**Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento de Fisiologia Geral**

Patrícia Lacouth da Silva

**Efeitos das mudanças climáticas na regulação de
biomarcadores em *Echinaster brasiliensis*
(Echinodermata: Asteroidea)**

Effects of climate changes on biomarkers regulation in *Echinaster
brasiliensis* (Echinodermata: Asteroidea)

São Paulo

2015

Patrícia Lacouth da Silva

**Efeitos das mudanças climáticas na regulação de
biomarcadores em *Echinaster brasiliensis*
(Echinodermata: Asteroidea)**

Effects of climate changes on biomarkers regulation in *Echinaster
brasiliensis* (Echinodermata: Asteroidea)

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

Orientador:

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

São Paulo

2015

Lacouth, Patrícia

Efeitos das mudanças climáticas na
regulação de biomarcadores em *Echinaster*
brasiliensis (Echinodermata: Asteroidea)
85 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Fisiologia.

1. Acidificação 2. Biomarcadores
moleculares 3. Temperatura. Universidade de
São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio
Orientador

*Foi assim que, bem devagar,
O País das Maravilhas foi urdido
Um episódio vindo a outro se ligar
E agora a história está pronta
Desvie o barco, comandante! Para casa!
O sol declina, já vai se retirar.*

(Lewis Carrol – Alice no País das Maravilhas)

Agradecimentos

À Capes pelo apoio financeiro.

À Universidade de São Paulo e Instituto de Biociências pela infraestrutura disponibilizada.

Ao CEBIMar/USP pelo apoio técnico nas coletas e infraestrutura disponibilizada.

Ao Prof Dr. Márcio Reis Custódio pela confiança, orientação, bom humor, paciência e sabedoria que compartilhou comigo ao longo de toda a minha pós-graduação.

Ao Dr. Enrique Rozas, pelo auxílio, mesmo que distante, e que foi fundamental para a realização do projeto.

Aos funcionários da USP, Instituto de Biociências e do Departamento de Fisiologia Geral.

Aos meus pais e irmão, pelo amor, incentivo e apoio incondicionais, que mesmo com toda a distância estiveram presente em pensamento e de coração em todos os momentos.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório por todos os momentos pessoais e profissionais compartilhados.

Agradeço a muitas pessoas, que não cabem em poucas linhas mas que foram importantes durante todos estes anos de diversas maneiras, tanto pessoalmente como profissionalmente, para que eu trilhasse e chegasse ao fim de mais uma etapa com muitos aprendizados. Algumas passaram e se foram, outras ficaram, mas a todas sou grata de coração.

Muito Obrigada!

Sumário

I.	Resumo	5
II.	Abstract	6
III.	Introdução.....	7
IV.	Objetivos.....	24
V.	Materiais e Métodos.....	25
VI.	Resultados	35
VII.	Discussão	57
VIII.	Conclusões.....	73
IX.	Referências.....	75

Resumo

Diante do quadro atual de previsões de mudanças climáticas, estudos a respeito das possíveis respostas dos organismos a estas alterações são importantes. Com a finalidade de prever e verificar se estas serão de fato deletérias ou se os organismos são capazes de lidar com elas sem alterações na sua fisiologia, e consequentemente na estrutura do ambiente, *E. brasiliensis* foi utilizada como modelo para estudar possíveis impactos do aumento da temperatura e acidificação dos oceanos na sua fisiologia. Para isso, espécimes foram expostos a 9 possíveis combinações de temperatura (24°C, 28°C e 30°C) e pH (8.0, 7.7 e 7.3) em diferentes intervalos de tempo (1, 3, 12, 24 e 48 h). Amostras de gônadas e fluido celomático foram coletadas para avaliar a expressão das proteínas de estresse HSP70, AIF-1 e p38-MAPK, e a variação no número e viabilidade dos celomócitos. Nossos resultados mostram que o modelo é sensibilizado pelas mudanças no ambiente, através da hiper-regulação das proteínas de estresse. O cenário considerado mais extremo (30°C + pH7.3) ocasionou a morte de 100% dos organismos após 24 horas. E o segundo cenário mais severo (30°C + pH7.7) desencadeou o desenvolvimento de ulceração de pele. Os efeitos são mais pronunciados nos celomócitos e a acidificação da água parece ter efeitos antagônicos com a temperatura nos celomócitos e sinérgicos nas gônadas. Embora a resposta tenha sido sistêmica, o grau e a dinâmica foram distintos em relação às diferentes amostras e estresses. Podendo causar modificações na resposta imune dos organismos e consequentemente na sobrevivência da espécie a longo prazo.

Palavras-Chaves: Acidificação; Temperatura; HSP70, AIF-1, p38-MAPK; Celomócitos; Gônadas.

Abstract

Under the current Climate Change context, studies about the potential responses of the organisms to their changing environment are of extreme importance. Recent studies point out the synergy of temperature and ocean acidification altogether. In this study, we used the sea star *E. brasiliensis* to assess the physiological effects of rising temperature, seawater acidification and the interaction of both factors. Independent individuals (N=225) were exposed to 9 possible combinations of temperature (24°C, 28°C and 30°C) and pH (8.0, 7.7 and 7.3), for 1, 3, 12, 24 and 48 h. We compared the stress produced by these treatments measuring the expression of heat shock proteins (HSP70), the production of the allograft inflammatory factor (AIF-1) and the activation of mitogen kinases (MAPKs) at both gonad and celomic fluid. Furthermore, we assessed the quantity and quality of coelomocytes. Our results demonstrated that *E. brasiliensis* is vulnerable to the interaction of temperature and acidification. All the stress proteins evaluated were upregulated. The extreme scenario (30°C + pH7.3) caused the death of 100% of organisms after 24 hours, while the second most severe scenario (30°C + pH7.7) triggered skin ulceration. Nevertheless, we found that water acidification produces antagonistic effects to the temperature in coelomocytes and synergistic effects in gonad cells. Furthermore, these effects were more pronounced in the coelomocytes than in the gonads. The systemic response found in this study suggest that the interactive effects of elevated temperatures in conjunction with ocean acidification may endanger the survival of this species, and it could compromise the ecosystem functioning at long term.

Key-Words: Ocean acidification; Ocean warming; HSP70, AIF-1; p38-MAPK; Coelomocytes; Gonads..

Introdução

A Terra passa por ciclos naturais de mudanças no clima como, por exemplo, as mudanças sazonais (estações do ano), anuais (El-niño), decadais (oscilações do Pacífico e Atlântico norte) e até milenares (eras glaciais e interglaciais). Todas essas mudanças são e foram importantes para a definição de padrões biogeográficos bem como nas adaptações evolutivas dos seres vivos. No entanto, as atividades antrópicas têm acelerado e alterado esses padrões naturais.

A revolução industrial, o uso de combustíveis fósseis e as mudanças na utilização da superfície terrestre são os grandes marcos da ação do homem na modificação da composição atmosférica, principalmente com a emissão dos gases do efeito estufa (GEE). Aproximadamente 78% dos gases emitidos são provenientes da queima de combustíveis fósseis e processos industriais. A concentração de CO₂ na atmosfera aumentou de 280 partes por milhão (ppm), na era pré-industrial (1760), para 385 ppm nos dias atuais, e há projeções de que este aumento continue e atinja entre 700 e 1000 ppm no fim do século XXI. Cerca de metade da emissão de gases entre 1760 e 2011 ocorreu nos últimos 40 anos (Caldeira & Wickett 2003; IPCC 2014) e continuam crescendo, mesmo com as políticas de mitigação adotadas recentemente.

Esta mudança na composição atmosférica provocou a desregulação de um fenômeno natural e fundamental para a sobrevivência na terra que é o efeito estufa. Têm sido observadas mudanças no ambiente desde 1950, tais como alterações dos índices de precipitação, derretimento das geleiras e consequentes alterações nos sistemas hidrológicos, mudanças na qualidade e quantidade de recursos aquáticos, alterações no alcance geográfico, atividades sazonais, padrões migratórios, abundância e modificação das interações ecológicas, tanto em espécie terrestres, quanto aquáticas (IPCC, 2014).

Os oceanos cobrem cerca de 71% da superfície terrestre, sendo fundamentais nos ciclos biogeoquímicos, na manutenção do clima, abrigam grande biodiversidade e

são importantes para a subsistência da humanidade. Ambientes marinhos costeiros são de extrema importância para o planeta tanto ecologicamente como economicamente. Estima-se que habitats marinhos, desde a zona entre-marés até as grandes profundidades, gerem trilhões de dólares em produtos, como comida e matéria prima, e serviços, como ciclagem de nutrientes (Harley et al., 2006).

