Vinicius Queiroz Araújo

**Diversidade, isolamento e função fisiológica
dos celomócitos de Echinodermata:
utilização de equinóides como modelo**

**São Paulo
2020**

Vinicius Queiroz Araújo

**Diversidade, isolamento e função
fisiológica dos celomócitos de
Echinodermata: utilização de
equinóides como modelo.**

**Diversity, isolation and physiological function of Echinodermata
coelomocytes: use of echinoids as model organisms**

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
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

Queiroz, Vinicius

Diversidade, isolamento e função fisiológica dos celomócitos de Echinodermata: utilização de equinóides como modelo. / Vinicius Queiroz; Orientador Márcio Reis Custódio. -- São Paulo, 2020
177 páginas.

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

1. Celomócitos 2. Echinoidea 3. Função fisiológica. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a)

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)

Um cavalheiro deveria saber um
pouco de zoologia dos invertebrados,
assim como ele deve conhecer algo sobre
pintura e música e sobre as ervas do seu
jardim

(adaptado de Martin Well, Lower
invertebrates, 1968)

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por me manter vivo, com saúde e força para que fizesse o que sempre gostei. Agradeço também a minha mãe Yemanjá e ao Dr. Zé Pilintra, por me concederem 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 Prof. Márcio Reis Custódio, por todo o apoio, paciência, conversas e muitos ensinamentos. Agradeço também pelas várias perguntas singulares, e inusitadas, que desde o mestrado me fizeram estar mais atentos para outras possibilidades não “equinodérmicas”. Agradeço também pela disponibilidade do CEBIMÁRCIO, sempre disponível para as coletas e procedimentos de campo!

Aos meus pais, Djalma Fernandes Araújo e Marinalva Queiroz Araújo, pelo apoio, incentivo e pelas palavras amigas e reconfortantes na hora do desespero. Agradeço também a minha noiva 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 Vagner Alberto, que sempre me socorreu quando precisei de ajuda com os reagentes ou aparelhos, e com os seus famosos “ajustes técnicos” que sempre salvam o dia de pós-graduando. Agradeço também pelas conversas, que sempre me alegravam quando as coisas não iam tão bem.

Aos colegas de laboratório, que sempre tornaram os meus “dias de bancada” menos sofridos, e os dias de coleta mais alegres e divertidos. Sem vcs o toda a caminhada teria sido muito mais difícil.

Aos Profs. Dr. Vincenzo Arizza e Dra. Mirella Vazzana, da Universidade de Palermo (Itália), com sua hospitalidade e muito boa recepção, que me ajudaram com todas as dificuldades e me fizeram sentir mais “em casa”, mesmo estando numa terra estranha.

Ao Professores Dr. Alberto Ribeiro, Dra. Renata Guimarães, Dr. Álvaro Migoto, Dr. Federico Bronw e Dr. José Eduardo Marian, pela disponibilidade de sua infraestrutura e/ou sugestões de ótima qualidade.

Aos técnicos Waldir Caldeira, Márcio Cruz, Sheilla Shumidt (LME - IB-USP) pelo uso dos equipamentos e apoio com a microscopia eletrônica, parte extremamente importante do meu trabalho.

Agradeço a FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e de BEPE, sem as quais grande parte deste trabalho não teria sido realizado.

Aos funcionários do Cebimar, Instituto de Biociências e do Departamento de Fisiologia, 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.....	12
OBJETIVOS.....	19
ORGANIZAÇÃO DA TESE.....	20
CAPÍTULO I - Diversidade de celomócitos na classe Echinoidea.....	22
CAPÍTULO II – Celomócitos das espécies do gênero <i>Paracentrotus</i> (Echinoidea).....	55
CAPÍTULO III - Células vibráteis de <i>Eucidaris tribuloides</i> (Echinoidea: Cidaroida)...	84
CAPÍTULO IV - Isolamento e função fisiológica dos celomócitos de <i>Arbacia lixula</i> and <i>Lythechinus variegatus</i> (Echinoidea: Camarodonta).....	110
CAPÍTULO V - Mecanismo de liberação de equinocromo-A pelo esferulócito vermelho de <i>Paracentrotus lividus</i>	136
CAPÍTULO VI - O estado de saúde de ouriços-do-mar durante associações biológicas: um estudo de caso com <i>Echinometra lucunter</i> (Echinoidea).....	154
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	168
REFERÊNCIAS.....	174

