive hosts. Parasitol., 128:367-376.
- Geddes, P. 1980. Observations sur le fluide perivisceral des oursins. Arch. de Zool. exp. et. Gener., 8:483 - 496.
- Ghosh, J.; Lun, C.M.; Majeske, A.J. Sacchi, S.; Schrankel, C.S. e Smith, L.C. 2011. Invertebrate immune diversity. Dev. Comp. Immunol., 35:959–974.
- Gigli, I e Austen, K.F. 1971. Phylogeny and Function of the Complement System Ann. Rev. Microbiol., 25:309-332.
- Gliński, Z. E Jarosz, J. 2000. Immune phenomena in echinoderms. Arch. Immunol. Therap. Experim., 48(3):189–193.
- Goto, H. e Sanches, M.C.A. 2013. Does the Complement System Work for or Against the Host during Parasite Infections? Intern. Trends Immun., 1(2):11-23.
- Greenberg, S. e Grinstein, S. 2002. Phagocytosis and innate immunity. Curr. Opin. Immunol., 14:136–145.
- Gross, P.S.; Clow, L.A. e Smith, C.L. 2000. SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes. Immunog., 51:1034-1044.
- Gross, P.S.; Al-Sharif, W.Z.; Clowb, L.A. e Smith, L.C. 1999. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. Dev. Comp. Immunol, 23:429-442.
- Grossmann, J.N. e Nebelsick, J.H. 2013. Comparative morphological and structural analysis of selected cidaroid and camarodont sea urchin spines. Zoomorphology, 132: 301–315.
- Há, E.M.; Oh, C.T.; Bae, Y.S. e Lee, W.J. 2005. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. Science 310:847–50.
- Hall, C.; Welch, J.; Kowbel, D.J. e Glass, N.L. 2010. Evolution and Diversity of a Fungal Self/Nonself Recognition Locus. PLoS ONE, 5(11): 1-14.

- Hamerman, J.A.; Ogasawara, K. e Lanier, L.L. 2005. NK cells in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 17:29–35.
- He, L-S.; Xu, Y.; Matsumura, K.; Zhang, Y.; Zhang, G.; Qi, S. e Qian, P. 2012. Evidence for the Involvement of p38 MAPK Activation in Barnacle Larval Settlement. *PLoS ONE* 7(10): 1-12.
- Heatfield, B. M. 1971. Growth of the calcareous skeleton during regeneration of spines of the sea urchin *strongylocentrotus purpuratus* (stimpson): a light and scanning electrom microscopy study. *J. Morph.*, 134: 57-90.
- Heatfield, B.M. e Travis, D.F. 1975a. Ultrastructural studies of regenerating spines of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. I. Cell types without spherules. *Morphol.*, 145(1):13-49.
- Heatfield, B.M. e Travis, D.F. 1975b. Ultrastructural studies of regenerating spines of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. II. Cell types with spherules. *J. Morphol.*, 145(1):51-71.
- Henson, J.H.; Kolnik, S.E.; Fried, C.A.; Nazarian, R.; McGreevy, J.; Schulberg, K.L.; Detweiler, M. e Trabosh, V.A. 2003. Actin-based centripetal flow: phosphatase inhibition by calyculin-A alters flow pattern, actin organization and actomyosin distribution. *Cell. Motil. Cytosk.*, 56(4):252-266.
- Henson, J.H.; Nesbitt, D.; Wright, B.D.. e Scholey, J.M. 1992. Immunolocalization of kinesin in sea urchin coelomocytes. Association of kinesin with intracellular organelles. *J. Cell. Sci*, 103 (Pt 2):309-320.
- Henson, J.H.; Svitkina, T.M.; Burns, A.R.; Hughes, H.E.; MacPartland, K.J.; Nazarian, R. e Borisy, G.G. 1999. Two components of actin-based retrograde flow in sea urchin coelomocytes. *Mol. Biol. Cell.*, 10(12):4075-4090.
- Herden C, Schluesener HJ, Richt JA. 2005. Expression of allograft inflammatory factor-1 and haeme oxygenase-1 in brains of rats infected with the neurotropic Borna disease virus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2005 Oct;31(5):512-21.
- Herouard, E. 1889. Recherches sur les holothuries des cotes de France. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, ser. 2, 7: 535-704.
- Hetzel, H.R. 1965. Studies on holothurian coelomocytes. II. The origin of coelomocytes and the formation of brown bodies. *Biol. Bull.* 128: 102-111.
- Hoffmann, J.A. e Reichhart, J.M. 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunol.*, 3: 121–126.

- Holland, N.D.; Phillips, J.H. e Giese, A.C. 1965. An Autoradiographic Investigation of Coelomocyte Production in the Purple Sea Urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*). Biol. Bull., 128(2): 259-270.
- Hornef, M.W.; Wick, M.J.; Rhen, M. e Normark, S. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. Nature immunol., 3(11):1033-1040.
- Hughes TK, Smith EM, Chin R. 1990. Interaction of immunoactive monokines (interleukin and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8(7) 4426-4429.
- Hughes, T.K.; Smith, E.M.; Bamett, J.A.; Charles, R. e Stefano, G.B. 1991. LPS stimulated invertebrate hemocytes: a role for immunoreactive TNF and IL-1. Dev. Comp. Immuno., 15:117-122.
- Hunter CA, Ellis-Neyer L, Gabriel KE, 1997. The role of the CD28/B7 interaction in the regulation of NK cell responses during infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol;158:2285–2293.
- Hyman, L.H. 1955. The invertebrates: Echinodermata. The coelome Bilateria. McGraw-Hill, New York.
- Ikuta, T. 2011. Evolution of Invertebrate Deuterostomes and Hox/ParaHox Genes. Genomics Proteomics Bioinform., 9(3): 77-96.
- Ittoop, G.; George, K.C.; George, R.M.; Sobhana, K.S.; Sanil, N.K. e Nisha, P.C. 2007. Inflammatory reactions of the Indian edible oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston) and its modulations on exposure to Nuva and copper. J. Mar. Biol. Assoc. Índia, 49(2): 148 – 153.
- Iwanaga, S. e Lee, B.L. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. J. Biochem. Mol. Biol., 38(2): 128-150.
- Jacobson, F.W. e Millott, N. 1953. Phenolases and Melanogenesis in the Coelomic Fluid of the Echinoid *Diadema antillarum* Phillippi. Proc. R. Soc. London – B, 141:231-247.
- Janeway, C.A. 2001. How the immune system protects the host from infection. Microbes Infect. 3:1167-71.
- Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M. e Shlomchik, M. 2001. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5° ed. New York: Garland Science. “The complement system and innate immunity”. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>