Uma série de padrões tem sido alterada nos oceanos em decorrência das mudanças climáticas: (1) O aumento das concentrações do CO₂ tem alterado a biogeoquímica dos oceanos (Haugan e Drange, 1996); (2) O aumento da temperatura da água prejudica processos fisiológicos e padrões de distribuição (Osovitz e Hofmann, 2007); (3) A intensificação dos ventos, tempestades e ondas tem alterado a salinidade, turbidez, aporte de nutrientes e poluentes de origem terrestre e provocam distúrbios hidrodinâmicos que influenciam ambientes sensíveis, como as zonas costeiras (Gardner et al., 2005). A mudança dos ventos também pode modificar a ressurgência de nutrientes e sedimento e os padrões de dispersão e recrutamento de larvas; (4) O volume dos oceanos tem expandido devido à entrada de água doce proveniente do derretimento das geleiras e pela própria expansão térmica. Tem ocorrido o aumento dos níveis do mar de cerca de 2mm por ano, o que também causa o deslocamento na distribuição de espécies. Estima-se que as zonas entre-marés sejam reduzidas entre 20 e 70% nos próximos 90 anos (IPCC 2014); e (6) a alteração das taxas de produção primária, que tem sido influenciado pelo aumento da temperatura, da radiação UV e da turbidez da água. Embora o aumento da temperatura e da disponibilidade de CO₂ possa influenciar positivamente a produção primária das macroalgas, o aumento da temperatura, em alguns casos, aumenta a taxa de consumo dessas algas por invertebrados (Lotze e Worm, 2002).

Aquecimento dos Oceanos

Está previsto para o final no século 21 um aumento entre 1,8 e 4°C na temperatura média atmosférica, dependente dos cenários de emissão de gases (IPCC 2014). Uma das consequências do aumento da retenção de calor na atmosfera é o aquecimento dos oceanos, que retém aproximadamente 90% da energia dos sistemas climáticos. A temperatura de regiões mais rasas são as que primeiro são alteradas. Observou-se que profundidades de até 75 metros tiveram aumento de aproximadamente 0,1°C por década entre 1971 e 2010 (IPCC, 2014). Neste início do século 21 os oceanos continuaram esta tendência, com os maiores aumentos previstos para a superfície das regiões tropicais, subtropicais e hemisfério norte. Mesmo que as emissões dos gases do efeito estufa fossem totalmente suspensas, os oceanos ainda permaneceriam aquecendo por décadas.

A temperatura é um fator abiótico importante para organismos ectotérmicos devido aos seus efeitos diretos em todos os processos biológicos. Pode influenciar desde escalas moleculares até fisiológicas e comportamentais, definindo padrões de distribuição e história evolutiva ao longo das mudanças ambientais (Pörtner, 2005). Entre os efeitos diretos do aquecimento do ambiente estão: alteração da performance dos organismos em relação ao crescimento, reprodução, forrageamento, imunocompetência, comportamento e competitividade (Brockington e Clarke, 2001; Pörtner, 2008; Pörtner et al., 2015).

A maioria dos organismos marinhos vive na sua tolerância térmica máxima, ou *pejus* (Harley et al., 2006; Somero, 2012). Por isso, pequenos aumentos podem impactar negativamente a performance e sobrevivência. Existe uma série de estudos que já relatam diferentes complicações ocasionadas pelo aumento da temperatura da água. O mais conhecido é o branqueamento dos corais. Cnidários recifais, que vivem na sua temperatura *pejus*, tem perdido seus simbiontes e tem morrido com este aumento (Doney et al., 2012)

Os efeitos podem variar de acordo com o habitat da espécie estudada. Por exemplo, Dong et al., 2008 ao compararem duas espécies congêneres de caranguejos que habitam nichos distintos observaram que estas respondem diferentemente ao estresse térmico. A espécie de mesolitoral é mais termotolerante do que a segunda espécie, que vive no infralitoral. Isto supostamente porque organismos que ocupam a região do mesolitoral vivem constantemente na sua temperatura limite, o que favoreceria a habilidade de ajustar sua fisiologia.

A temperatura também influencia o *timing* reprodutivo. Por exemplo, bivalves do nordeste europeu tem desovado precocemente e dessincronizado com o *bloom* de fitoplâncton, ocasionando um desencontro entre produção larval e disponibilidade de alimento (Philippart et al., 2003). O aquecimento também pode provocar problemas a nível de comunidade, como através do aumento do forrageamento e metabolismo da estrela do mar *Pisaster ochraceus*, um predador-chave, que pode levar a progressiva diminuição de bancos de algas e consequentemente de centenas de espécies dependentes destas algas (Sanford, 1999) Além desses exemplos, o estresse térmico altera a modulação da resposta imune em muitas espécies (Coteur et al., 2004; Ellis et al., 2011), e desta forma o estados de saúde dos animais. Por este motivo, o aquecimento dos oceanos pode ter aumentado a ocorrência de doenças marinhas, pois temperaturas mais quentes tornam os hospedeiros mais vulneráveis e favorecem o crescimento de patógenos (Bates et al., 2009; Harvell et al., 2002).

Acidificação dos Oceanos

Devido a grande área ocupada pelos oceanos e sua participação em diferentes processos biogeoquímicos, o ambiente marinho tem sido um reservatório para o excesso de CO₂ atmosférico. Durante os últimos 200 anos os oceanos absorveram cerca de metade do CO₂ emitido pela queima de combustíveis fósseis e atividades industriais (Royal Society 2005), mostrando o quanto são importantes na ciclagem natural do carbono.

O dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera é um gás quimicamente inerte, mas quando dissolvido na água do mar se torna mais reativo e participa de uma série de processos químicos. Um dos efeitos da dissolução do CO_2 na água do mar é o aumento da concentração de íons hidrogênio que consequentemente alteram o pH. Essa liberação de íons H^+ é resultado da reação inicial do CO_2 com a água, que forma ácido carbônico (H_2CO_3), um ácido fraco que rapidamente libera mais íons H^+ e forma bicarbonato (HCO_3^-). A água do mar é naturalmente saturada com outra base, o íon carbonato (CO_3^{2-}), que pode reagir com os íons H^+ formando mais bicarbonato (Figura 1). Íons carbonato participam da formação de carbonato de cálcio e seu cristal aragonita, elementos essenciais nos processos de calcificação e o desvio dessa reação diminui a quantidade de carbonato livre.

Figura 1 – Esquema do processo químico de acidificação do oceano. Modificado de National Academy of Science 2013.

O aumento da disponibilidade de CO_2 já ocasionou um declínio de 0,1 unidades de pH nos oceanos. Este valor é aparentemente baixo, mas dada a escala logarítmica do parâmetro isso corresponde ao aumento de 30% na quantidade de íons hidrogênio livres na água. Caso as emissões de gases do efeito estufa continuem na mesma intensidade, é previsto para os próximos 100 anos a diminuição de 0,3 a 0,4 unidades

de pH (Orr et al., 2005). Mesmo se o quadro atual de emissões for revertido, os oceanos podem levar dezenas de milhares de anos para que a sua química retorne aos níveis pré-industriais (Royal Society 2005).

Até pouco tempo a acidificação dos oceanos era considerado um efeito adicional das mudanças climáticas, não sendo considerados os seus sérios impactos. Enquanto que o aumento da quantidade de CO₂ atmosférico é esperado com impactos positivos em muitas plantas terrestres, devido ao aumento da fotossíntese (IPCC 2014), muitos organismos marinhos já estão saturados de carbono e efeitos positivos não são esperados (Doney et al., 2012; Harley et al., 2006).

O aumento da disponibilidade de CO₂ nos oceanos afeta uma série de processos e organismos, tanto nos não calcificantes como nos calcificantes (e.g. esponjas calcáreas, foraminíferos, moluscos, corais, equinodermos e crustáceos). A diminuição da disponibilidade de carbonato diminui a taxa de calcificação dos organismos e tende a aumentar a solubilização do carbonato de cálcio, causando a corrosão das estruturas e deixando-os mais vulneráveis. Estudos indicam que em 2050 as taxas de corrosão irão ultrapassar as taxas de calcificação (Orr et al., 2005). A redução da calcificação pode ter sérios impactos negativos nos ecossistemas marinhos, afetando as teias alimentares, disponibilidade de recursos alimentares comercialmente importantes (mexilhões, ostras e ouriços do mar) bem como proteção da costa contra tempestades (Doney et al., 2009).