RESUMO GERAL

Para os vertebrados, o sistema circulatório pode ser visto como um sistema integrador. Entre os papéis desempenhados diretamente por ele, através do sangue e seus componentes, um dos mais importantes é a identificação de partículas e/ou substâncias estranhas. Nesse contexto, as células sanguíneas (especificamente os leucócitos) são responsáveis por cumprir essa missão. Nos invertebrados, dentro de suas restrições, o sistema circulatório também desempenha funções semelhantes realizadas por suas células circulantes. Dependendo do grupo, essas células são denominadas hemócitos de coelomócitos. Para os equinodermos, os celomócitos (as células livre circulantes na cavidade celolômica) estão envolvidas na maioria das reações imunes, sendo os principais responsáveis pela luta contra corpos e substâncias estranhas. No entanto, diferentemente dos vertebrados, o nível de conhecimento sobre os efetores imunes dos equinodermos é consideravelmente menor. Mesmo para o Echinoidea – o grupo mais bem estudado em Echinodermata – os aspectos básicos ainda precisam ser mais detalhados. Perguntas básicas como a diversidade de células da classe Echinoidea, o número real de subpopulações de células em ouriços do mar e o papel fisiológico de algumas subpopulações (*e.g.* esferulócitos e células vibráteis), ainda permanecem sem respostas. Nesse contexto, este estudo tem como objetivo investigar a diversidade e a função fisiológica dos coelomócitos dos equinodermos, utilizando equinóides como organismos modelo. Cinco tipos principais de células foram encontrados, compreendendo 14 subpopulações, um número significativamente diferente do indicado na literatura geral. As células dos ouriços-do-mar de *Paracentrotus* foram estudadas, um dos modelos mais importantes na pesquisa de equinodermos (*i.e.* *P. lividus*), revelando novos tipos de células para as espécies do gênero. Além disso, fornecemos um modelo que explica a sequência de maturação dos esferulócitos de *Paracentrotus*. Ainda, uma caracterização detalhada das células vibráteis de *Eucidaris tribuloides* foi feita e à luz desses novos dados, uma discussão sobre a função desta célula é fornecida. Por meio de uma técnica recente de citometria de fluxo (citometria de fluxo por imagem - IFC), obtivemos pela primeira vez *gates* com subpopulações celômicas isoladas, e através de experimentos de infecção bacteriana, analisados pelo IFC, observamos o envolvimento de células vibráteis nas reações imunes. Por fim, elucidamos como os esferulócitos vermelhos liberam o equinocromo-A, um mecanismo completamente diferente do especulado na literatura, e relatamos um estudo de caso em que alterações

fisiológicas em um ouriço-do-mar pareciam ser causadas por um briozoário, durante uma associação simbiótica. Assim, os resultados obtidos neste estudo lançam luz sobre alguns aspectos cruciais da fisiologia e imunobiologia dos equinodermos, fornecendo os primeiros passos para a resolução destas questões.

Palavras Chave: Citometria de fluxo, degranulação, esferulócito vermelho, ouriço-do-mar, sistema imune.

ABSTRACT

To vertebrates, the circulatory system may be seen as an important system that integrates the organism. Among the roles performed directly by it, through the blood and its components, one of the most important ones is to patrol the body for foreign particles and/or substances. In this context, the blood cells (specifically the leukocytes), are responsible to accomplish this mission. In the invertebrates, within your restrictions, the circulatory system also performs similar functions accomplished by its circulating cells. Depending on the group, these cells have been named hemocytes or coelomocytes. To the echinoderms, the cells in their coelomic cavity (coelomocytes) are involved in most of the immune reactions, being the main effectors responsible to fight against foreign bodies and substances. However, differently from the vertebrates, the level of knowledge about the echinoderm immune effectors is considerably lower. Even to the Echinoidea – the best-studied group in Echinodermata – the basic aspects still needs further studies. Basic questions, such as the diversity of cells in the class Echinoidea, the real number of cell subpopulations in sea urchins, and the physiological role of the less studied cells (e.g. spherulocytes and vibratile cells) remain unsolved. In this context, this study aims to investigate the diversity and the physiological function of echinoderm coelomocytes, using echinoids as model organisms. We found five main cell types, comprising 14 subpopulations, a number significantly different from the pointed out in the general literature (three and four, respectively). The cells of *Paracentrotus* sea urchins were studied, one of the most important models in echinoderm research (*i.e.* *P. lividus*), revealing new cell types to these species. Additionally, we provided a model that explains the maturation sequence of the spherulocytes of *Paracentrotus*. Still, a detailed characterization of *Eucidaris tribuloides* vibratile cells' was made, and on the light of these new data, a discussion on the function of the vibratile cell is provided. Through an unusual flow cytometric technic (*i.e.* image flow cytometry - IFC), we obtained for the first time gates with isolated coelomocyte subpopulation, and through infection experiments analyzed by IFC, we observed the involvement of vibratile cells in immune reactions. Lastly, we elucidate how red spherulocytes release the echinochrome-A, which is a mechanism completely different from the speculated in the literature, and reported a study case where physiological alterations in a sea urchin seemed to be caused by a bryozoan during a symbiotic association. Thus, the results obtained in this study shed light on

some crucial aspects of echinoderm physiology and immunobiology, providing the first steps on these important questions.

Keywords: Degranulation, flow cytometry, immune system, red spherulocyte, sea urchin.

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

Nos vertebrados, o sangue possui funções diversas, executadas por tipos celulares distintos e sobre os quais o nível de conhecimento é muito elevado, principalmente nos mamíferos. De maneira geral, as células do tecido sanguíneo dos vertebrados, tais como os trombócitos, os eritrócitos e os leucócitos são responsáveis pela execução de processos muito importantes na manutenção da homeostase, como, por exemplo, coagulação, transporte de gases e resposta imune, respectivamente (Snyder & Sheafor, 1999; Tavares-Dias & Oliveira, 2009; Zimmerman et al., 2010). Sabem-se detalhes sobre as características básicas, tais como morfologia (Azwai et al., 2007), ultraestrutura (Williams et al., 2009), mecanismos moleculares e funções fisiológicas (Falanga et al., 2000). Além disso, os órgãos ou tecidos de origem destas células (Palis, 2014) e seus processos de diferenciação e maturação (Yang et al., 2013) são bem definidos. Mesmo para os vertebrados mais basais, o estado do conhecimento é avançado (Old & Huveneers, 2006; Arikan & Çiçek, 2014) e isso pode ser constatado pelo fato de que até patologias apresentadas pelas células sanguíneas destes animais são conhecidas (Maciel et al., 2011; Sailasuta et al., 2011). Este cenário, no entanto, não é o mesmo para a maioria dos invertebrados.