- Jangoux, M. 1987. Diseases of echinodermata. I. Agents microorganisms and protists. Dis. Aquatic. Organisms, 2:147-162.
- Jangoux, M. 1987. Diseases of echinodermata. II. Agents metazoans (Mesozoa to Bryozoa). Dis. Aquatic. Organisms, 2: 205-234.
- Jellett, J.F.; Wardlaw, A.C. e Scheibling, R.E. 1988. Experimental infection of the echinoid *Strongylocentrotus droebachiensis* with *Paramoeba invadens*: quantitative changes in the coelomic fluid. Dis. Aquatic. Organisms., 4:149-157.
- Johnson PT, Chapman FA. 1970. Abnormal epithelial growth in sea urchin spines (*Strongylocentrotus franciscanus*). J. Inver. Pathol., 16:116-122.
- Johnson, P.T. 1969a. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*). I. The normal coelomocytes; their morphology and dynamics in hanging drops. J. Invert. Pathol., 13:25-41.
- Johnson, P.T. 1969b. The Coelomic Elements of Sea Urchins (*Strongylocentrotus*) II. Cytochemistry of the Coelomocytes. Histochem., 17:213-231.
- Johnson, P.T. 1969c. The Coelomic Elements of Sea Urchins (*Strongylocentrotus*) III. In Vitro Reaction to Bacteria. J. Invert. Pathol., 13:42-62.
- Johnson, P.T. e Chapman, F.A. 1970a. Infection with Diatoms and Other Microorganisms in Sea Urchin Spines (*Strongylocentrotus franciscanus*). J. Invert. Pathol., 16:268-276.
- Johnson, P.T. e Chapman, F.A. 1970b. Abnormal epithelial growth in sea urchin spines (*Strongylocentrotus franciscanus*). J. Invert. Pathol., 16:116-122.
- Joiner, K.A. 1988. Complement evasion by bacteria and parasites. Ann. Rev. Microbiol. 42:201-30
- Jones, C.J. 1996. Immune responses to fleas, bugs and sucking lice. In: Wikel, S.K. (ed.). The Immunology of Host- Ectoparasitic Arthropod Relationships. Wallingford (UK): CAB International. 150-174 p.
- Jones, G.M.; Hebda, A.J.; Scheibling, R.E. e Miller, R.J. 1985. Histopathology of the disease causing mass mortality of sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*) in Nova Scotia. J. Invert. Pathol., 45(3):260-271.
- Kahmann, R. e Bölker, M. 1996. Self/Nonself Recognition in Fungi: Old Mysteries and Simple Solutions. Cell, 85, 145–148.
- Karasaki, S. 1965. Intranuclear crystal within the phagocytes of the ovary of *Arbacia punctulata*. J. Cell Biol., 25:654–660.

- Karban, R. e Shiojiri, K. 2009. Self-recognition affects plant communication and defense. *Ecol. Letters*, 12: 502–506.
- Kasper LH, Matsuura T, Fonseca S, 1996. Induction of gammadelta T cells during acute murine infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 157:5521–5527.
- Khalturin, K.; Becker, M.; Rinkevich, B. e Bosch, T.C. 2003. Urochordates and the origin of natural killer cells: identification of a CD94/NKR-P1-related receptor in blood cells of *Botryllus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(2):622-627.
- Kim, C.H.; Park, J.W.; Ha, N.C.; Kang, H.J. e Lee, B.L. 2008. Innate immune response in insects: recognition of bacterial peptidoglycan and amplification of its recognition signal. *BMB Reports*, 41: 93–101
- Kim, L.; Del Rio, L.; Butcher, B.A.; Mogensen, T.H.; Paludan, S.R.; Flavell, R.A. e Denkers, E.Y. 2005. p38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection. *J. Immunol.*, 174(7):4178-84.
- Kindred ,J.E. 1924. The cellular elements in the perivisceral fluid of echinoderms. *Biol Bull.*, 47:228-251.
- Kindred, J.E. 1921. Phagocytosis and Clotting in the Perivisceral Fluid of *Arbacia*. *Biol. Bull.*, 41:144-152.
- Klion, A.D e Nutman, T.B. 2002. Immunity to Parasitic Worms. 1-7.p. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0000482/abstract>.
- Klotman, M.E e Chang, T.L. 2006 Defensins in innate antiviral immunity. *Nature Rev. Immunol.*, 6: 447-456.
- Kolimann, M. 1908. Recherches sur les Leucocytes. *Ann. Sc. Nat. Zool.*, Ser. 9, Tome 8.
- Korbel, D.S.; Finney, O.C. e Riley, E.M. 2004. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Inter. J. Parasitol.*, 34:1517–1528.
- Kruse, M.; Steffen, R.; Batel, R.; Müller, I.M. e Müller, W.E.G. 1999. Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto- and allograft response in marine sponges. *J. Cell Sci.*, 112:4305-4313.
- Kumar, V. e Sharma, A. 2010. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Inter. Immunopharmacol.*, 10: 1325–1334
- Lai, M.; Kulak, A. N.; Law, D.; Zhang, Z.; Meldrum, F.C. e Riley, D.J. 2007. “Profiting from nature: macroporous copper with superior mechanical properties.” *Chem. Communic.*, 34: 3547-3549.

- Lawrence, T.; Willoughby, D.A. e Gilroy, D.W. 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Rev. Immunol.*, 2:787-795.
- Leclerc, M. 2012a. Cell-mediated immune responses in the sea-star *Asterias rubens* (Echinoderm). *Amer. J. Immunol.*, 8(4):191-195.
- Leclerc, M. 2012b. Innate and adaptative immunity in the sea-star *Asterias rubens*. *Amer. J. Immunol.*, 8(3): 78-83.
- Leclerc, M. 2013. Like an invertebrate primitive antibody. *Amer. J. Immunol.*, 9(3): 94-95.
- Leclerc, M., 1973. Ultrastructural study of the reactions in the axial organ of *Asterina gibbosa* (echinodermata, asteride) after protein injection. *Annales d'Immunol.*, 124(C): 363–374.
- Leclerc, V. e Reichhart, J.M. 2004. The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol. Rev.* 198, 59-71.
- Leys, S.P. e Reiswig, H.M. 1998. Transport pathways in the neotropical sponge *Aplysina*. *Biol. Bull.* 195:30–42.
- Li, J.; Chen, J.; Zhang, Y. e Yu, Z. 2013. Expression of allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) in response to bacterial challenge and tissue injury in the pearl oyster, *Pinctada martensii*. *Fish & Shellfish Immunol.*, 34:365e371
- Liebman, E. 1950. The leucocytes of *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.*, 98:46-59.
- Lima, A.B. e Sousa, P.J.C. 2009. Estudo da ação antinociceptiva e anti-inflamatória do 1-Nitro-2-Feniletano, principal constituinte da *Aniba canelilla*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará. 83 p.
- Litman, G.W.; Cannon, J.P. e Dishaw, L.J. 2005. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol.*, 5(11):866-879.
- Liu, C.T.; Hou, R.F. e Chen, C.C. 1998. Formation of basement membrane-like structure terminates the cellular encapsulation of microfilariae in the haemocoel of *Anopheles quadrimaculatus*. *Parasitol.*, 116:511–518.
- Long, S.; Martinez, P.; Chen, W.; Thorndyke, M. e Byrne, M. 2003. Evolution of echinoderms may not have required modification of the ancestral deuterostome HOX gene cluster: first report of PG4 and PG5 Hox orthologues in echinoderms. *Dev Genes Evol.*, 213: 573–576.