Além de influenciar na calcificação, a acidificação dos oceanos também impacta outros aspectos da fisiologia. A acidose dos tecidos e fluidos corporais diminui a capacidade do transporte de gases e o uso da energia celular (Pörtner, 2005, 2008). Também reduz as taxas de síntese protéica, o que afetará quase todos os aspectos do funcionamento como crescimento e reprodução (Langenbuch e Pörtner, 2002, 2003). Em uma série de animais calcificantes como equinodermos, bivalves, corais e crustáceos, tem mostrado efeitos negativos na fertilização, clivagem, desenvolvimento e assentamento larval e estágios reprodutivos (Kurihara, 2008).

Estresse fisiológico

Estresse é definido como uma condição que modifica o funcionamento normal de um sistema biológico ou que diminui o *fitness* e consequentemente as populações futuras, e pode ser tanto de fundamento ambiental como genético (Romero, 2004; Somero, 2012).

Compreender os mecanismos pelos quais a variação ambiental impacta os organismos na natureza é de grande interesse para biólogos e ecologistas comparativos. O termo estresse fisiológico está relacionado a estímulos nocivos aos quais os organismos podem ser expostos, como o aumento da temperatura, acidificação da água, poluição por despejo de esgoto e hidrocarbonetos, mudanças na salinidade e na disponibilidade de oxigênio (Romero, 2004). Estes estímulos não previstos e deletérios desencadeiam uma série de respostas emergenciais que podem ser fisiológicas e/ou comportamentais. Desta forma, a correlação entre a resposta emergencial e as respostas normais do organismo é uma medida que pode ser utilizada como biomarcador. Isto reflete a maneira com que os efeitos do estresse nos mecanismos fisiológicos são traduzidos para processos como sobrevivência, crescimento e reprodução (Helmuth, 2009).

Em relação às mudanças climáticas, informações fisiológicas sobre espécies-chave ou membros principais de cadeias alimentares estão sendo exploradas e são importantes para avaliar a resiliência dos organismos. Devido aos resultados das atividades antropogênicas, como aquecimento global, poluição e desmatamento, mudanças ambientais podem ser muito mais drásticas e imprevisíveis no futuro.

Quando os organismos se encontram em situações estressantes, podem lidar com essas condições de diferentes maneiras. Segundo (Hofmann e Hercus, 2000), isto é feito de três formas principais: evitando o estresse através de migração ou processos fisiológicos gerando plasticidade fenotípica; ajustando a população através da seleção dos organismos mais adaptados às novas condições; ou não ser apto a

lidar com o estresse de maneira adequada, sendo por isso sendo eventualmente levado a extinção.

O ponto principal para prever mudanças esperadas nas comunidades animais é entender a vulnerabilidade das espécies a um ambiente em modificação (Hofmann e Todgham, 2010). No entanto, alguns trabalhos têm mostrado que nem todas mudanças ambientais possuem efeito negativo direto em todos organismos. Foi observado que cefalópodes (*Sepia officinalis*) e holotúrias (*Apostichopus badionotus*) têm mantido suas taxas metabólicas e de crescimento enquanto que bivalves (*Crassostrea gigas*) e estrelas do mar (*Pisaster ochraceus*) têm aumentado o crescimento e fertilização (Dong et al., 2008a; Gooding et al., 2009; Gutowska et al., 2008; Parker et al., 2010). Sendo assim, tem sido sugerido que as previsões das repostas bióticas às mudanças climáticas devem considerar como os diferentes grupos irão responder às diversas variáveis (Gooding et al., 2009)

Os equinodermos

De acordo com Bonaventura et al. 2011, estudos de monitoramento ambiental dependem da escolha de organismos-modelo apropriados, e estes devem atender uma série de condições tais como: abundância, disponibilidade no ambiente marinho, relevância ecológica e facilidade de manutenção em laboratório.

Os equinodermos caracterizam-se por uma grande diversidade morfológica entre os seus representantes. São organismos exclusivamente marinhos, distribuídos em todos os mares e oceanos, desde a zona entre-marés até grandes profundidades. No mundo existem cerca de 13.000 espécies fósseis e 7.000 atuais (Pawson, 2007), das quais mais de 300 são registradas no Brasil. O filo é atualmente dividido em cinco classes: Crinoidea (lírios-do-mar), Ophiuroidea (serpentes-do-mar), Echinoidea (ouriços e bolachas-do-mar), Holothuroidea (pepinos-do-mar) e Concentricycloidea, uma classe recém descoberta. Nos ambientes tropicais rasos, são um dos invertebrados mais abundantes e diversos e em zonas abissais chegam a constituir

até 90% da biomassa (Hendler et al., 1995). Ocorrem em substratos consolidados ou não, e até mesmo em epibiose com outros animais e plantas (Hyman 1955, Hendler et al., 1995). Constituem um dos grupos de maior importância na estrutura das comunidades bênticas marinhas, onde ocupam diversos níveis tróficos (Ventura et al., 2006). Devido a sua abundância e sua posição na cadeia alimentar são considerados organismos-chave em muitos ecossistemas (Saier, 2001). Portanto, alterações populacionais neste grupo podem afetar toda a comunidade, assim como colocar em risco o equilíbrio do ambiente em que vivem (Coteur et al., 2003).

Equinodermos também são explorados economicamente pela população, principalmente em países asiáticos. Pepinos do mar são considerados um alimento importante nas Filipinas, Malásia, Japão, Coreia e China (Himaya et al., 2010). Também são usados na medicina tradicional no leste asiático para o tratamento de asma, hipertensão e anemia (Fredalina et al., 1999; Himaya et al., 2010; Zhong et al., 2007). Há informações de que regiões da América Central e do Sul têm apresentado sobrepesca de alguns representantes do filo com fins de exportação para estas regiões (Anderson et al., 2011). Em outras áreas, estrelas e ouriços do mar são geralmente pescados também para uso em aquários ornamentais ou como objetos decorativos (Chinnachamy et al., 2003). Para estes fins, o cultivo e manutenção em laboratório de algumas classes de equinodermos vêm sendo estabelecidos ao longo dos anos (Anderson et al 2011). Dada a sua importância comercial e ecológica e considerando a sua abundância no ambiente marinho, este filo tem emergido como um potencial modelo sentinela apto a perceber perigos ambientais.

Em vista da abundância, importância ecológica e por possuírem um esqueleto composto por calcita, vários estudos têm sido realizados a fim de avaliar os efeitos da acidificação dos oceanos neste grupo (Dupont e Thorndyke, 2012; Ross et al., 2011; Wood et al., 2008). Os efeitos da acidificação da água variam entre as diversas espécies de equinodermos em diferentes processos, estágios de vida e tempo. Já foi observado um declínio da taxa de fertilização e clivagens nas larvas (Kurihara, 2008) e

a redução da taxa de crescimento em adultos (Shirayama e Thornton, 2005). Larvas de ofiuróides tiveram 100% de mortalidade com a diminuição de 0.2 unidades de pH (Dupont e Thorndyke, 2006). Por outro lado, outra espécie de ofiuróide (*Amphiura filiformis*) teve suas taxas de crescimento e calcificação elevadas pela acidificação, porém associadas com a perda de massa muscular (Wood et al., 2008). Os resultados destes estudos mostram que a acidificação dos oceanos tem impactos negativos neste filo, com possíveis consequências para todo o ecossistema. Porém, ainda há necessidade de avaliar estes impactos nas diferentes classes bem como em espécies que habitam regiões contrastantes.

O mesmo se aplica aos efeitos do aquecimento. Equinodermos são organismos ectotérmicos, com uma ampla distribuição latitudinal e de profundidade. Por isso, a localidade onde são encontrados define as suas capacidades de lidar com determinada faixa de temperatura. Por exemplo, organismos encontrados na zona entre-marés estão mais adaptados a variações diárias deste parâmetro do que os que são encontrados em ambientes mais profundos (Dong et al., 2011). Trabalhos feitos com diferentes grupos mostraram que grandes variações na temperatura podem afetar a fertilização, o desenvolvimento inicial de larvas, a metamorfose e a gametogênese (Byrne e Przeslawski, 2013; Chen e Chen, 1992; Kelly, 2001; Roller e Stickle, 1993; Shpigel et al., 2004).

Adicionalmente, as alterações dos parâmetros ambientais parecem ser também as responsáveis por desencadear o aparecimento de doenças, provavelmente devido ao aumento da susceptibilidade dos organismos em condições estressantes (Harvell et al., 2002).

Biomarcadores

O primeiro passo que determina a capacidade de uma espécie de lidar com as alterações no seu ambiente é a codificação de proteínas e elementos regulatórios necessários para o reparo de danos celulares ocasionados por estresse (Somero,

2012). Para detectar o impacto que alterações no ambiente podem causar têm sido utilizadas como marcadores diversas proteínas cuja expressão é alterada de acordo com o estresse fisiológico do organismo.