Invertebrados também possuem células circulantes com características funcionais similares às encontradas nos vertebrados, embora recebendo nomes distintos devido às diferentes organizações corporais. Nos grupos mais basais, tais como Porifera, Cnidaria e Platyhelminthes, os quais não apresentam uma cavidade corporal preenchida por fluido, estas células são comumente denominadas de amebócitos, células intersticiais ou neoblastos (Frank et al., 2004). Nos mais derivados como os Mollusca, Arthropoda, ou Echinodermata, os quais possuem uma cavidade preenchida com fluido denominada de hemocel ou celoma, as células livre-circulantes são denominadas coletivamente de hemócitos e/ou celomócitos respectivamente (Tahseen, 2009).

Dentre os grupos que apresentam celoma, temos os Echinodermata. Este filo é composto por deuterostômios (Figura 1) exclusivamente marinhos, que apresentam como características distintivas um endoesqueleto de carbonato de cálcio na forma de calcita, um sistema vascular aquífero e uma conspícua simetria radial pentâmera quando adultos (Pawson, 2007). As 7000 espécies de equinodermos (Pawson, 2007) são agrupadas em cinco classes bem distintas (Crinoidea, Asteroidea, Ophiuroidea, Echinoidea e Holothuroidea), cujo relacionamento filogenético ainda encontra-se sob

debate (Pisani et al., 2012; Reich et al., 2015). Duas hipóteses são atualmente aceitas para explicar as relações dentro de Echinodermata (*i.e.* Asterozoa e Cryptosyringida), e o ponto contrastante reside no posicionamento da classe Ophiuroidea (Figura 2). Na hipótese Aterozoa, Ophiuroidea e Asteroidea formam um grupo monofilético (Asterozoa), que é grupo-irmão de Echinozoa (Echinoidea + Holothuroidea). Por outro lado, a segunda hipótese pontua que Ophiuroidea seria o grupo irmão de Echinozoa, formando o clado Cryptosyringida (Ophiuroidea + (Echinoidea + Holothuroidea) (Figura 2). Embora ambas as hipóteses sejam constatemente pontuadas, a hipótese Asterozoa vem ganhando cada vez mais suporte (Telford et al., 2014; Reich et al., 2015).

Do ponto de vista fisiológico, os equinodermos são desprovidos de sistemas respiratórios e circulatórios especializados, como visto nos deuterostômios mais derivados (*e.g.* Vertebrata), contudo, o fluido celomático e seus componentes celulares (celomócitos) têm sido pontuados por desempenhar diversas das funções fisiológicas fundamentais, tais como nutrição e imunidade (Booolotian, 1966; Smith et al., 2010). Tradicionalmente, estes celomócitos são identificados por características morfológicas superficiais e divididos em seis categorias principais: fagócitos ou amebócitos, hemócitos, células cristal, células progenitoras, células vibráteis e esferulócitos (Chia & Xing, 1996). No entanto, estes tipos celulares não se distribuem igualmente entre os grupos internos de Echinodermata. Em Asteróides, por exemplo, fagócitos são constantemente pontuados como o principal (ou o único) tipo celular existente (Kaneshiro & Karp, 1980; Coteur et al., 2002), enquanto que em Holothuroidea, as seis grandes categorias são comumente descritas (Xing et al., 2008).

Para os Echinoidea, o grupo mais conhecido de equinodermos, quatro tipos celulares têm sido comumente mencionados: fagócitos, células vibráteis, e os esferulócitos vermelho e transparente (Smith et al., 2006; 2018). No entanto, estes tipos são característicos dos equinóides regulares (*i.e.* ouriços-do-mar), e alguns trabalhos chegam a pontuar que estes são os únicos tipos celulares presentes na classe Echinóidea (Karp & Cofaro, 1982; Cavey & Märkel, 1994). Contudo, embora equinóides regulares possam ser os equinóides mais conhecidos, equinóides irregulares (*i.e.* bolachas-do-mar e ouriços cordiformes) formam um grupo bem consistente e diverso denominado Irregularia (Figura 3), que contém uma maior diversidade de espécies que entre os ouriços regulares (Kroh & Mooi, 2019). Estudos abordando as células dos equinóides irregulares são escassos e restritos geralmente a descrição dos tipos celulares existentes

(Kawaguti & Yamasu, 1976), com pouquíssimos trabalhos abordando aspectos fisiológicos nestes animais (Bookhout & Greenburg, 1940).

Figura 1 – Filogenia dos Deuterostomia, destacando a posição dos equinodermos e sua relação com os outros deuterostomados. Adaptado de Grahnan & Richardson, 2012.

Figura 2 – Hipóteses concorrentes das relações filogenéticas entre os equinodermos existentes. Adaptado de Reich et al., 2015.

Figura 3 – Entendimento atual das relações filogenéticas dentro da classe Echinoidea. Adaptado de Ziegler et al., 2009.