- Luengo, M.B. 2005. A historical revision of the main immunological events and pharmacology in the search of the understanding and treatment of inflammatory diseases. *Rev. Eletr. Farm.*, 2(2):64-72.
- MacDonald, A.S.; Araujo, M.I. e Pearce, E.J. 2002. Immunology of Parasitic Helminth Infections. *Infect. Immunity*, 70(2): 427–433.
- Machado, P.R.L.; Araújo, M.I.A.S.; Carvalho, L. e Carvalho, E.M. 2004. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Na. Bras. Dermatol*, 79 (6): 647-664.
- Maes, P. e Jangoux, M. 1984. The bald sea urchin disease: a biopathological approach. *Helgol Meeresunters* 37: 217–222.
- Magalhaes, T.; Oliveira, I.F.; Melo-Santos, M.A.; Oliveira, C.M.; Lima, C.A. e Ayres, C.F. 2008. Expression of defensin, cecropin, and transferrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae), and the abnormal development of nematodes in the mosquito. *Exp. Parasitol.*, 120: 364–371.
- Majeske, A.J. ; Bayne, C.J. e Smith, L.C. 2013. Aggregation of Sea Urchin Phagocytes Is Augmented In Vitro by Lipopolysaccharide. *PLoS ONE* 8(4):1-15.
- Malagoli, D.; Sacchi, S. e Ottaviani, E. Lectins and cytokines in celomatic invertebrates: two tales with the same end. *ISJ* 7: 1-10.
- Märkel, K. 1981. Experimental morphology of coronar growth in regular echinoids. *Zoomorphology*, 97-31-52.
- Märkel, K. e Röser, U. 1983a. Calcite resorption in the spine of the echinoid *Eucidaris tribuloides*. *Zoomorphology* 103:43-58.
- Märkel, K. e Röser, U. 1983b. The spine tissue in the echinoid *Eucidaris tribuloides*. *Zoomorphology*, 103:43–58.
- Martoja, R. e Martoja, M. 1967. *Initiation aux Techniques de l'Histologie Animale*. Masson et Cie. 354 pp.
- Matranga, V.; Pinsino, A.; Celi, M.; Di Bella, G. e Natoli, A. 2000. Impacts of UV-B radiation on short-term cultures of sea urchin coelomocytes *Mar. Biol.*, 149:25–34.
- Matranga, V.; Pinsino, A.; Celi, M.; Natoli, A.; Bonaventura, R.; Schroder, H.C. e Müller, W.E.G. 2005. Monitoring chemical and physical stress using sea urchin immune cells. *In: Matranga, V. (Ed.). Echinoderms, Prog. Mol. Subcell. Biol.* 39: 85-110.

- McCaughey, C. e Bodnar, A. 2012. Investigating the Sea Urchin Immune System: Implications for Disease Resistance and Aging. *J. Young Invest.*, 23(6):25-33.
- McClendon, J. F. 1912. Echinochrome, a red substance in sea urchins. *J. Biol. Chem.*, 11:435-441.
- McKenzie, J.D. e Grigolava, I.V. 1996. The echinoderm surface and its role in preventing microfouling. *Biofouling* 10:261–272.
- Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428–35.
- Messer, L.I. e Wardlaw, A.C. 1980. Separation of the coelomocytes of *Echinus esculentus* by density gradient centrifugation. *Proc. Eur Colloq. Echinoderms, Brussels. In: Jangoux, M. (ed.) Echinoderms present and past. Balkema, A.A.; Rotterdam, p. 319-323.*
- Metchnikoff, E. 1884. A disease of *Daphnia* caused by a yeast. A contribution to the theory of phagocytes as agents for attack on disease-causing organisms. In: Brock T (ed), *Milestones in microbiology*, Washington, DC: American Society for Microbiology, pp 132-138.
- Metchnikoff, É. 1892. *Leçons sur la pathologie comparée de inflammation*. G. Masson, Paris.
- Metchnikoff, E. 1893. *Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation: Delivered at the Pasteur Institute in 1891*. Kegan Paul, Trench, Trubner & Co. Ltd, London.
- Metchnikoff, E., 1968a. *Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation*. Dover, New York.
- Metchnikoff, E., 1968b. *Immunity in Infective Diseases*. Dover, New York.
- Miceli, M.C. e Parnes, J.R. 1991. The roles of CD4 and CD8 in T cell activation. *Semin. Immunol.*, 3(3):133-41.
- Michaelis, H.T. 2009. *Michaelis: Dicionário Escolar Língua Portuguesa - Nova Ortografia conforme o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa*. Editora Melhoramentos Ltda. 992 p.
- Miller JS, Nguyen T, Stanley-Samuelson DW. Eicosanoids mediate insect nodulation responses to bacterial infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 12418-12422.
- Millot, N. 1957. Naphthoquinone pigment in the sea urchin *Diadema antillarum*. *Proc. Zool. Soc. London*, 129: 263-272.

- Millott, N. 1950. Integumentary pigmentation and the coelomic fluid of *Thyone briareus* (Lesueur). Biol. Bull., 99(2):343-344.
- Millott, N. 1953. Observations in the skin pigment and amoebocytes, and the occurrence of phenolases in the coelomic fluid of *Holothuria Forskali* Delle Chiaje. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 31(3):529-539.
- Millott, N. 1969. Injury and the axial organ of Echinoids. Experientia 25:756-757.
- Montesano, M.A.; Colley, D.G.; Freeman, G.L. e Secor, W.E. 1999. Neonatal exposure to idiotypic induces *Schistosoma mansoni* egg antigenspecific cellular and humoral immune responses. J. Immunol. 163:898-905.
- Moret, Y e Moreau, J. The immune role of the arthropod exoskeleton. ISJ 9: 200-206.
- Mortensen, T. e Kolderup Rosenvinge, L. 1910. Sur quelques plantes parasites dans des echinoderms. Bull. Acad. R. Sci. Let. Danemark, 4: 339-354.
- Motokawa, T. 1983. Mechanical properties and structure of the spinejoint central ligament of the sea-urchin, *Diadema setosum* (Echinodermata, Echinoidea). J. Zool. London, 201: 223-235.
- Müller, W.E.G. e Müller, I.M. 2003. Origin of the Metazoan Immune System: Identification of the Molecules and Their Functions in Sponges. Integr. Comp. Biol., 43:281-292.
- Murphy, K.M., Travers, P. and Walport, M. (2007) Janeway's Immunobiology. Garland Science, New York.
- Mydlarz, L.D.; Holthouse, S.F.; Peters, E.C. e Harvell, C.D. 2008. Cellular Responses in Sea Fan Corals: Granular Amoebocytes React to Pathogen and Climate Stressors. PLoS ONE. 3(3): 1-9.
- Nonaka, M. 2011. The complement C3 protein family in invertebrates. ISJ 8: 21-32.
- Nonaka, M. e Yoshizaki, F. 2004. Primitive complement system of invertebrates. Immunol. Rev., 198:203-215.
- Ota, T.; Sitnikova, T. e Nei, M. 2000. Evolution of Vertebrate Immunoglobulin Variable Gene Segments. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 48:221-245.
- Ottaviani, E.; Franchini, A e Malagoli, D. 2010. Inflammatory Response in Molluscs: Cross-Taxa and Evolutionary Considerations. Curr. Pharmac. Design, 16:4160-4165.
- Ovando, F.; Gimpel, C.; Cardenas, C.; Silva, J.R.M.C.; Lorgeri, J. e Gonzalez, M. 2012. Cloning and Expression Analysis of Allograft Inflammatory Factor Type