Entre alguns dos biomarcadores moleculares estão a *Heat Shock Protein 70* (HSP70), a *phosphorylated p38 Mitogen-Activated Protein Kinase* (pp38-MAPK) e o *Allograft Inflammatory Factor-1* (AIF-1) (Li et al., 2013; Pyza et al., 1997; Zilberberg et al., 2011). Estes marcadores estão presentes desde bactérias até mamíferos e são evolutivamente bastante conservados (Kregel, 2002), o que permite sua detecção por imunoensaios simples (ELISA) usando anticorpos disponíveis comercialmente para grupos mais derivados. Uma vantagem importante da utilização destes biomarcadores moleculares para detecção de mudanças no ambiente é que os efeitos do estresse podem ser detectados mais cedo em comparação com a avaliação de parâmetros obtidos *a posteriori*, como taxas de crescimento, mortalidade e fertilidade (Sørensen et al., 2003).

HSP70

As *Heat shock proteins* (HSP) são chaperonas moleculares, podendo ser constitutivas (HSC) ou sintetizadas durante respostas a fatores de estresse. Estão envolvidas no transporte, dobramento e desdobramento, montagem e desmontagem de proteínas e também na degradação daquelas dobradas erroneamente ou agregadas (Sørensen et al., 2003). Estas funções são fundamentais em condições celulares normais. As populações naturais estão constantemente expostas a variações ambientais e genéticas e as HSPs têm como função suavizar os efeitos da variação ambiental, sendo importantes na manutenção da homeostase (Mayer e Bukau, 2005; Morris et al., 2013) no entanto, o uso destas chaperonas pode ser intensificado no caso de condições estressantes que possam potencialmente causar danos celulares e moleculares nas estruturas da célula.

Os genes que codificam as HSPs foram primeiramente descobertos em *Drosophila* expostas a altas temperaturas (Ritossa, 1962). E logo em seguida foram associadas à síntese e manutenção de proteínas (Tissières et al., 1974). Os genes das HSPs são altamente conservados evolutivamente e apresentam pouca variação entre as espécies (Kregel, 2002; Sørensen et al., 2003). A sua baixa variabilidade e ubiquidade mostra sua importância evolutiva e um papel de proteção às células durante ou depois ao estresse (Feder & Hofmann, 1999).

Diferentes famílias de HSPs já foram identificadas e classificadas de acordo com o seu peso molecular em kDa. As principais são HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e HSPs menores que 30kDa. No entanto, em muitos organismos a HSP70 é considerada a família principal, consistindo de proteínas induzidas (HSP) e constitutivas (HSC) (Kregel, 2002). Estão presentes no citoplasma, mitocôndrias, retículo endoplasmático e núcleo, sendo sua localização dependente do tipo de proteína.

A regulação das HSPs ocorre através da expressão de genes induzíveis, ou seja, genes expressos sob influência de um estressor ou substância. A expressão das HSPs envolve uma ativação transcricional mediada por um fator de transcrição específico, o HSF (*Heat Shock Factor*). Células em condições normais possuem HSF no citoplasma e no núcleo em uma forma monomérica, que não se liga ao DNA. Em resposta ao choque térmico e outros estresses fisiológicos, HSF é fosforilado por proteínas quinases e formam trimeros que se acumulam dentro do núcleo. Estes se ligam a HSE (*Heat shock elements*), uma sequência específica de genes que desencadeará a transcrição do mRNA da HSP70. Os mRNA se deslocam então para o citosol e promovem a síntese de novas HSP70, que irão se acoplar às proteínas que sofreram danos. O aumento da quantidade de proteínas danificadas também induz a ativação dos HSF (Morimoto, 1993).

Desde a descoberta da HSP70 uma série de pesquisas têm utilizado a taxa de expressão dessa proteína como marcador de estresse. Sua hiper-regulação indica a

presença de proteínas com sua conformação nativa e funcional alterada, independentemente da causa. Sendo assim, é sugerida como um bom biomarcador universal ao estresse, por ser quantificável, ubíqua, sub-letal e de interpretação confiável (Pyza et al., 2000; Sørensen et al., 2003). Adicionalmente, a indução da sua expressão é muito mais sensível ao estresse do que outros biomarcadores mais tradicionais, tais como taxas de crescimento, doses letais e taxas de fertilidade (Sørensen et al. 2003).

As HSPs têm sido consideradas ecologicamente importantes, pois além de desempenharem um papel importante na resposta a uma variedade de condições estressantes são fundamentais na recuperação e sobrevivência dos organismos. Já foi demonstrado que além da resposta ao aquecimento, as HSPs podem ser induzidas por uma série de condições estressantes tanto ambientais como genéticas. Por exemplo, alta e baixa temperatura, radiação UV, metais pesados, pesticidas, hipóxia, salinidade, infecções virais e bacterianas, parasitismo, atividade física, dessecação, estresse oxidativo, senescência, injúrias, endogamia e mutações deletérias (Dong et al., 2008b; Feder e Hofmann, 1999; Liu et al., 2014; Mayer e Bukau, 2005; Patruno et al., 2001). Porém, o estresse necessário para induzir a expressão da HSP também está intimamente relacionado com o nicho do organismo em questão. Por exemplo, peixes antárticos têm a HSP induzida em temperaturas de aproximadamente 5°C, enquanto que bactérias termofílicas a expressam na faixa de 100°C (Feder e Hofmann, 1999; Parsell e Lindquist, 1993).

MAPK

As *Mitogen-Activated Protein Kinases* são uma classe de proteínas que atuam em resposta a estímulos extracelulares. Todas as células eucarióticas possuem múltiplas vias das MAPK que regulam uma variedade de processos celulares como inflamação, ciclo, diferenciação e morte celular (apoptose), além do metabolismo, desenvolvimento e expressão gênica (Caterina et al., 2008; Roux e Blenis, 2004;

Zarubin e Han, 2005). Fazem parte de um grupo de proteínas bem conservado ao longo da evolução e estão presentes em diferentes tipos celulares (Graves e Krebs, 1960).

São reguladas por cascatas de fosforilação nas quais proteínas quinases (MAK) ativadas em série levam a ativação das MAPK (Pearson et al., 2001). Cinco diferentes grupos de MAPKs já foram extensivamente caracterizados em mamíferos: ERK1 e 2 (*extracellularly regulated kinase*), JNK1 e 2 (*c-jun N-terminal kinase*) e isoformas de p38. A p38-MAPK é membro da superfamília das MAP quinases, moléculas sinalizadoras ubíquas que quando ativadas traduzem sinais iniciados por uma variedade de estímulos extracelulares em respostas intracelulares. Seus mecanismos regulatórios também são evolutivamente conservados e compartilhados desde leveduras a mamíferos (Roux e Blenis, 2004).

Em especial, a p38-MAPK tem sido observada como a principal proteína quinase responsiva a flutuações ambientais como salinidade, hipóxia/anóxia temperatura e poluição por metais pesados (Gaitanaki et al., 2004; Kefaloyianni et al., 2005; Larade e Storey, 2006). Também é regulada por diferentes estímulos externos físicos ou químicos (e.g. estresse oxidativo, radiação UV, citocinas e LPS) (Roux e Blenis, 2004). Através da regulação de substratos secundários (*downstream*), que incluem proteínas quinases e fatores de transcrição, a p38 participa da transmissão, amplificação e diversificação de sinais extracelulares (Gaitanaki et al., 2004).

A via da p38-MAPK se inicia com um estresse celular ou a sinalização de receptores na superfície celular, que desencadeiam a fosforilação de proteínas quinases específicas em uma sequência de ativação (MKKK/MKK/MAPK). A p38-MAPK é então ativada por uma dupla fosforilação do Thr e Tyr no sítio de ativação Thr-Gly-Tyr e pode então fosforilar diferentes substratos. Por exemplo, fatores transcricionais (Ono e Han, 2000), proteínas quinase ativadas MAPK (MAPKAP), que por sua vez fosforilam pequenas proteínas de choque térmico HSP27, assim como outros substratos (Rouse et al., 1994).

Devido sua afinidade por diversos substratos concluiu-se que a p38-MAPK participa da regulação de diferentes funções biológicas. É relacionada principalmente às respostas imune inata e inflamatória, diferenciação celular e controle do ciclo celular (Ono e Han, 2000; Roux e Blenis, 2004). No entanto, participa também em respostas funcionais celulares como respiração, quimiotaxia, exocitose de grânulos, aderência e apoptose (Kyriakis e Avruch, 1996).