Apesar do papel fundamental que os celomócitos desempenham na fisiologia dos Echinodermata, e consequentemente dos Echinoidea, e do alto nível de conhecimento em relação às células celômicas dos equinóides, estudos investigando as grandes questões envolvendo estas células ainda são necessários (Chia & Xing, 1996). Por exemplo, com relação aos tipos celulares presente na classe Echinoidea, é notório que a grande maioria dos dados provém de estudos com ouriços regulares (Smith et al., 2006; 2010; 2018). No entanto, exceto para os fagócitos, que têm sido bem estudados tanto em relação à quantidade de subpopulações quanto em relação às respectivas morfologias (Edds, 1993), existe uma carência de informação para os outros tipos. Para os esferulócitos, existem informações conflitantes sobre a quantidade real de tipos existentes, onde tem sido descrito que a quantidade pode variar entre duas a quatro (Chien et al., 1970; Vethamany & Fung, 1972). De fato, um trabalho recente fez uma caracterização morfológica detalhada dos esferulócitos de *Eucidaris tribuloides*, mostrando que, pelo menos para esta espécie, existem três subpopulações de esferulócitos (Queiroz & Custódio, 2015). Para a célula vibrátil, trabalhos mais detalhados ainda se fazem necessários.

Outra questão interessante pode ser vista em relação à natureza química das inclusões citoplasmáticas dos esferulócitos e da célula vibrátil. Dentre os esferulócitos, apenas o conteúdo de um tipo é relativamente bem conhecido: o *esferulócito vermelho*.

Este celomócito contém Equinocromo-A (Service & Wardlaw, 1984; Ageenko et al., 2011), uma naftoquinona que dá a cor avermelhada característica desta célula e é dita por possuir função antioxidante, antibacteriana e antifúngica, antitumoral ou como tendo participação em reações imunes (Koltsova et al., 1981; Ageenko et al., 2011). Para os outros esferulócitos e a célula vibrátil, as informações são mais gerais, frutos de análises citoquímicas (Liebman, 1950; Johnson, 1969b; Queiroz & Custódio, 2015). Observaram-se mucopolissacarídeos e proteínas respectivamente, no conteúdo das esférulas citoplasmáticas dos esferulócitos transparente e granular de *Eucidaris tribuloides* (Queiroz & Custódio, 2015). Para a célula vibrátil, sabe-se que as esférulas são preenchidas com glicosaminoglicanos (Johnson, 1969b).

Uma questão crucial no estudo dos celomócitos de Echinodermata, e que ainda parece estar longe de ser resolvida, é o isolamento/separação das frações celulares (Chia & Xing, 1996). Independente do objetivo do estudo, os trabalhos que abordam os celomócitos utilizam duas abordagens principais: uma suspensão de células contendo todas as subpopulações celulares (Johnsson, 1969a), ou uma suspensão enriquecida, contendo um tipo celular predominante (Arizza et al., 2007). Embora algumas frações possam ter um alto grau pureza (e.g. esferulócitos vermelhos – Arizza et al., 2007), as técnicas usualmente empregadas ainda não permitiram o isolamento completo dos tipos celulares (Chia & Xing, 1996). Mesmo, técnicas mais avançadas, como por exemplo, a citometria de fluxo, têm se mostrado pouco eficientes na resolução desta questão (McCaughey & Bodnar, 2012).

Para as funções fisiológicas dos celomócitos dos Echinodermata, o principal modelo de estudo tem sido os Echinoidea, com um alto nível de conhecimento para estes animais (Smith et al., 2018), se comparado com os outros grupos de equinodermos (Ramírez-Gómez & García-Arrarás, 2010). Sabe-se que os fagócitos são os principais efetores imunes, estando envolvidos em uma ampla variedade de funções, tais como fagocitose, regeneração, encapsulamento, rejeição de enxerto, dentre outras (Smith et al., 2006). Para os esferulócitos vermelho e transparente, sabe-se do seu ativo envolvimento com atividade bactericida e citotóxica, respectivamente (Arizza et al., 2007; Coates et al., 2018). Para a célula vibrátil, a função ainda continua sob debate, mas duas hipóteses são atualmente aceitas: envolvimento na movimentação do fluido celômico e/ou coagulação (Smith et al., 2010). Para o recém descrito esferulócito granular de *E. tribuloides*, não há dados de função.

Outro ponto de relevância acerca dos celomócitos de Echinodermata, e consequentemente dos Echinoidea, é em relação a onde estas células são formadas. A pergunta consiste especificamente em saber o local onde os celomócitos se originam, e existem duas hipóteses acerca deste aspecto (Matranga, 2005). A primeira propõe a existência de um órgão celomopoiético, que no caso dos Echinoidea seria o órgão axial, de onde as subpopulações celomócitos seriam originadas (Millott 1969; Bachmann & Goldschmid 1978). A segunda hipótese propõe a existência de uma célula multipotente livre no fluído celômico (*i.e.* célula progenitora) capaz de originar as demais subpopulações (Smith, 1981). Por fim, outra questão extremamente relacionada à origem das células, mas pouco abordada, é a existência de um processo de maturação para os celomócitos. Embora existam evidências de maturação, tanto a para células formadas em um possível órgão celomopoiético (Bachmann & Goldschmid, 1978), como para células originadas a partir de uma célula progenitora (Fontaine & Hall, 1981; Queiroz and Custódio, 2015), o assunto ainda necessita ser abordado adequadamente para responder esta questão.

Isso mostra que mesmo para equinóides regulares, que são os principais modelos de estudo dentro dos Echinodermata, pontos chave ainda necessitam de elucidação. Neste sentido, este trabalho se dispôs a investigar alguns destes pontos básicos, que ainda permanecem em aberto. Dentre as questões abordadas aqui, tentamos responder as seguintes perguntas: Quantos tipos celulares ocorrem nos Echinoidea? Como se dá a sua distribuição entre os equinóides regulares e irregulares? Quais as funções fisiológicas dos esferulócitos e da célula vibrátil? Estas células cooperam durante um desafio imune?