- 1 in Coelomocytes of Antarctic Sea Urchin (*Sterechinus neumayeri*). J. Shellfish Res., 31(3):875-883.
- Pal, S. e Wu, L.P. 2009. Lessons from the fly: pattern recognition in *Drosophila melanogaster*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 653: 162–174.
- Palmer, C.V.; Mydlarz, L.D. e Willis, B.L. 2008. Evidence of an inflammatory-like response in non-normally pigmented tissues of two scleractinian corals. Proc. R. Soc. B (2008) 275, 2687–2693.
- Panijel, J.; Leclerc, M.; Redziniack, G. e Labidi, M. E. 1977. In: "Developmental Immunobiology". Solomon, J. B. e Horton, J. D. (eds.). Elsevier. Amsterdam, 91-97 pp.
- Parham, P. 2009. The Immune System. 3° ed. Taylor & Francis, NY, USA. 608p.
- Parker, G.A.; Chubb, J.C. Ball, M.A. e Roberts, G.N. 2003. Evolution of complex life cycles in helminth parasites. Nature 425: 480-484.
- Parrinello, N., Arizza, V., Cammarata, M. e Parrinello, D. M. 1993. Cytotoxic activity of *Ciona intestinalis* (Tunicata) hemocytes: properties of the *in vitro* reaction against erythrocyte targets. Dev. Comp. Immunol., 17:19-27.
- Parrinello, N.; Cammarata, M.; Arrizza, V.; Lipari, L. e Picciurro, A. 1994) *In vitro* cytotoxic activity against erythrocytes by ascidian hemocytes: Target/effector interactions. Dev. Comp. Immunol., 18(Suppl. 1):89.
- Paul, W.E. 2010. Self/Nonself—Immune Recognition and Signaling: A new journal tackles a problem at the center of immunological science. Landes Biosci., 1(1):2-3.
- Pawson, D. L. 2007. Phylum Echinodermata. Zootaxa, 1668: 749–764.
- Pearce, E.J.; Hall, B.F. e Sher, A. 1990. Host-specific evasion of the alternative complement pathway by schistosomes correlates with the presence of a phospholipase C-sensitive surface molecule resembling human decay accelerating factor. J Immunol., 144: 2751–2756.
- Pech, L.L. e Strand, M.R. 1996. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. J. Cell Sci., 109:2053-2060.
- Pilkington, J.B. 1969. The organization of skeletal tissues in the spines of *Echinus esculentus*. J. Mar. Biol. Assoc. UK., 49:857-877.
- Pinsino, A.; Della Torre, C.; Sammarini, V.; Bonaventura, R.; Amato, E. e Matranga V. 2008. Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental

- stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Southern Adriatic Sea, Italy. *Cell. Biol. Toxicol.*, 24(6):541-552.
- Pipe, R. 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.*, 16:111-122.
- Porchet-Henneré, E. ; Dugimont, T. e Fischer, A. 1992. Natural killer cells in a lower invertebrate, *Nereis diversicolor*. *Eur J Cell Biol.*, 58(1):99-107.
- Poulin, R. 2006. Evolutionary ecology of parasites. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 342 pp.
- Poulin, R. e Morand, S. 2000. The Diversity of Parasites. *The Quart. Rev. Biol.*, 75(3):277-293.
- Prendergast, R.A. e Liu, S.H. 1976. Isolation and characterization of sea star factor. *Scand. J. Immunol.*, 5:873-880.
- Presser, V.; Schultheiß, S.; Kohler, C.; Berthold, C.; Nickel, K.G.; Vohrer, A; Finckh, H. e Stegmaier, T. 2011. Lessons from nature for the construction of ceramic cellular materials for superior energy absorption. *Adv. Engin. Mat.* 13(11):1042–1049.
- Prouho, H. 1887. Recherches sur le *Dorocidaris papillata* et quelques autres échinides de la Méditerranée. *Arch. Zool. Exp. et Gén.*, 15: 213-380 pls XIV-XXVI.
- Queiroz, V. 2012. Echinodermata e suas associações com Eulimidae (Mollusca) em duas praias de Salvador – Bahia. Monografia. Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. 78p.
- Queiroz, V. e Sales, L.O. 2013. On the spawning of *Melanella eburnea*. *Strombus*, 29(1-2): 27-29.
- Queiroz, V.; Souza, L.S.; Pimenta, A.D. e Cunha, C.M. 2013. New host records to *Melanella* (Caenogastropoda: Eulimidae) from the Brazilian coast. *Mar. Biod. Rec.*, 6:1-5.
- Queiroz, V.A.; Sales, L.O.; Sampaio, C.L.S.; Neves, E.G. e Johnsson, R. 2011. Gastropoda, Caenogastropoda, Eulimidae, *Annulobalcis aurisflamma* Simone and Martins, 1995: First record to northeastern Brazil. *Check List* (São Paulo. Online), 7:645-647.
- Radomski, M.W.; Martin, J.F. e Moncada, S. 1991. Synthesis of nitric oxide by the hemocytes of the American horseshoe crab (*Limulus polyphemus*). *Phil. Trans. R. Soc. London*, 334:129-133.

- Raftos, D.A. e Briscoe, D. A. 1990. Genetic basis of histocompatibility in the solitary urochordate *Styela plicata*. J. Heredity, 81: 96-100.
- Raftos, D.A. 1994. Allorecognition and humoral immunity in tunicates. An. N.Y. Acad. Sci., 712:227-244.
- Raftos, D.A.; Tait, N.N. e Briscoe, D. A. 1987a. Allograft rejection and alloimmune memory in the solitary urochordate, *Styela plicata*. Dev. Comp. Immunol., 11: 343-351.
- Raftos, D.A.; Cooper, E.L.; Habicht, G.S. e Beck, G. 1991. Invertebrate cytokines: tunicate cell proliferation stimulated by an interleukin 1-like molecule. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 88: 9518-9522.
- Ramírez-Gómez, F. e García-Arrarás, J.E. 2010. Echinoderm immunity. ISJ 7: 211-220.
- Ratcliffe, N.A.; Rowley, A.F.; Fitzgerald, S.E. e Rhodes, C.P. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. Int Rev Cytol, 97: 183-329.
- Reade, P.C. 1968. Phagocytosis in invertebrates. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 46:219-229.
- Ribeiro, J.M.C.; Makoul, G.T.; Levine, J.; Robinson, D.R. e Spielman, A. 1985. Anti-hemostatic, anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of the tick *Ixodes dammini*. J. Exp. Med., 161:332-344.
- Ricciotti, E. e Fitzgerald, G.A. 2011. Prostaglandins and Inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 31: 986-1000.
- Rinkevich, B. 2012. Neglected biological features in cnidarians self-nonself recognition. Adv. Exp. Med. Biol., 738:46-59.
- Rohde, K. 2005. Marine Parasitology. CISRO, National Library of Austrália. 590p.
- Rosales, C. 2011. Phagocytosis, a cellular immune response in insects. ISJ 8: 109-131.
- Rote, N.S. 2012. Adaptive Immunity. In: Evolve Resources for Understanding Pathophysiology. Huether, S.E. e McCance, K.L. (Eds). 5° Ed. 143-165 p.
- Roux, P.P. e Blenis, J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 68(2):320-44.
- Rowley AF. 1981. The blood cells of the sea squirt *Ciona intestinallis*: morphology, differential counts and in vitro phagocytic activity. J. Invert. Pathol., 37:91-100.
- Rowley AF. 1996. The evolution of inflammatory mediators. Med. Inflamm., 5:3-13.