Dadas às características da via da p38-MAPK, a utilização desta proteína como biomarcador pode trazer informações a respeito do estado fisiológico de organismos que estão sujeitos a mudanças no ambiente, bem como as estratégias que podem estar utilizando para sua sobrevivência (Gaitanaki et al., 2004; Kefaloyianni et al., 2005).

AIF-1

O AIF-1 é uma citocina relacionada ao reconhecimento *self/non-self*. Trata-se de uma proteína citoplasmática sinalizadora de 14kDa ligante de cálcio. É principalmente expressa em células do sistema imune e induz a expressão de mediadores da resposta inflamatória, promovendo a proliferação e migração celular em resposta a estímulos estressores (Utans et al., 1995; Zhao et al., 2013). Este fator foi originalmente identificado em ratos, durante um processo de rejeição crônica a transplantes de enxertos de coração de humanos (Utans et al., 1995). Isoformas com alto grau de similaridade são encontradas em diversos grupos de organismos filogeneticamente distantes, o que sugere uma alta conservação ao longo da evolução (Miyata et al., 2001). Há evidências de que o AIF-1 também esteja envolvido na resposta imune de espécies de invertebrados (Li et al. 2013; Zhang et al. 2013; Zhao et al. 2013). Porém, o conhecimento existente a respeito do papel deste fator em vertebrados não pode ser extrapolado para invertebrados, pois estes não possuem imunidade adquirida (Li et al., 2013).

O primeiro gene de AIF-1 em invertebrados foi isolado de uma esponja marinha, sendo verificado que sua expressão é aumentada em resposta a injúrias (Kruse et al., 1999). Em polvos, o AIF-1 foi hiper-regulado em hemócitos após a estimulação por lipopolisacarídeos (LPS - Miyata et al., 2001). Também já foi identificado em ouriços do mar antárticos com hiper-regulação após exposição ao LPS, estando associado com a resposta imune relacionada a primeira fase de proliferação dos celomócitos (Ovando et al., 2012). Por outro lado, sua expressão constitutiva foi detectada em hemócitos de outros moluscos tais como abalones, mexilhões e ostras (Zhang et al., 2013). Observa-se que AIF-1 pode estar envolvido na resposta imune de espécies filogeneticamente distantes, mas há poucos estudos que relacionem a expressão do AIF-1 com o aumento da temperatura e acidificação da água.

A fisiologia e a previsão dos futuros impactos

Na ecofisiologia tem-se bem estabelecido que processos que ocorrem a nível de organismo, célula e genoma podem ter efeito cascata na distribuição, abundância e fitness dos organismos em escala de micro-habitat até continental e oceânica (Helmuth, 2009; Pörtner, 2002; Somero, 2012). Há um grande interesse em se entender os efeitos das mudanças dos parâmetros ambientais nos organismos e suas interações. Novas técnicas nas áreas de genômica, transcriptômica, proteômica (Gracey e Cossins, 2003; Helmuth, 2009; Hofmann e Gaines, 2008), e indicadores bioquímicos de estresse tem aberto novas possibilidades para mensurar as respostas dos organismos de maneira pontual e rápida. Isto tanto no ambiente como em laboratório (Costa e Sinervo, 2004).

Nas últimas décadas, os impactos causados pelo aquecimento e a acidificação dos oceanos tem chamado atenção e há um consenso de que estes dois estressores irão desencadear sérias consequências na estrutura e funcionamento do ecossistema marinho, o que tem estimulado o interesse científico e da sociedade (IPCC, 2014).

Muitos trabalhos têm estudado os efeitos das mudanças climáticas na fisiologia de organismos marinhos, seus mecanismos de adaptação, distribuição entre outros. No entanto, a maioria é focada nos efeitos apenas de um estressor isolado, e é preciso considerar de forma integrada os piores cenários para os próximos anos (Caldeira e Wickett, 2003; Feidantsis et al., 2014). Estudos que abordem os efeitos do aumento conjunto da temperatura e dos níveis de CO₂ dissolvido podem gerar resultados mais reais a respeito das respostas dos organismos para os cenários ambientais futuros (Pörtner, 2008).

Através da avaliação da variação de marcadores moleculares, este trabalho buscou investigar como a fisiologia de um organismo-chave - a estrela do mar *Echinaster brasiliensis* - pode ser alterada no quadro de mudanças climáticas. Saber os limites de tolerância de um organismo e a que nível as alterações previstas vão alterar sua fisiologia pode nos dar informações sobre quais espécies serão vulneráveis e como que o ecossistema será transformado. O ponto principal para prever mudanças esperadas nas comunidades animais é entender as respostas dos indivíduos a um ambiente em modificação (Hofmann e Todgham, 2010). No entanto, alguns trabalhos têm mostrado que nem todas as mudanças ambientais desencadeiam efeitos negativos diretos em todos os organismos, como esperado (Byrne et al., 2011; Gooding et al., 2009). Desta forma, tem sido sugerido que as previsões das respostas bióticas a estas alterações devem considerar de que forma diferentes tipos de organismos irão responder às diversas variáveis (Gooding et al., 2009). Sendo assim, informações sobre o estado fisiológico de espécies-chave ou membros principais de cadeias alimentares são importantes e precisam ser amplamente exploradas para que seja possível identificar qual será o possível cenário das comunidades no futuro.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi detectar possíveis alterações no estado fisiológico de *Echinaster brasiliensis*, frente ao aumento da temperatura, da acidificação da água e os efeitos cruzados destes dois fatores. Como parâmetros foram avaliadas as variações no nível de três marcadores de estresse (HSP70, pp38-MAPK e AIF-1) nas gônadas e celomócitos, e do número total de celomócitos. Especificamente, se buscou responder:

- 1) Se a resposta às alterações é sistêmica ou afeta as gônadas e/ou celomócitos de maneira diferencial;
- 2) Qual a dinâmica destes marcadores ao longo do tempo de exposição;
- 3) Se a exposição aos estresses e alterações observadas nos marcadores se refletem numericamente na população de celomócitos.
- 4) Se o aquecimento e acidificação da água tem efeitos sinérgicos, antagônicos ou compensatórios.

Conclusões

- *E. brasiliensis* é sensibilizada pelas mudanças ambientais do pH e temperatura.
- O tempo de aclimatização em laboratório diminuiu ou não alterou a expressão das proteínas de estresse.
- O cenário considerado o mais estressante (pH7.3/30°C) ocasionou óbito dos organismos após 24 horas de exposição.
- O cenário pH7.7+30°C desencadeou o surgimento da doença ulceração de pele.
- A expressão das proteínas biomarcadoras de estresse varia entre gônadas e celomócitos, tempo e grupo experimental.
- *E. brasiliensis* responde mais rapidamente aos estresses moderados (28°C, pH7.7)
- Os efeitos dos estresses ambientais em *E. brasiliensis* são mais pronunciados nos celomócitos, e a variação da expressão das proteínas esta associada com a dinâmica do número de células e viabilidade.
- Os celomócitos são bons indicadores para avaliar as alterações fisiológicas desencadeadas pelas mudanças climáticas.
- As gônadas de *E. brasiliensis* não são sensíveis ao estresse térmico, não alterando a expressão de HSP70 e p38-MAPK.
- O aumento da temperatura desencadeia o aumento do número total de celomócitos, mas a acidificação da água não altera o número total de células.
- A combinação da alteração do pH e temperatura desencadeou aumento do número de celomócitos em todos os grupos.
- Apenas o aumento da temperatura para 30°C ou diminuição do pH para 7.3 reduziram a viabilidade dos celomócitos
- O pH diminui os efeitos da temperatura na expressão de proteínas nos celomócitos.

- Como cada proteína de estresse responde a variados e diferentes estímulos, a utilização de mais de um biomarcador é interessante para confirmar as alterações que ocorrem nos organismos.