Considerações finais e perspectivas

DIVERSIDADE DE CELOMÓCITOS EM ECHINOIDEA

A classe Echinoidea tem sido, sem sombra de dúvida, a mais estudada em Echinodermata com relação aos celomócitos e consequentemente é a que possui a maior quantidade de informação (Smith et al, 2006; 2010; 2018). No entanto, a diversidade dos tipos celulares tem sido subestimada. Este fato pode ser observado em alguns estudos/revisões, onde somente as células dos ouriços regulares têm sido consideradas (Karp and Cofaro, 1982; Cavey and Märkel, 1994). O presente estudo mostrou dois pontos importantes: (I) a diversidade de celomócitos nos ouriços irregulares é muito maior do que tem sido registrada na literatura corrente, principalmente em relação aos Clypeasteroidea (bolacas-do-mar), onde somente para este grupo, cinco novos tipos de esferulócitos foram registrados; (II) mesmo para os tão bem estudados ouriços regulares, a diversidade de tipos celulares é maior do que a que tem sido pontuada. Além disso, embora o atual trabalho tenha sido restrito aos equinóides, é a primeira vez que um enfoque evolutivo é dado ao estudo dos celomócitos em Echinodermata, revelando padrões interessantes de distribuição das células, que parecem estar ligados às características fisiológicas das células. Por fim, a caracterização das células das espécies do gênero *Paracentrotus* trouxeram resultados interessantes, onde o esferulócito granular e a célula cristal foram observados em *P. gaimardi*, e para *P. lividus*, uma das espécies mais estudadas do mundo, um novo tipo celular também foi encontrado – o esferulócito granular. Isso nos mostra que mesmo para os ouriços regulares, os principais modelos de estudo em Echinodermata, a diversidade de tipos celulares ainda não é completamente entendida e merece ser revisitada.

MORFOLOGIA CELULAR E O ESTUDO DAS POPULAÇÕES CELÔMICAS EM ECHINODERMATA

Tradicionalmente em Echinodermata, e principalmente em Echinoidea, o estudo dos celomócitos tem se dado por meio de abordagens morfológicas, usando células vivas em suspensão ou microscopia eletrônica de transmissão (Johnson, 1979a; Chien et al., 1970), com pouquíssimos estudos se dispondo a utilizar preparações citoquímicas (Liebman, 1950; Johnson, 1979b). Para os pouquíssimos estudos citoquímicos, o método comumente empregado para aderir as células às lâminas (*i.e.* o espalhamento de células vivas) também tem se mostrado problemático, uma vez que o

mesmo tipo celular pode espalhar de maneiras diferentes, dificultando a identificação. Neste trabalho, também utilizamos uma abordagem morfológica, mas sob uma diferente perspectiva: uma abordagem integrativa (Queiroz & Custódio, 2015). Diferentes dos outros trabalhos, as abordagens utilizadas, foram consideradas conjuntamente, utilizando a informação de cada técnica de forma integrada. Para isso, abordamos a morfologia dos diferentes tipos celulares, utilizando várias técnicas diferentes (*e.g.* células vivas em suspensão, preparações citoquímicas, microscopia eletrônica de transmissão e varredura e espectroscopia de raios-X). Os dados oriundos destas técnicas possibilitaram não só uma caracterização morfológica mais acurada, como também a obtenção de dados relativos a outros aspectos, tais como a natureza química das inclusões citoplasmáticas e a descrição de um processo de maturação. Além disso, observamos que a utilização da citocentrifugação no preparo das lâminas para as análises citoquímicas e de microscopia de varredura foi um ponto positivo neste estudo. Esta técnica, que utiliza um princípio físico (*i.e.* a força de centrifugação) para aderir as células à lâmina, faz com que os diferentes tipos celulares apresentem sempre as mesmas características, propiciando a comparações entre diferentes equinóides (*e.g.* a célula vibrátil em *E. tribuloides* e em *C. subdepressus*). Com isso, este trabalho reforça a importância de estudos morfológicos mais detalhados para o conhecimento das populações celulares, mostrando que dados interessantes podem ser obtidos com este tipo de abordagem.

ISOLAMENTO DAS FRAÇÕES CELULARES

A separação das diferentes subpopulações de celomócitos em Echinodermata há muito tem sido um grande problema (Chia & Xing, 1996). Trabalhos que buscam fracionar estas populações, se utilizam de centrifugação por gradientes de densidades que obtêm subpopulações enriquecidas com variáveis níveis de pureza (Ariza et al., 2007; Kudryavtsev et al., 2016), mas não são capazes de produzir frações puras. Mesmo métodos mais sofisticados, como a citometria de fluxo, não tem produzido bons resultados (McCaughey & Bodnar, 2012; Kudryavtsev et al., 2016). O motivo disso talvez resida em dois principais fatos: a falta de marcadores celulares específicos, e a sobreposição de diferentes tipos por apresentarem características morfológicas (*e.g.* tamanho e granulosidade) similares (Chia & Xing, 1996; Queiroz & Custódio, 2016). No entanto, o método utilizado aqui, a citometria de fluxo por imagem, se mostrou bastante

eficiente. Este método junta a possibilidade de observação da morfologia celular – o único critério confiável até o momento para a distinção dos tipos celulares – com a análise de uma enorme quantidade de células, o que propicia uma identificação acurada juntamente com a possibilidade da análise das condições fisiológicas. Além disso, pela primeira vez obteve-se um gate específico e replicável para a célula vibrátil, além de dados experimentais corroborando a sua participação na resposta imune.