- Sabbadin, A., Zaniolo, G. & Ballarin, L. (1992). Genetic and cytological aspects of histocompatibility in ascidians. *Boll. Zool.*, 59:167-173.
- Sacks, D. e Sher, A. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunol.*, 3(11):1041-1047.
- Salzet, M. 2001. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends. Immunol.*, 22:285-288.
- Sanabria, N.M.; Huang, J. e Dubery, I.A. 2010. Self/nonself perception in plants in innate immunity and defense. *Self Nonself: immune recognition and signaling*, 1(1): 40–54.
- Sandeman, R.M. 1996. Immune responses to mosquitoes and flies. *In*: Wikel, S.K. (ed.). *The Immunology of Host- Ectoparasitic Arthropod Relationships*. Wallingford (UK): CAB International. 175-203 p.
- Saraiva, E.M.; Pimenta, P.F.; Brodin, T.N.; Rowton, E.; Modi, G.B. e Sacks, D.L. 1995. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitol.*, 111: 275–287.
- Sato, S.; Burgess, S.B. e McIlwain, D.L. 1994. Transcription and motoneuron size. *J. Neurochem.*, 63: 1609-1615.
- Sauvé, S. ; Brousseau, P. ;Pellerin, J.; Morin, Y. ; Senécal, L.; Goudreau, P. e Fournier, M. 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquat. Toxicol.*, 58(3-4):189-200.
- Scalise F, Gerli R, Castellucci G, 1992. Lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor in acute toxoplasmosis. *Immunol.*, 76:668–670.
- Scharton-Kersten TM, Sher A. 1997. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. *Curr. Opin. Immunol.*, 9:44–51.
- Schillaci, D. e Arizza, V. 2013. Echinoderm Antimicrobial Peptides to Contrast Human Pathogens. *Nat Prod Chem Res* 1: 109. doi:10.4172/npcr.1000109
- Schinke, H. 1950. Bildung und Ersatz der Zellelemente der Leibeshohlenfliissigkeit von *P. miliaris*. *Zeitschr. Zellforsch. Mikro. Anat.*, 35: 311-331.
- Schluesener HJ1, Seid K, Kretzschmar J, Meyermann R. 1998. Allograft-inflammatory factor-1 in rat experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis, and uveitis: expression by activated macrophages and microglial cells. *Glia*, 24(2):244-51.

- Schmid-Hempel, P. (2011) *Evolutionary Parasitology*. Oxford University Press, New York. 536 pp.
- Schmidt, E.E. e Schibler, U. 1995. Cell size regulation, a mechanism that controls cellular RNA accumulation: consequences on regulation of the ubiquitous transcription factors Oct1 and NF-Y and the liver-enriched transcription factor DBP. *J. Cell. Biol.* 128:467-483.
- Schmit, A.R. e Ratcliffe, N.A. 1977. The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae. *J. Ins. Physiol.*, 23, 175-184.
- Scippa, S., Botte, L. & de Vincentiis, M. (1982). Ultrastructure and X-ray microanalysis of blood cells of *Ascidia malaca*. *Acta Zool. (Stockholm)*, 63: 121-131.
- Sendashonga, C.N. e Black, S.J. 1982. Humoral responses against *Trypanosoma brucei* variable surface antigen are induced by degenerating parasites. *Paras. Immunol.*, 4(4):245-257.
- Service, M. e Wardlaw, A.C. 1984. Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 79B(2):161-165.
- Shetty, S. e Gokul, S. 2012. Keratinization and its Disorders. *Oman Med. J.*, 27(5): 348-357.
- Shimizu, M.; Takaya, Y.; Ohsaki, S. e Kawamata, K. 1995. Gross and histopathological signs of the spotting disease in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Fish. Sci.*, 61: 608- 613
- Sigal, L.J.; Crotty, S.; Andino, R. e Rock, K.L. 1999. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature*, 4: 398(6722):77-80.
- Silva, J.R.M.C. 2013. Immunology in Sea Urchins. In: Lawrence, JM. (ed.). *Sea Urchins: Biology and Ecology*. 3rd edition. Academic Press, San Diego, CA.
- Smith, A.B. 1980. The structure and arrangement of echinoid tubercle. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 289(1033):1-54.
- Smith, A.C e Taylor, R.L. 1975. Immunoglobulins or similar substances in invertebrate body fluids: a preliminary study. *Aquac.*, 6:295-299.
- Smith, C.L. 2012. Innate immune complexity in the purple sea urchin: diversity of the Sp185/333 system. *Front. Immunol.*, 3:1-14.
- Smith, C.L.; Ghosh, J.; Buckley, K.M.; Clow, L.A.; Dheilily, N.M.; Huag, T.; Henson, J.H.; Cheng Man Lun, C.L.; Majeske, A.J.; Matranga, V.; Nair, S.V.; Rast, J.P.;