Referências

- Anderson, S.C., Flemming, J.M., Watson, R., e Lotze, H.K. (2011). Serial exploitation of global sea cucumber fisheries. *Fish Fish.* 12, 317–339.
- Bates, A., Hilton, B., e Harley, C. (2009). Effects of temperature, season and locality on wasting disease in the keystone predatory sea star *Pisaster ochraceus*. *Dis. Aquat. Organ.* 86, 245–251.
- Becker, P., Gillan, D., Lanterbecq, D., Jangoux, M., Rasolofonirina, R., Rakotovao, J., e Eckhaut, I. (2004). The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata). *Aquaculture* 242, 13–30.
- Becker, P., Eeckhaut, I., Mercier, A., e Hamel, J. (2010). Protozoan disease in larval culture of the edible sea cucumber *Isostichopus fuscus*. In: *Echinoderms*, H. Durham, org. (London: Taylor & Francis Group), p. 571–573.
- Bonaventura, R., Costa, C., Pinsino, A., Russo, R., Zito, F., e Matranga, V. (2011). Echinoderms: Model organisms for marine environmental monitoring and development of new emerging technologies. *Mar. Res. Fish. Sea Resour.* 1967–1978.
- Brockington, S., e Clarke, a (2001). The relative influence of temperature and food on the metabolism of a marine invertebrate. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 258, 87–99.
- Brun, N.T., Bricelj, V.M., MacRae, T.H., e Ross, N.W. (2008). Heat shock protein responses in thermally stressed bay scallops, *Argopecten irradians*, and sea scallops, *Placopecten magellanicus*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 358, 151–162.
- Byrne, M., e Przeslawski, R. (2013). Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates life histories. *Integr. Comp. Biol.* 53, 582–596.
- Byrne, M., Ho, M., Selvakumaraswamy, P., Nguyen, H.D., Dworjany, S. a, e Davis, A.R. (2009). Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. *Proc. Biol. Sci.* 276, 1883–1888.
- Byrne, M., Selvakumaraswamy, P., Ho, M., Woolsey, E., e Nguyen, H.D. (2011). Sea urchin development in a global change hotspot, potential for southerly migration of thermotolerant propagules. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 58, 712–719.
- Caldeira, K., e Wickett, M.E. (2003). Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425, 365.
- Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C., e Gallo, G. (2002). Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAP kinases. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 325–334.

- Canicattì, C., Ancona, G.D., e Farina-lipari, E. (1989). The coelomocytes of *Holothuria polii* (Echinodermata). I. Light and electron microscopy. *Ital. J. Zool.* 56, 29–36.
- Caterina, C., Savona, R., Ragusa, M. a., Bosco, L., e Gianguzza, F. (2008). p38 MAPK activation is required for *Paracentrotus lividus* skeletogenesis. *Caryologia* 61, 74–81.
- Châtel, a., Hamer, B., Talarmin, H., Dorange, G., Schröder, H.C., e Müller, W.E.G. (2010). Activation of MAP kinase signaling pathway in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution. *Aquat. Toxicol.* 96, 247–255.
- Chen, C.P., e Chen, B.Y. (1992). Effects of high temperature on larval development and metamorphosis of *Arachnoides placenta* (Echinodermata: Echinoidea). *Mar. Biol.* 112, 445–449.
- Chinnachamy, C., Samuel, D., e Patterson, E. (2003). Status of echinoderm fishery in the Gulf of Mannar. *SDMRI Res. Publ.* 3, 173–176.
- Clark, M.S., e Peck, L.S. (2009). HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: A mini-review. *Mar. Genomics* 2, 11–18.
- Clow, L. a., Gross, P.S., Shih, C.S., e Smith, L.C. (2000). Expression of SpC3, the sea urchin complement component, in response to lipopolysaccharide. *Immunogenetics* 51, 1021–1033.
- Costa, D.P., e Sinervo, B. (2004). Field Physiology: Physiological Insights from Animals in Nature. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 209–238.
- Coteur, G., Gosselin, P., Wantier, P., Chambost-Manciet, Y., Danis, B., Pernet, P., Warnau, M., e Dubois, P. (2003). Echinoderms as bioindicators, bioassays, and impact assessment tools of sediment-associated metals and PCBs in the North Sea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 190–202.
- Coteur, G., Corriere, N., e Dubois, P. (2004). Environmental factors influencing the immune responses of the common European starfish (*Asterias rubens*). *Fish Shellfish Immunol.* 16, 51–63.
- Cummings, V., Hewitt, J., van Rooyen, A., Currie, K., Beard, S., Thrush, S., Norkko, J., Barr, N., Heath, P., Jane Halliday, N., et al. (2011). Ocean acidification at high latitudes: Potential effects on functioning of the antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *PLoS One.* 6,1-11.
- Deng, H., He, C., Zhou, Z., Liu, C., Tan, K., Wang, N., Jiang, B., Gao, X., e Liu, W. (2009). Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture* 287, 18–27.
- Doney, S., Ruckelshaus, M., Duffy, E., Barry, J., Chan, F., English, C., Galindo, H., Grebmeier, J., Hollowed, A., Knowlton, N., et al. (2012). Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4, 11–37.

- Doney, S.C., Balch, W.M., Fabry, V., e Feely, R. (2009). Ocean Acidification A Critical Emerging Problem. *Oceanography* 22, 16–25.
- Dong, Y., Dong, S., e Ji, T. (2008a). Effect of different thermal regimes on growth and physiological performance of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. *Aquaculture* 275, 329–334.
- Dong, Y., Dong, S., e Meng, X. (2008b). Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Aquaculture* 276, 179–186.
- Dong, Y.W., Yu, S.S., Wang, Q.L., e Dong, S.L. (2011). Physiological responses in a variable environment: Relationships between metabolism, hsp and thermotolerance in an intertidal-subtidal species. *PLoS One* 6, 2–7.
- Dupont, S., e Thorndyke, M. (2012). Relationship between CO₂-driven changes in extracellular acid–base balance and cellular immune response in two polar echinoderm species. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 424-425, 32–37.
- Dupont, S., e Thorndyke, M.C. (2006). Growth or differentiation? Adaptive regeneration in the brittlestar *Amphiura filiformis*. *J. Exp. Biol.* 1, 3873–3881.
- Dupont, S., Ortega-Martínez, O., e Thorndyke, M. (2010). Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology*. 19, 449–462.
- Dykstra, M.J. (1993) A manual of applied techniques for biological electron microscopy. Plenum Press, NY
- Eckert, G.L., Engle, J.M., e Kushner, D.J. (1999). Sea Star Disease And Population Declines At The Channel Islands. *Proc. 5th Calif. Isl. Symp.* 5, 390–393.
- Ellis, R.P., Parry, H., Spicer, J.I., Hutchinson, T.H., Pipe, R.K., e Widdicombe, S. (2011). Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 1209–1222.
- Endean, R. (1958). The coelomocytes of *Holothuria leucospilota*. *J. Cell Sci.* 3, 47.
- Feder, M.E., e Hofmann, G.E. (1999). Heat-Shock Proteins, Molecular Chaperones, And The Stress Response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243–282.
- Feidantsis, K., Antonopoulou, E., Lazou, A., Pörtner, H.O., e Michaelidis, B. (2013). Seasonal variations of cellular stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 183, 625–639.
- Feidantsis, K., Pörtner, H.-O., Antonopoulou, E., e Michaelidis, B. (2014). Synergistic effects of acute warming and low pH on cellular stress responses of the gilthead seabream *Sparus aurata*. *J. Comp. Physiol. B* 185, 185–205.
- Folt, C.L., Chen, C.Y., Moore, M. V., e Burnaford, J. (1999). Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnol. Oceanogr.* 44, 864–877.

- Fredalina, B.D., Ridzwan, B.H., Abidin, a. a Z., Kaswandi, M. a., Zaiton, H., Zali, I., Kittakoop, P., e Jais, a. M.M. (1999). Fatty acid compositions in local sea cucumber, *Stichopus chloronotus*, for wound healing. *Gen. Pharmacol.* 33, 337–340.
- 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. Biochem.* 260, 119–127.
- Gardner, T. a, Gill, J. a, Grant, a, Watkinson, a R., e Côté, I.M. (2005). Hurricanes and Caribbean coral reefs: immediate impacts, recovery trajectories and contribution to long-term decline. *Ecology* 86, 174–184.
- Glinski, Z., e Jarosz, J. (2000). Immune Phenomena in Echinoderms. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 189–193.
- Godbold, J. a, e Solan, M. (2013). Long-term effects of warming and ocean acidification are modified by seasonal variation in species responses and environmental conditions. *Philos. Trans. R. Soc.* 368,1-11
- Gonzalez-Aravena, M., Perez-troncoso, C., Urtubia, R., Branco, P., Roberto, J., Cunha, M., Mercado, L., Lorgetil, J. De, e Bethke, J. (2015). Immune response of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*: cellular , molecular and physiological approach. 63, 309–320.
- Gooding, R. a, Harley, C.D.G., e Tang, E. (2009). Elevated water temperature and carbon dioxide concentration increase the growth of a keystone echinoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(23), 9316–9321.
- Gourgou, E., Aggeli, I.-K., Beis, I., e Gaitanaki, C. (2010). Hyperthermia-induced Hsp70 and MT20 transcriptional upregulation are mediated by p38-MAPK and JNKs in *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck); a pro-survival response. *J. Exp. Biol.* 213, 347–357.
- Gracey, A.Y., e Cossins, A.R. (2003). Application Of Microarray Technology In Environmental And Comparative Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 231–259.
- Graves, J.D., e Krebs, E.G. (1960). Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol. Ther.* 82, 111–121.
- Gross, M. (2004). Emergency services: a bird's eye perspective on the many different functions of stress proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 213–223.
- Gross, P.S., Al-sharif, W.Z., Clow, L.A., e Smith, L.C. (1999). Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Immunology* 23.
- Gutowska, M., Pörtner, H., e Melzner, F. (2008). Growth and calcification in the cephalopod *Sepia officinalis* under elevated seawater pCO₂. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373, 303–309.
- Harley, C.D.G., Hughes, a. R., Hultgren, K.M., Miner, B.G., Sorte, C.J.B., Thornber, C.S., Rodriguez, L.F., Tomanek, L., e Williams, S.L. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecol. Lett.* 9, 228–241.

- Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S., e Samuel, M.D. (2002). Climate Warming and Disease Risks for Terrestrial and Marine Biota. *296*, 2158–2163.
- Haugan, P., e Drange, H. (1996). Effects of CO₂ on the Ocean Environment. *Energy. Convers. Manag.* *37*, 1019–1022.
- Hauton, C., Tyrrell, T., e Williams, J. (2009). The subtle effects of sea water acidification on the amphipod *Gammarus locusta*. 1479–1489.
- Helmuth, B. (2009). From cells to coastlines: how can we use physiology to forecast the impacts of climate change? *J. Exp. Biol.* *212*, 753–760.
- Helmuth, B.S.T., e Hofmann, G.E. (2001). Microhabitats, thermal heterogeneity, and patterns of physiological stress in the rocky intertidal zone. *Biol. Bull.* *201*, 374–384.
- Hernroth, B., Baden, S., Thorndyke, M., e Dupont, S. (2011). Immune suppression of the echinoderm *Asterias rubens* (L .) following long-term ocean acidification. *Aquat. Toxicol.* *103*, 222–224.
- Hernroth, B., Sköld, H.N., Wiklander, K., Jutfelt, F., e Baden, S. (2012). Simulated climate change causes immune suppression and protein damage in the crustacean *Nephrops norvegicus*. *Fish Shellfish Immunol.* *33*, 1095–1101.
- Hendler, G., Miller, J.E., Pawson, D.L. e Kier, M.E. (1995) Sea stars, sea urchins and allies: echinoderms of Florida and the Caribbean. Smithsonian Institution Press, Washington. 230pp.
- Himaya, S.W. a., Ryu, B., Qian, Z.-J., e Kim, S.-K. (2010). Sea cucumber, *Stichopus japonicus* ethyl acetate fraction modulates the lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathway in murine macrophages. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *30*, 68–75.
- Hofmann, A. a., e Hercus, M.J. (2000). Environmental Stress as an Evolutionary Force. *Bioscience* *50*, 217-226.
- Hofmann, G.E., e Gaines, S.D. (2008). New Tools to Meet New Challenges: Emerging Technologies for Managing Marine Ecosystems for Resilience. *Bioscience* *58*, 43-52.
- Hofmann, G.E., e Todgham, A.E. (2010). Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 127–145.
- Holm, K., Dupont, S., Sköld, H., Stenius, A., Thorndyke, M., e Hernroth, B. (2008a). Induced cell proliferation in putative haematopoietic tissues of the sea star, *Asterias rubens* (L.). *J. Exp. Biol.* *211*, 2551–2558.
- Holm, K., Hernroth, B., e Thorndyke, M. (2008b). Coelomocyte numbers and expression of HSP70 in wounded sea stars during hypoxia. *Cell Tissue Res.* *334*, 319–325.
- Hyman, L. H. (1955). The Invertebrates: Echinodermata. The Coelomate Bilateria. McGraw-Hill Book Company. 763 pp.

- Jangoux, M. (1987). Diseases of Echinodermata . IV . Structural abnormalities and general considerations on biotic diseases. *Dis. Aquat. Organ.* 3, 221–229.
- Kefaloyianni, E., Gourgou, E., Ferle, V., Kotsakis, E., Gaitanaki, C., e Beis, I. (2005). Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro or antiapoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *J. Exp. Biol.* 208, 4427–4436.
- Kelly, M.S. (2001). Environmental parameters controlling gametogenesis in the echinoid *Psammechinus miliaris*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 266, 67–80.
- Kregel, K.C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 92, 2177–2186.
- Kruse, M., Steffen, R., Batel, R., Müller, I.M., e Müller, W.E. (1999). Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto and allograft response in marine sponges. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 2, 4305–4313.
- Kurihara, H. (2008). Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373, 275–284.
- Kyriakis, J.M., e Avruch, J. (1996). Sounding the alarm:Protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.* 271, 24313–24316.
- Langenbuch, M., e Pörtner, H.O. (2002). Changes in metabolic rate and N excretion in the marine invertebrate *Sipunculus nudus* under conditions of environmental hypercapnia: identifying effective acid-base variables. *J. Exp. Biol.* 205, 1153–1160.
- Langenbuch, M., e Pörtner, H.O. (2003). Energy budget of hepatocytes from Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum* and *Lepidonotothen kempfi*) as a function of ambient CO₂: pH-dependent limitations of cellular protein biosynthesis? *J. Exp. Biol.* 206, 3895–3903.
- Langenbuch, M., Bock, C., Leibfritz, D., e Pörtner, H.O. (2006). Effects of environmental hypercapnia on animal physiology: A ¹³C NMR study of protein synthesis rates in the marine invertebrate *Sipunculus nudus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 144, 479–484.
- Larade, K., e Storey, K.B. (2006). Analysis of signal transduction pathways during anoxia exposure in a marine snail: a role for p38 MAP kinase and downstream signaling cascades. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 143, 85–91.
- Lewis, S., Handy, R.D., Cordi, B., Billingham, Z., e Depledge, M.H. (1999). Stress proteins (HSP's): methods detections and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8, 351–368.
- 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, 365–371.

- Liu, H., He, J., Chi, C., e Shao, J. (2014). Differential HSP70 expression in *Mytilus coruscus* under various stressors. *Gene* 543, 166–173.
- Lotze, H.K., e Worm, B. (2002). Complex interactions of climatic and ecological controls on macroalgal recruitment. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1734–1741.
- Maltby, L. (1999). Studying Stress: The Importance Of Organism-Level Responses. *Ecol. Appl.* 9, 431–440.
- Matranga, V., Toia, G., Bonaventura, R., e Müller, W.E. (2000). Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. *Cell Stress Chaperones* 5, 113–120.
- Mayer, M.P., e Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670–684.
- Meistertzheim, A.L., Lejart, M., Le Goïc, N., e Thébault, M.T. (2009). Sex-, gametogenesis, and tidal height-related differences in levels of HSP70 and metallothioneins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 152, 234–239.
- Metzger, R., Sartoris, F.J., Langenbuch, M., e Pörtner, H.O. (2007). Influence of elevated CO₂ concentrations on thermal tolerance of the edible crab *Cancer pagurus*. *J. Therm. Biol.* 32, 144–151.
- Miyata, M., Iinuma, K., e Miyazaki, T. (2001). DNA cloning and characterization of an allograft inflammatory factor-1 homologue in red sea bream (*Chrysophrys major*). *Aquaculture* 194, 63–74.
- Morimoto, R.I. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*. 250(5100). 1409-1410.
- Morris, J.P., Thatje, S., e Hauton, C. (2013). The use of stress-70 proteins in physiology: A re-appraisal. *Mol. Ecol.* 22, 1494–1502.
- Muñoz-Chápuli, R., Carmona, R., Guadix, J. a, Macías, D., e Pérez-Pomares, J.M. (2005). The origin of the endothelial cells: an evo-devo approach for the invertebrate/vertebrate transition of the circulatory system. *Evol. Dev.* 7, 351–358.
- O'Donnell, M.J., Hammond, L.M., e Hofmann, G.E. (2008). Predicted impact of ocean acidification on a marine invertebrate: elevated CO₂ alters response to thermal stress in sea urchin larvae. *Mar. Biol.* 156, 439–446.
- Oliveira, O. M. P. & Marques, a. C. (2007). Dinâmica Sazonal Das Massas De Água No Canal De São Sebastião (Se Brasil) De Março De 2005 a Maio De 2006. XII Congr. Latino-Americano Ciências do Mar - XII COLACMAR 2006–2008.
- Ono, K., e Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12, 1–13.
- Orr, J.C., Fabry, V.J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S.C., Feely, R. a, Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., et al. (2005). Anthropogenic ocean

acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437, 681–686.