FUNÇÃO FISIOLÓGICA DOS CELOMÓCITOS

Em Echinoidea, o nível de informação sobre a fisiologia dos celomócitos é bastante significativo (Smith et al, 2006; 2010; 2018). Sabe-se, por exemplo, do envolvimento dos fagócitos com as atividades de fagocitose, encapsulamento e rejeição de enxertos (Smith et al., 2006). Já os esferulócitos transparente e vermelho estão ligados à atividade citotóxica e bactericida respectivamente (Arizza et al., 2007; Coates et al., 2018). Para o último, muito detalhes são conhecidos, variando desde a função da célula, o composto responsável pela atividade bactericida e o modo de ação da molécula. No presente estudo, adicionamos informações sobre dois aspectos importantes do funcionamento do esferulócito vermelho: o mecanismo pelo qual a célula libera o equinocromo, e alguns dos fatores que afetam o processo. Para a célula vibrátil, especula-se seu envolvimento em movimentação do fluido celômico ou com funções imunes, mais especificamente coagulação. Para esta última célula, nosso estudo corrobora o seu envolvimento com o sistema imune, dadas as observações de dinâmica celular diferenciada após a infecção bacteriana. Para o esferulócito granular, nenhuma informação funcional foi obtida. No entanto esta célula é bastante similar, em morfologia e características citoquímicas, ao esferulócito acidofílico de *Holothuria tubulosa*, que tem sido relacionado com atividade citotóxica nesta espécie (Vazanna et al., 2018), sugerindo o envolvimento do esferulócito granular no processo. Para os esferulócitos dos ouriços irregulares, mesmo para as células similares às dos ouriços regulares, muito pouco é conhecido, e nada se sabe sobre os tipos novos observados aqui.

COOPERAÇÃO DOS CELOMÓCITOS DURANTE DESAFIOS IMUNES

Como mostrado no trabalho publicado por Arizza e colaboradores (2007), o esferulócito transparente parece ter sua atividade maximizada na presença de fagócitos, e o autor sugere que a atividade citotóxica deve ser modulada graças a algum composto liberado pelos fagócitos. No trabalho de Vazzana e colaboradores (2015), foi observado que durante a cicatrização em *Holothuria tubulosa* a diminuição do número de células progenitoras, 2,5 h após a injúria, foi seguida por um aumento do número de esferulócitos. No nosso estudo observou-se uma aparente cooperação entre fagócitos, esferulócitos vermelhos e as células vibráteis. Trabalhos com este escopo, com evidências sobre os diferentes tipos celulares em uma dada situação experimental, se fazem necessários para o estudo das funções dos celomócitos. Assim como observado para o esferulócito transparente (Arizza et al., 2007), pode ser que a análise separada de um tipo celular específico não mostre a sua real função, visto que ele pode necessitar da atividade de outro tipo celular para exercer a sua função corretamente ou que ele coopere na função de outra subpopulação. Portanto, mais estudos analisando todos, ou muitas das subpopulações se fazer necessários para compreender a real função dos esferulócitos.

PERSPECTIVAS NO ESTUDO DOS CELOMÓCITOS DE ECHINODERMATA

Os novos dados encontrados neste trabalho respondem, ou pelo menos apontam o caminho a ser seguido, algumas das grandes questões envolvendo os celomócitos dos Echinodermata. Foi possível ver neste trabalho a diversidade de tipos de celomócitos em Echinoidea, estudados sob uma perspectiva evolutiva, juntamente com o estudo aprofundado das células celômicas de uma das espécies mais estudadas do mundo: *Paracentrotus lividus*. Além disso, apresentamos a caracterização morfológica detalhada da célula vibrátil, um dos celomócitos mais intrigantes nos equinodermos, juntamente com dados funcionais que corroboram a função imune desta célula. Por fim, analisamos o mecanismo de liberação de Echinochromo pelo esferulócito vermelho de *P. lividus*, alguns dos fatores que afetam o processo, e que esta célula pode ser utilizada como um bioindicador de estresse fisiológico em ouriços-do-mar.

Apesar de toda informação obtida neste trabalho, questões relevantes, tais como o conteúdo estocado pelos esferulócitos e pela célula vibrátil, a suas respectivas

funções fisiológicas bem como o seu local de origem ainda continuam sem respostas definitivas. Contudo, pelo menos para as duas primeiras questões, parece que os primeiros passos foram dados nesse trabalho. Observamos que os esferulócitos transparente e granular estocam mucopolissacarídeos e proteínas respectivamente, enquanto a célula vibrátil acumula glicosaminoglicanos. Para esta última célula também observamos que a quantidade de nitrogênio citoplasmático é pequena, corroborando a ideia de esférulas não são preenchidas com material proteico. Com relação às funções fisiológicas, observamos que a célula vibrátil de fato parece estar envolvida com resposta imune, (*i.e.* coagulação), enquanto o esferulócito granular pode estar relacionado com atividade citotóxica.

Por fim, os resultados alcançados aqui também levantam mais questionamentos, como por exemplo: 1 – Seriam os esferulócitos dos ouriços irregulares, células com diferentes morfologias e funções similares ou células morfológica e funcionalmente diferentes? 2 – Qual a função fisiológica dos esferulócitos dos ouriços irregulares? 3 – O que pode ter guiado a diversificação dos esferulócitos em Echinoidea? 4 – Qual a função fisiológica do esferulócito granular de *P. lividus*? 5 – Qual o mecanismo de ação da célula vibrátil? 6 – Quais os mecanismos moleculares envolvidos com a liberação do equinocromo dos esferulócitos vermelhos? 7 – Os esferulócitos vermelhos podem realmente ser utilizados como um indicador de saúde nos equinoides? 8 – Organismos basobiontes relamente podem alterar homeostase dos seus basobiontes? Assim, embora este trabalho tenha certamente contribuído para o entendimento da fisiologia dos Echinodermata, estas e outras perguntas ainda continuarão aguçando a curiosidade dos fisiólogos que trabalham com equinodermos.