- Raftos, D.A.; Roth, M.; Sacchi, S.; Schrankel, C.S. e Stensvag, K. 2010. Echinoderm Immunity. In: Söderhäll K, editor. Invertebrate Immunity. Landes Bioscience and Springer Science Business Media. 260-301.
- Smith, C.L.; Rast, J.P.; Brockton, V.; Terwilliger, D.P.; Nair, S.V.; Buckley, K.M. e Majeske, A.J. 2006. The sea urchin immune system. Inver. Surv. J., 3:25-39.
- Smith, L.C. e Davidson, E.H. 1992. The echinoid immune system and the phylogenetic occurrence of immune mechanisms in deuterostomes. Immunol. Today, 13(9): 356-362.
- Smith, L.C. e Davidson, E.H. 1994. The Echinoderm immune system: Characters shared with vertebrate immune systems and characters arising later in deuterostome phylogeny. 213-226. In: Primordial Immunity: foundations for the vertebrate immune system. Anals of the New York Academy of Sciences.
- Smith, V.J. 1981. The Echinoderms. In: Ratcliffe, N.A. e Rowley, A.F., editors. Invertebrate Blood Cells. New York, NY: Academic Press. Pp. 513-562.
- Söderhäll, K. Invertebrate Immunity. Landes Bioscience e Springer Science Business Media. 343p.
- Soehnlein, O. e Lindbon, L. 2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. Nat. Rev. Immunol., 10:427-39
- Stefano GB, Smith EM, Cadet P, Hughes Jr TK. HIV gp120 alteration of DAMA and IL-10t induced chemotactic responses in human and invertebrate immunocytes. J Neuroimmunol1993; 43: 177-184.
- Stuart, L.M. e Ezekowitz, R.A. 2008. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. Nature Rev. Immunol., 8:131-141.
- Su, X., Kamat, S. e Heuer, A. H. 2000. The structure of sea urchin spines, large biogenic single crystals of calcite. J. Mat. Sci., 35:5545-5551.
- Tajima, K.; Hirano, T.; Shimizu, M. e Ezura, Y. 1997. Isolation and pathogenicity of the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. Fish Sci., 63(2):249-252.
- Tajima, K.; Takeuchi, K.; Nakano, K.; Shimizu, M. e Ezura, Y. 1998. Studies on a bacterial disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* occurring at low water temperatures. Fish. Sci., 64:918-920.
- Takahashi, K. 2001. Development and Differentiation of Macrophages and Related Cells: Historical Review and Current Concepts. J. Clin. Exp. Hematopathol., 41(1):1-33.

- Takahashii K. 1967. The ball-and-socket joint of the sea-urchin spine: geometry and its functional implications. J. Fac. Sci. Univ. Tokyo, 4(11):131-135.
- Takeuchi, K.; Tajima, K.; Iqbal, M.M.; Sawabe, T. e Ezura, Y. 1999. Studies on the taxonomy and serology of the causative bacteria of the disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* occurring at low water temperatures. Fisheries Sci. 65:264-268.
- Tam, M.R.; Reddy, A.L.; Karp, R.D. e Hildemann, W.H. 1976. Phylogeny of cellular immunity among vertebrates. p. 98-119. In: Marchalonis, J.J. (ed.). *Comparative Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Taupin, P. 2008. Electron Microscopy of Cell Suspension. Ann. Micr., 8: 19-21.
- Taylor, C.E. e Bang, F.B. 1978. Alteration of blood clotting in *Asterias forbesi* associated with a ciliate infection. Biol. Bull. Mar. biol. Lab., Woods Hole 155: 468-469.
- Taylor, R.L. 1969. A suggested role for the polyphenol-phenoloxidase system in invertebrate immunity. J. Invert. Pathol., 14: 427-428.
- Tiedemann, F. 1816. Anatomie der Rohrenholothurie (*Holothuria tubulosa*), des pomeranzfarbigen Susters (*Astropecten aurantiacus*) und des steinseeigels (*Echinus saxatilis*). Preisschr. Parisen Akad.; Paris, Landshut.
- Van Ginderachter, J.A.; Movahedi, K.; Hassanzadeh Ghassabeh, G.; Meerschaut, S.; Beschin, A.; Raes, G. e De Baetselier, P. 2006. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. Immunobiol., 211(6-8):487-501.
- Vanden Bossche, J. P e Jangoux, M. 1976. Epithelial origin of starfish coelomocytes. Nature, Lond. 261. 227-228.
- Vecchio, K.S.; Zhang, X.; Massie, J.B.; Wang, M. e Kim, C.W. 2007. Conversion of sea urchin spines to Mg-substituted tricalcium phosphate for bone implants. Acta Biomater., 3:785–793.
- Vethamany, V.G. e Fung, M. 1972. The fine structure of coelomocytes of the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis* (Muller O.F.). Can. J. Zool. 50:77-81.
- Vetvicka, V. e Sima, P. 1998. Evolutionary mechanisms of defense reaction. Birkhauser, Berlin. 196p.
- Vincent, N.; Osteras, M. Otten, P. e Leclerc, M. 2014. A new gene in *A. rubens*: A sea star Ig kappa gene. Meta Gene, 2: 320–32.

- Vinnikova, V.V. e Drozdov, A.L. 2011. The Ultrastructure of Spines in Sea Urchins of the Family Strongylocentrotidae. *Biol. Bull.*, 38(9): 861–867.
- Vogel, C.; Teichmann, S.A. e Chothia, C. 2003. The immunoglobulin superfamily in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* and the evolution of complexity. *Development*, 130(25): 6317-6328.
- Waddell, D.R. e Duffy, K.T. 1986. Breakdown of self/non-self recognition in cannibalistic strains of the predatory slime mold, *Dictyostelium caveatum*. *Journal of Cell Biology*, 102: 298–305.
- Waren A. 1983. A generic revision of the family Eulimidae (Gastropoda, Prosobranchia). *J. Moll. Stud. Suppl.*, 13:1-96.
- Webster, M.; Witkin KL. e Cohen-Fix O. 2009. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J. Cell Sci.*, 122(10):1477-1486.
- Whittaker, C.A.; Bergeron, K.; Whittle, J.; Brandhorst, B.P.; Burke, R.D.; Hynes, R.O. 2006. The echinoderm adhesome. *Developmental Biology* 300: 252–266.
- Wikel, S.K. 1999. Modulation of the Host Immune System by Ectoparasitic Arthropods. *BioScience*, 49(4): 311-320.
- Wikel, S.K.; Ramachandra, R.N. e Bergman, D.K. 1996. Arthropod modulation of host immune responses. *In*: Wikel, S.K. (ed.). *The Immunology of Host-Ectoparasitic Arthropod Relationships*. 107-130p.
- Wilson, H.V. 1907. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J. Exp. Zool.* 5, 245-258.
- Wrenn, W.J. 1996. Immune responses to mange mites and chiggers. *In*: Wikel, S.K. (ed.). *The Immunology of Host- Ectoparasitic Arthropod Relationship*. 259-289p.
- Xing, K.; Yang, H.S. e Chen, M.Y. 2008. Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicus*. *Aquat. Biol.* 2:85-92.
- Yang, X. e Cox-Foster, D.L. 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *PNAS*, 102(21): 7470 –7475.
- Yoshida, M. 1959. Naphthoquinone pigments in *Psammechinus miliaris*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.*, 38:455-460.

- Yui, M.A. e Bayne, C.J. 1983. Echinoderm immunology: bacterial clearance by the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole, 165:473-486.
- Zambrano-Villa, S.; Rosales-Borjas, D.; Carrero, J.C. e Ortiz-Ortiz, L. 2002. How protozoan parasites evade the immune response. Trends in Parasitology, 18(6): 272-278.
- Zhang, N. e Bevan, M.J. 2011. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. Immunity 35: 161-168.
- Zhao, X.; Ferdig, M.T.; Li, J. e Christensen, B.M. 1995. Biochemical pathway of melanotic encapsulation of *Brugia malayi* in the mosquito, *Armigeres subalbatus*. Developmental & Comparative Immunology, 19: 205–215.
- Zhou, H.Y.; Shin, E.M.; Guo, L.Y.; Zou, L.B.; Xu, G.H.; Lee, S.H.; Ze, K.R.; Kim, E.K.; Kang, S.S. & Kim, Y.S. 2007. Anti-inflammatory activity of 21 (a,b)-methymelianodiols, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. Eur. J. Pharm., 572:239-248.