- Osovitz, C.J., e Hofmann, G.E. (2007). Marine macrophysiology: studying physiological variation across large spatial scales in marine systems. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 147, 821–827.
- Ovando, F., Gimpel, C., Cardenas, C., Silva, J.R.M.C. Da, Lorgetil, J. De, 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, 875–883.
- Parker, L.M., Ross, P.M., e O'Connor, W. a. (2010). Comparing the effect of elevated pCO₂ and temperature on the fertilization and early development of two species of oysters. *Mar. Biol.* 157, 2435–2452.
- Parsell, D. a, e Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27, 437–496.
- Patruno, M., Thorndyke, M.C., Carnevali, M.D.C., Bonasoro, F., Beesley, P.W., e Holloway, R. (2001). Growth factors, heat-shock proteins and regeneration in Echinoderms. *J. Exp. Biol.* 848, 843–848.
- Pawson, D.L. (2007) Phylum Echinodermata. *Zootaxa*. 1668: 749 - 764.
- Pearson, Robinson, F., Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., e Cobb, M. (2001). Mitogen-activated protein(MAP) Kinase pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr. Rev.* 22, 153–183.
- Philippart, C.J.M., van Aken, H.M., Beukema, J.J., Bos, O.G., Cadée, G.C., e Dekker, R. (2003). Climate-related changes in recruitment of the bivalve *Macoma balthica*. *Limnol. Oceanogr.* 48, 2171–2185.
- Pinsino, A., Thorndyke, M.C., e Matranga, V. (2007). Coelomocytes and post-traumatic response in the common sea star *Asterias rubens*. *Cell Stress Chaperones* 12, 331–341.
- Pinsino, A., Torre, C. Della, e Sammarini, 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.* 541–552.
- Pörtner, H.O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 132, 739–761.
- Pörtner, H.O. (2005). Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: From Earth history to global change. *J. Geophys. Res.* 110, 1–15.
- Pörtner, H.O. (2008). Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: A physiologist's view. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373, 203–217.

- Pörtner, H.O., Bennett, A.F., Bozinovic, F., Clarke, A., Lardies, M. a, Lucassen, M., Pelster, B., Schiemer, F., e Stillman, J.H. (2015). Trade-offs in thermal adaptation: the need for a molecular to ecological integration. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 295–313.
- Pyza, E., Mak, P., Kramarz, P., e Laskowski, R. (1997). Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 244–251.
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *drosophila*. *Experientia* 18, 571–573.
- Roberts, S., Gueguen, Y., de Lorgeril, J., e Goetz, F. (2008). Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1099–1104.
- Roller, R. a., e Stickle, W.B. (1993). Effects of temperature and salinity acclimation of adults on larval survival, physiology, and early development of *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Mar. Biol.* 116, 583–591.
- Romero, L.M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol. Evol.* 19, 249–255.
- Rosic, N.N., Pernice, M., Dove, S., Dunn, S., e Hoegh-Guldberg, O. (2011). Gene expression profiles of cytosolic heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 from symbiotic dinoflagellates in response to thermal stress: Possible implications for coral bleaching. *Cell Stress Chaperones* 16, 69–80.
- Ross, P.M., Parker, L., O'Connor, W. a., e Bailey, E. a. (2011). The Impact of Ocean Acidification on Reproduction, Early Development and Settlement of Marine Organisms. *Water*. 3, 1005–1030.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., e Nebreda, A.R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027–1037.
- Roux, P.P., e Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases : a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases : a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 320–344.
- Saier, B. (2001). Direct and indirect effects of seastars *Asterias rubens* on mussel beds (*Mytilus edulis*) in the Wadden Sea. *J. Sea Res.* 46, 29–42.
- Sanders, B., Martin, L., Howe, S., Nelson, W.G., Hegre, E.S., e Phelps, D. (1994). Tissue-Specific Differences in Accumulation of Stress Proteins in *Mytilus edulis* Exposed to a Range of Copper Concentrations.pdf. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 125, 206–213.
- Sanford, E. (1999). Regulation of Keystone Predation by Small Changes in Ocean Temperature. *Science* (80-.). 283, 2095–2097.

- Schaeffer, H.J., e Weber, M.J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2435–2444.
- Schill, R.O., Gayle, P.M.H., Fritz, G.B., e Köhler, H.-R. (2008).) From the Intertidal Zone: the Influence of Temperature and Photoperiod Exposure. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 41, 229–239.
- Shimada, O.C., Jensch-Junior, B.E., Amaral, P., Garrido, G., e Ba, M. (2005). Phagocytic Amoebocyte Sub Populations in the Perivisceral Coelom of the Sea Urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck , 1816). *Sci. York* 248, 241–248.
- Shirayama, Y., Thornton, H. (2005). Effect of increased atmospheric CO₂ on Shallow Water Marine Benthos. *J. Geophys. Res.* 110, 1–7.
- Shpigel, M., McBride, S.C., Marciano, S., e Lupatsch, I. (2004). The effect of photoperiod and temperature on the reproduction of European sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture* 232, 343–355.
- Smiley, S. (1994). Echinodermata. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, (Wiley-Liss Inc), p. 401–471.
- Smith, L.C. (1999). Complement systems in invertebrates . The ancient alternative and lectin pathways. *Immunopharmacology*.
- Royal Society (2005). Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. Policy Document.
- Somero, G.N. (2012). The Physiology of Global Change: Linking Patterns to Mechanisms. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4, 39–61.
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N., e Loeschcke, V. (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6, 1025–1037.
- Tahseen, Q. (2009). Coelomocytes: Biology and Possible Immune Functions in Invertebrates with Special Remarks on Nematodes. *Int. J. Zool.* 2009, 1–13.
- Tajima, K., Silva, J.R.M.C. Da, e Lawrence, J.M. (2007). Disease in Sea Urchins. In *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*, J.M. Lawrence, org. (Elsevier Science B.V.), p. 167–182.
- Taupin, P. (2008) Electron microscopy of cell suspension. *Ann Microsc.* 8: 19 - 21.
- Tissières, a, Mitchell, H.K., e Tracy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84, 389–398.
- Todgham, A.E., e Hofmann, G.E. (2009). Transcriptomic response of sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* to CO₂-driven seawater acidification. *J. Exp. Biol.* 212, 2579–2594.
- Troemel, E.R., Chu, S.W., Reinke, V., Lee, S.S., Ausubel, F.M., e Kim, D.H. (2006). p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 2, 1725–1739.

- Utans, U., Arceci, R.J., Yamashita, Y., e Russell, M.E. (1995). Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: A novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J. Clin. Invest.* 95, 2954–2962.
- Ventura, C.R.R., Lima, R.P.N., Nobre, C.C., Veríssimo, I. e Zama, P.C. (2006) Filo Echinodermata. *In: Biodiversidade bentônica da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira*. Lavrado, H.P. & Ignácio, B.L. (eds.). Museu Nacional, Rio de Janeiro, (Série Livros, 18), 389 pp.
- Watts, S. a., Hofer, S.C., Desmond, R. a., Lawrence, A.L., e Lawrence, J.M. (2011). The effect of temperature on feeding and growth characteristics of the sea urchin *Lytechinus variegatus* fed a formulated feed. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 397, 188–195.
- Wood, H.L., Spicer, J.I., e Widdicombe, S. (2008). Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. *Proc. Biol. Sci.* 275, 1767–1773.
- Xing, J., e Chia, S. (2000). Opsonin-like molecule found in coelomic fluid of a sea cucumber , *Holothuria leucospilota*. October 979–986.
- Xing, K., Yang, H.S., e Chen, M.Y. (2008). Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicus*. *Scanning* 2, 85–92.
- Zarubin, T., e Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 15, 11–18.
- Zhang, Y., Li, J., Yu, F., He, X., e Yu, Z. (2013). Allograft inflammatory factor-1 stimulates hemocyte immune activation by enhancing phagocytosis and expression of inflammatory cytokines in *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1071–1077.
- Zhao, Y.Y., Yan, D.J., e Chen, Z.W. (2013). Role of AIF-1 in the regulation of inflammatory activation and diverse disease processes. *Cell. Immunol.* 284, 75–83.
- Zhong, Y., Khan, M.A., e Shahidi, F. (2007). Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *J. Agric. Food Chem.* 55, 1188–1192.
- Zilberberg, C., Sereno, D., e Lôbo-hajdu, G. (2011). Effect of Mussel's Gender and Size on a Stress Response Biomarker. *Water Air Soil Pollut* 317–320.
- IPCC, 2014. International Panel of Climate Change: Synthesis Report for Policymakers.