REFERÊNCIAS

- Ageenko VN, Kiselev KV, Odintsova NA. 2011. Expression of Pigment Cell-Specific Genes in the Ontogenesis of the Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius*. Evidence-Based Comp. Alter. Med., 2011: 9p.
- Arikan H, Çiçek K. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review. North-Western J. Zoo, 10(1):190-209.
- Arizza V, Giaramita F, Parrinello D. 2007. Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. Comp. Biochem. Physiol. A, 147:389-394.
- Azwai SM, Abdousslam OE, Al-Bassam LS. 2007. Morphological characteristics of blood cells in clinically normal adult llamas (*Lama glama*). Veterinarski Arhiv 77(1):69-79.
- Bachmann S, Goldschmid A. 1978. Fine structure of the axial complex of *Sphaerechinus granularis* (Lam.) (Echinodermata: Echinoidea). Cell Tissue Res 193:107–123.
- Bookhout CG, Greenburg ND. 1940. Cell types and clotting reactions in the echinoid, *Mellita quinquiesperforata*. The Biological Bulletin, 79(2): 309-320.
- Boolotian RA. 1966. Physiology of Echinodermata. Interscience Publishers, N.Y. 822p.
- Cavey MJ, Märkel K. 1994. Echinoidea. In: Harrison, F. W. & Chia, F. S. (Eds.). Microscopic Anatomy of Invertebrates, Echinodermata (Vol. 14). Wiley-Liss. (pp. 345-400).
- Chia F, Xing J. 1995. Echinoderm Coelomocytes. Zoological Studies 35(4):231-254.
- Chien PK, Johnson PT, Holland ND, Chapman FA. 1970. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*) IV. Ultrastructure of the coelomocytes. Protoplasma 71:419–442.
- Coates CJ, McCulloch C, Betts J, Whalley T. 2018. Echinochrome A release by red spherule cells is an iron-withholding strategy of sea urchin innate immunity. Journal of innate immunity, 10(2): 119-130.
- Coteur G, DeBecker G, Warnau M, Jangoux M, Dubois P. 2002. Differentiation of immune cells challenged by bacteria in the common European starfish, *Asterias rubens* (Echinodermata). European Journal of cell biology, 81(7), 413-418.
- Edds KT. 1993. Cell biology of echinoid coelomocytes. Journal of Invertebrate Pathology 61:173–178. doi:10.1006/jipa.1993.1031
- Falanga A, Marchetti M, Evangelista V. 2000. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood, 96(13):4261-4266.

- Fontaine AR, Hall BD. 1981. The haemocyte of the holothurians *Eupentacta quinquesemita*: ultrastructure and maturation. *Can. J. Zool.* 59: 1884-1891.
- Frank U, Plickert G, Müller WA. 2004. Cnidarian Interstitial Cells: The Dawn of Stem Cell Research. *In*: Rinkevich B, Matranga V. (Eds). *Stem Cells in Marine Organisms*. 33-59.
- Graham A, Richardson J. 2012. Developmental and evolutionary origins of the pharyngeal apparatus. *Evodevo*, 3(1), 24.
- Johnson PT. 1969a. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*). I. The normal coelomocytes; their morphology and dynamics in hanging drops. *Journal of Invertebrate Pathology* 13:25–41. doi:10.1016/0022-2011(69)90236-5.
- Johnson PT. 1969b. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*) II. Cytochemistry of the Coelomocytes. *Histochemie* 17:213–231. doi:10.1007/BF00309866.
- Kaneshiro ES, Karp RD. 1980. The ultrastructure of coelomocytes of the sea star *Dermasterias imbricate*. *Biol. Bull.*, 159: 295-310.
- Karp RD, Coffaro KA. 1982. Cellular Defense Systems of the Echinodermata. *In*: Cohen N, Sigel MM. (Eds). *Phylogeny and Ontogeny*. Springer, Boston, MA.
- Kawaguti S, Yaimasu T. 1954. Pigment cells in the perivisceral fluid of the Echinoidea. *Biological Journal of Okayama University*, 1: 249-264
- Koltsova EA, Boguslavskaya LV, Maximov OV. 1981. On the functions of quinonoid pigment production in sea urchin embryos. *Inter. J. Inver. Repro*, 4:17–28.
- Kroh A, Mooi R. 2019. World Echinoidea Database. Available from: [http://www.marinespecies.org/echinoidea/aphia.php?p=browser&accepted=1&id\[\]=149854&id\[\]=510499#focus](http://www.marinespecies.org/echinoidea/aphia.php?p=browser&accepted=1&id[]=149854&id[]=510499#focus) (accessed 04 December 2019)
- Kudryavtsev IV, D'yachkov IS, Mogilenko DA, Sukhachev AN, Polevshchikov AV. 2016. The functional activity of fractions of coelomocytes of the starfish *Asterias rubens* Linnaeus, 1758. *Russian Journal of Marine Biology*, 42(2): 158-165.
- Liebman E. 1950. The leucocytes of *Arbacia punctulata*. *Biological Bulletin* 98:46–59. doi:10.2307/1538598.
- Maciel PO, Affonso EG, Boijink CL. 2011. *Myxobolus* sp. (Myxozoa) in the circulating blood of *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Characidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, 20(1):82-84.
- Matranga, V, Pinsino A, Celi M, Natoli A, Bonaventura R, Schröder HC, Müller WE. 2005. Monitoring chemical and physical stress using sea urchin immune cells. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 39:85–110.