Lista de Figuras e Tabelas

Capítulo I

Figura 1 – Diâmetro do núcleo dos esferulócitos de *Eucidaris tribuloides* (exceto o esferulócito irregular). Para cada tipo celular, letras diferentes indicam significância estatística entre os estágios de maturação ($p < 0.05$).

Figura 2 – Diâmetros do núcleo (A); do citoplasma (B) e Razão núcleo/citoplasma - $R_{N/C}$ - (C), da célula vibrátil de *Eucidaris tribuloides*. Letras diferentes indicam significância estatística entre os estágios de preenchimento ($p < 0.05$).

Figura 3 – Fagócito. (A-E) Célula viva em contraste de fase; (F) Célula viva; (G) Célula fixada e não corada; (H-J) Célula corada com Azul de Toluidina, Hematoxilina e Eosina e Tricromo de Mallory respectivamente; (K-N) Microscopia Eletrônica de Transmissão. (K) Célula fagocitando; (L) Detalhe evidenciando algumas organelas e o núcleo; (M) Fagócito com o citoplasma bastante vacuolizado; (N) Fagócito com uma célula vibrátil sendo digerida. Legenda: CV – célula vibrátil; CN – cristal nuclear; ET – esferulócito transparente; EV – esferulócito vermelho; M - mitocôndria; MF – material fagocitado; N = núcleo, Nu – nucléolo; RER – retículo endoplasmático rugoso, Seta – membrana nuclear. Escala: A-J = 10 μm ; K e M = 2 μm ; L = 1 μm ; N = 5 μm .

Figura 4 – Célula progenitora. (A) Célula viva em contraste de fase; (B) Célula fixada e não corada; (C-E) Célula corada com Azul de Toluidina, Hematoxilina e Eosina e Tricromo de Mallory respectivamente; (F) Microscopia Eletrônica de Transmissão Legenda: M - mitocôndria; N = núcleo, RER – retículo endoplasmático rugoso, Seta – membrana nuclear. Escala: A-E = 10 μm ; F = 1 μm .

Figura 5 – Esferulócito vermelho. (A) Célula viva em contraste de fase; (B) Célula fixada e não corada; (C-F) microscopia eletrônica de transmissão. (C) Estágio inicial; (D) Estágio intermediário; (E) Estágio final; (F) Detalhe da célula no estágio final. Legenda: M - mitocôndria; N - núcleo; V - vacúolo vazio; VI - vacúolo inicial, VF - vacúolo final; Setas - vacúolo cheio; Asterisco – pseudópodes. Escalas: A e B = 10 μm ; C e D = 2 μm ; E = 1 μm ; F = 0,5 μm .

Figura 6 – Esferulócito vermelho corado em diferentes estágios do processo de maturação. (A, G e M). Estágio inicial; (B-E, H-K e N-Q) Estágio intermediário; (F, L e R) Estágio final. (A-F) Azul de Toluidina; (G-L) Hematoxilina e Eosina; (M-R) Tricromo de Mallory. Escala = 10 μm .

Figura 7 – Esferulócito transparente. (A) Célula viva; (B) Célula fixada e não corada; (C-F) microscopia eletrônica de transmissão. (C) Visão geral da célula mostrando o núcleo periférico; (D) Esférulas em detalhe; (E) Complexo de Golgi; (F) Diferentes estágios de maturação das vesículas próximas ao Complexo de Golgi. Legenda: G - Complexo de Golgi; M - Mitocôndria;

N - Núcleo; RER – Retículo Endoplasmático Rugoso; 1-3 Maturação das vesículas (esférulas)
Escala: A e B = 10 µm; C = 2 µm; D-F = 0,5 µm.

Figura 8 – Esferulócito transparente corado em diferentes estágios do processo de maturação. (A, E e I) Estágio inicial; (B-C, F-G e J-K) Estágio intermediário; (D, H e L) Estágio final. (A-D) Azul de Toluidina; (E-H) Hematoxilina e Eosina; (I-L) Tricromo de Mallory. Escala = 10 µm.

Figura 9 – Esferulócito granular. (A) Célula viva; (B) Célula fixada e não corada; (C-G) microscopia eletrônica de transmissão. (A e B) Estágio inicial; (C e D) Estágio intermediário; (E) Estágio final. Legenda: N - núcleo; P - poliribossomos; RER – retículo endoplasmático rugoso; V – vacúolo vazio. Escala: A e B = 10 µm; C e E-F = 2 µm; D = 0,5 µm.

Figura 10 – Esferulócito granular corado em diferentes estágios do processo de maturação. (A, D e G) Estágio inicial; (B, E e H) Estágio intermediário; (C, F e I) Estágio final. (A-C) Azul de Toluidina; (D-F) Hematoxilina e Eosina; (G-I) Tricromo de Mallory. Escala = 10 µm.

Figura 11 - Esferulócito irregular. (A) Célula viva; (B) Célula viva em contraste de fase, evidenciado o núcleo; (C) Célula fixada e não corada; (D-F) Célula corada com Azul de Toluidina, Hematoxilina e Eosina e Tricromo de Mallory respectivamente; (G) Microscopia eletrônica de transmissão. Legenda: N - núcleo; V1 – esférula tipo I; V2 - esférula tipo II. Escala: A-F = 10 µm; G = 1 µm.

Figura 12 – Célula vibrátil. (A) Célula viva; (B-F) Célula corada com Hematoxilina e Eosina, Tricromo de Mallory e Azul de Toluidina, respectivamente (G-O) Microscopia eletrônica de transmissão. (G-I) Célula inteira evidenciando o núcleo; (J-L) Esférulas em detalhe; (M e N) Flagelo em vista transversal e longitudinal respectivamente; (O) Região de inserção do flagelo. Legenda: EED - esfera elétron-densa; F - flagelo; M - mitocôndria; N - núcleo; NG – núcleo granular; NGF - núcleo granular em formação; NL - núcleo lobado; V – vacúolo. Escala: A-F = 10 µm G e H = 2 µm; I e J = 1 µm; K, L, N e O = 0,5 µm; M = 0,2 µm.

Tabela I – Sumário dos principais tipos de celomócitos registrados em Echinodermata e suas respectivas funções.

Tabela II – Quadro comparativo dos tipos celulares encontrados no líquido celomático de *Eucidaris tribuloides*. Legenda: AT – Azul de toluidina; HE – Hematoxilina e Heosina; TM – Tricromo de Mallory.

Capítulo II

Figura 1 – *Eucidaris tribuloides* e o parasita *Sabinella troglodytes*. (A e B) Foto de campo de *E. tribuloides* sadio e parasitado, respectivamente; (C-E) Fotos de laboratório de um espinho parasitado. (C) Dois moluscos na galha; (D) Marcas de alimentação; (E) Massas de ovos em diferentes estágios de desenvolvimento no interior da galha. (F-I) Espinhos sadios e parasitados em MEV. (F) Espinho parasitado em visão panorâmica; (G) Região do danificada do espinho, evidenciando uma marca de alimentação; (H) marca de alimentação, mostrando o colar em detalhe; (I) Espinho sadio em visão panorâmica. Escala: C = 1,8 mm; D e I = 1,5 mm; E e G = 500µm; F = 1 mm; H = 50 µm.

Figura 2 – Morfologia do espinho de *Eucidaris tribuloides*. (A) Espinho sadio “velho”; (B) Espinho sadio “novo”; (C) Ornamentação em detalhe; (D) Região basal em detalhe; (E e F) Espinho sadio; (G-I) Espinho sadio em corte transversal (ápice, meio e base respectivamente); (J) Espinho sadio em corte longitudinal mostrando a diferença na organização dos canais da medula e da camada radial; (K e L) articulação do espinho, evidenciando o soquete (K) e a placa interambulacral e seu tubérculo (L). Escalas = A e B = 3 mm; G-I e K = 0,5 mm; D e J = 2 mm; C e L = 1mm.

Figura 3 – Corte transversal do espinho sadio e suas estruturas. (A-C) Ápice: (A) Visão panorâmica; (B) Epiderme em detalhe; (C) Medula em detalhe; (D-F) Meio: (D) Visão panorâmica; (E) Epiderme em detalhe; (F) Medula em detalhe; (G-I) Base: (G) Visão panorâmica; (H) Epiderme em detalhe; (I) Medula em detalhe; (J e K) Esferulócitos transparente (Et) e Granular (Eg); (L-N) Fungos. Escalas: A = Xmm; B = Xmm; C = Xmm; D = Xmm; E = Xmm; F = 1mm; G = 500µm; H = 50 µm; I = Xmm; J = Xmm; K = Xmm; L-N = 40µm.

Figura 4 – Infográfico sobre as densidades de esferulócitos nas diferentes regiões do espinho. (A-C) Espinho Sadio; (D-F) Espinho parasitado. (A e D) Ápice; (B e E) Meio e (C e F) Base.

Figura 5 – Corte transversal do espinho parasitado e suas estruturas. (A-D) Ápice; (E-H) Meio; (I-L) Base. (A, E e I) Visão panorâmica; (B, F e J) Epiderme do lado danificado; (C, G e K) Epiderme do lado oposto ao dano; (D, H e L) Medula; (M-P) Local da galha com sequência de maturação do esferulócito granular; (Q-R) Local de alimentação do gastrópode (colar); (S) Esferulócito granular degranulando próximo à aglomerados de fungo. Escalas: A, E e I = 300 µm; B-D, F-H, J, K, R e S = 40 µm; L e Q = 100 µm; M = 600 µm; N-P = 20 µm. Legenda: Círculo branco = concentração de esferulócitos na medula; 1 = Estágio inicial; 2 = Estágio intermediário; 3 = Estágio final; Seta branca = colar.

Figura 6 – Microscopia eletrônica de varredura da seção transversal do espinho sadio e parasitado de *Eucidaris tribuloides*. (A e B) Visão geral do ápice do espinho sadio e parasitado, evidenciando as diferentes regiões. (C-E) Espinho sadio: (C) Ápice; (D) Meio; (E) Base. (F-H) Espinho parasitado: (F) Ápice; (G) Meio; (H) Base. Escalas: A, C-H = 200 µm; B = 500 µm.

Legenda: C = Córtex; CRE = Camada radial externa; CRI = Camada radial interna; M = medula.

Figura 7 – Diâmetro dos poros do canal radial do espinho de *Eucidaris tribuloides*. Letras indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre regiões diferentes do espinho (ápice, meio e base). Barras horizontais indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre porções (interno ou externo) do espinho sadio e parasitado. Legenda: = CRE – camada radial externa; CRI – camada radial interna; Par – espinho parasitado; Sad – espinho sadio.

Figura 8 – Diâmetro dos canais presente na medula do espinho de *Eucidaris tribuloides*. Letras indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre regiões diferentes do espinho (ápice, meio e base). Barras indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre espinhos diferentes (sadio e parasitado). Legenda = Sa – Diferença significativa no espinho sadio; Pa – diferença significativa no espinho parasitado.

Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura da base do espinho (A-F) e da placa interambulacral (G-L). (A) Parte basal do espinho em vista panorâmica; (B) Parte basal em seção longitudinal evidenciando o padrão de organização do estereoma; (C) Soquete em corte longitudinal; (D) Soquete em visão panorâmica; (E-F) Padrão de perfuração da periferia (E) e da região central do soquete (F); (G) Placa interambulacral em vista aboral; (H) Tubérculo em detalhe; (I) Fundo do tubérculo; (J-L) Placa da carapaça em seção longitudinal evidenciando o padrão de perfuração. Escala: A, B e J = 500 μm ; C, F, H e K = 200 μm ; D e G = 1 mm; I = 50 μm ; L = 100 μm . Legendas: A = anel; Ba = base; Col = colar.

Figura 10 – Microtomografia computadorizada de espinhos sadio, parasitado e da placa da carapaça de *Eucidaris tribuloides*. (A-G) Espinho sadio; (A) Raio-X do espinho sadio, evidenciando um eixo central mais denso; (B-F) Gradiente de densidade do espinho sadio; (H-L) Gradiente de densidade do espinho parasitado; (M) Base do espinho, evidenciando o soquete com maior densidade; (N-O) Placa da carapaça em vista aboral, evidenciando o tubérculo (N) e em vista oral (O). Escalas: A-F = 5 mm; G = 10 mm; H-L, N e O = 3 mm; M = 1,5 mm.

Figura 11 – Porcentagem dos tipos celulares encontrados na cavidade celomática de *Eucidaris tribuloides*.

Tabela I – Porcentagem de celomócitos encontrados no líquido celomático de *Eucidaris tribuloides*.

Figura 12 – Nível de expressão das proteínas AIF e pp38 - MAPK no intestino de indivíduos sadios e parasitados da espécie *Eucidaris tribuloides*.

μ CT – Microtomografia computadorizada
AIF-1 – Fator inflamatório de enxerto - 1
CRE – Camada radial externa
CRI – Camada radial interna
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EG – Esferulócito granular;
ET – Esferulócito transparente
HEPES – Ácido Hidroxietil-piperazineetasulfônico
IL-1 α – Interleucina-1 alfa
IL-1 β – Interleucina-1 beta
LABIMAR – Laboratório de invertebrados marinhos
LLC – Células similares a linfócitos
M – Medula
MAMP – Padrões moleculares associados a patógenos
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MHC – Complexo maior de histocompatibilidade
NIH – Instituto Nacional de Saúde
PBS – Tampão fosfato-salino
pp38-MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno
proPO – Sistema profenoloxidase
R_{N/C} – Razão núcleo/citoplasma
TBM – Tetrametilbenzidina
TBS – Tampão salino TRIS
TNF – Fator de necrose tumoral
U.a – Unidade de área