- McCaughey C, Bodnar A. 2012. Investigating the Sea Urchin Immune System: Implications for Disease Resistance and Aging. *J. Young Invest.*, 23(6):25-33.
- Millott N. 1969. Injury and the axial organ of echinoids. *Experientia* 25:756.
- Old JM, Huveneers C. 2006. Morphology of the blood cells from three species of Wobbegong sharks (*Orectolobus* species) on the east coast of New South Wales. *Zoo Biol*, 25(1):73-82.
- Palis J. 2014. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Fron. Phys*, 5(3):1-9.
- Pawson DL. 2007. Phylum Echinodermata. *Zootaxa*, 1668: 749-764.
- Pisani D, Feuda R, Peterson KJ, Smith AB. 2012. Resolving phylogenetic signal from noise when divergence is rapid: A new look at the old problem of echinoderm class relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1): 27–34. doi:10.1016/j.ympev.2011.08.028
- Queiroz V, Custódio MR. 2015. Characterization of the spherulocyte subpopulations in *Eucidaris tribuloides* (Cidaroida: Echinoidea). *Italian Journal of Zoology*, 82(3): 338-348.
- Ramírez-Gómez F, García-Arrarás JE (2010) Echinoderm immunity. *ISJ*, 7:211-220.
- Reich A, Dunn C, Akasaka K, Wessel G. 2015. Phylogenomic Analyses of Echinodermata Support the Sister Groups of Asterozoa and Echinozoa. *PLoS ONE* 10(3): e0119627. doi:10.1371/journal.pone.0119627
- Sailasuta A, Satetasit J, Chutmongkonkul M (2011) Pathological Study of Blood Parasites in Rice Field Frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834). *Vet. Med. Inter*, 2011:1-5.
- Service M, Wardlaw AC. 1984. Echinochrome A as bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus Esculentus* (L.). *Comp. Bioch. Phys*, 79(B):161–165.
- Smith CL, Ghosh J, Buckley KM, Clow LA, Dheilly NM, Huag T, Henson JH, ChengMan Lun CL, Majeske AJ, Matranga V, Nair SV, Rast JP, Raftos DA, Roth M, Sacchi S, Schrankel CS, Stensvag K. 2010. Echinoderm immunity. *In*: Söderhäll K, editor. *Invertebrate immunity*. New York, NY: Landes Bioscience and Springer Science BusinessMedia. pp. 260–301.
- Smith LC, Arizza V, Hudgell MAB, Barone G, Bodnar AG, Buckley KM, Furukawa R. 2018. Echinodermata: the complex immune system in echinoderms. *In*: Cooper L. (Ed). *Advances in comparative immunology* (pp. 409-501). Springer, Cham.
- Smith LC, Rast JP, Brockton V, Terwilliger DP, Nair SV, Buckley KM, Majeske AJ. 2006. The sea urchin immune system. *Invertebrate Survival Journal* 3:25–39.

- Smith VJ 1981. The echinoderms. *In*: Ratcliffe NA, Rowley AF, (Eds). Invertebrate blood cells. New York, NY: Academic Press. 513–562.
- Snyder GK, Sheafor BA. 1999. Red Blood Cells: Centerpiece in the Evolution of the Vertebrate Circulatory System. *Amer. Zool.*, 39:189-198.
- Tahseen Q. 2009. Coelomocytes: Biology and Possible Immune Functions in Invertebrates with Special Remarks on Nematodes. *Inter. J. Zoo*, 13 p.
- Tavares-Dias M, Oliveira SR. 2009. A review of the blood coagulation system of fish. *R. bras. Bioci.*, 7(2): 205-224.
- Telford MJ, Lowe CJ, Cameron CB, Ortega-Martinez O, Aronowicz J, Oliveri P, 2014. Phylogenomic analysis of echinoderm class relationships supports Asterozoa. *Proc Biol Sci.* 281(1786), 20140479.
- Vazzana M, Celi M, Chiaramonte M, Inguglia L, Russo D, Ferrantelli V, Arizza V. 2018. Cytotoxic activity of *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) coelomocytes. *Fish & shellfish immunology*, 72: 334-341.
- Vazzana M, Siragusa T, Arizza V, Buscaino G, Celi M. 2015. Cellular responses and HSP70 expression during wound healing in *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788). *Fish & shellfish immunology*, 42(2): 306-315.
- Vethamany VG, Fung M (1972) The fine structure of coelomocytes of the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis* (Muller O.F.). *Can. J. Zool.* 50:77-81.
- Williams-III CR, Chapman GB, Blake AS. 2009. Ultrastructural study of the blood cells of the beluga whale, *Delphinapterus leucas*. *J Morphol* 209(1):97–110.
- Xing K, Yang HS, Chen MY. 2008. Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicus*. *Aquatic Biology*, 2(1): 85-92.
- Yang J, Zhang L, Yu C. 2013. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as a biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.*, 2(1):1-9.
- Ziegler A, Faber C, Bartolomaeus T. 2009. Comparative morphology of the axial complex and interdependence of internal organ systems in sea urchins (Echinodermata: Echinoidea). *Front Zool*, 6(1): 10.
- Zimmerman LM, Vogel LA, Bowden RM. 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *J. Exp. Biol.*, 213(5):661-671.