Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

Departamento de Fisiologia

Jaqueline Costal dos Santos

Ritmo Circadiano e Melatonina em Porífera

São Paulo

2017

Jaqueline Costal dos Santos

Ritmo Circadiano e Melatonina em Porífera

Circadian Rhythm and Melatonin in Porifera

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

Orientador: Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica

dos Santos, Jaqueline Costal

Ritmo Circadiano e Melatonina em Porifera / Jaqueline Costal dos Santos; orientador Márcio Reis Custódio. -- São Paulo, 2017.

71 f.

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

1. Melatonina. 2. Porifera. 3. Esponjas. 4. Ritmo Circadiano. I. Reis Custódio, Márcio , orient. II. Título.

Catalogação da Publicação
Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a)

Prof(a). Dr(a)

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

Orientador

Dedico este trabalho a minha mãe.

Por todas as tampas fechadas.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

“Quero ignorado, e calmo
Por ignorado, e próprio
Por calmo, encher meus dias
De não querer mais deles.

Aos que a riqueza toca
O ouro irrita a pele.
Aos que a fama bafeja
Embacia-se a vida.

Aos que a felicidade
É sol, virá a noite.
Mas ao que nada espera
Tudo que vem é grato”.

Fernando Pessoa

Agradecimentos

Ao professor Márcio Custódio, pela oportunidade de desenvolver um trabalho que mesmo cheio de pedras no caminho, desde o início é uma das coisas mais belas que já fiz. Pelas palavras sempre serenas e confortadoras, pela paciência, por não perder a esperança, por todas as piadas incompreendidas, pelas ideias incríveis, pela confiança e, principalmente, pelos ensinamentos. Levo-os comigo.

À professora Regina Markus, pela fundamental contribuição e sobretudo pela inspiração. Por todas as palavras que fizeram meus olhos cintilar. Por tornar a ciência algo tão lindo e empolgante.

Ao Sanseray, minha mais profunda gratidão. Por tornar possível, por acreditar, pela ajuda em todos os passos. Pelas correções, pelos conselhos e ensinamentos, pela paciência. Muito obrigada Sam.

Ao Vagner, pela disposição e paciência. Pelas conversas e risadas no laboratório. E especialmente pelas gambiarras geniais. Sem elas, a casa cai.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Isa, Liv, Nilvea, Pati e Vini, pelo companheirismo, pelas conversas, pelas risadas, pelas coletas, pelos perrengues. Enfim, pela amizade. Espero, mesmo longe, mantê-los comigo.

Aos amigos e companheiros de departamento, Elisa, Bruna, Faride e Marcelo. Pelas conversas, pelos bandejões, pela ajuda, pelos cafés e pela amizade.

Às minhas amigas de vida, companheiras indispensáveis, Luísa e Vanessa. Pelas conversas, pelas cervejas, pela amizade, pelo companheirismo. Amo vocês.

À minha irmã, pelo exemplo e pela cumplicidade. Por corrigir meu relatório mesmo não entendendo bulhufas e pelas estatísticas. Pelas conversas acaloradas. Pela ajuda e pelo companheirismo de toda vida. Amo você.

Aos meus pais, por tudo. Pelo carinho, pela paciência, pelo alicerce, pela ajuda. Enfim, por permitir que eu chegasse até aqui. Por me tornar, direta e indiretamente, aquilo que sou. Até que deu pra quebrar um galho. Amo vocês.

Sumário

Resumo.....	6
Abstract.....	7
1. Introdução.....	8
2. Objetivos.....	18
3. Materiais e Métodos.....	19
3.1. Escolha do modelo de trabalho.....	19
3.2. Análise dos ritmos de atividade.....	20
3.3. Análise das imagens.....	21
3.4. Análises estatísticas dos ciclos de contração.....	21
3.5. Detecção da melatonina.....	22
3.6. Dissociação celular.....	23
3.7. Análise da sinalização da melatonina in vitro.....	25
3.8. Análises estatísticas dos agregados.....	27
4. Resultados.....	28
4.1. Manutenção das esponjas.....	28
4.2. Análise dos ritmos de atividade.....	29
4.2.1 <i>Tethya maza</i>	29
4.2.2 <i>Hymeniacidon heliophila</i>	32
4.3. Detecção de melatonina.....	39
4.3.1. HPLC.....	39
4.3.2. ELISA.....	39
4.4. Análise da sinalização da melatonina in vitro.....	40
4.4.1. Ensaio com antagonista de receptores melatonina.....	40
4.4.2. Ensaio com melatonina.....	42
4.4.3. Ensaio com 10^{-5} M de luzindol na presença de concentrações crescentes de melatonina.....	43
5. Discussão.....	45
5.1. Manutenção das esponjas.....	45
5.2. Análise dos ciclos de contração.....	46
5.3. Mecanismos envolvidos nos processos de contração e relaxamento.....	50
5.4. Produção de melatonina e possíveis funções.....	52
5.5. Reagregação celular em esponjas e o possível envolvimento da melatonina.....	54

5.6. <i>Papel da melatonina na reagregação de células de esponja</i>	58
6. Conclusões	63
7. Referências	64

Resumo

Esponjas (filo Porifera) são consideradas representantes atuais dos primeiros metazoários, com origens evolutivas próximas da transição de uma organização unicelular para aquela multicelular. Toda sua fisiologia é baseada em células especializadas, sem órgãos ou tecidos verdadeiros como encontrados em outros animais. No entanto, a presença de um sistema fortemente integrado pode ser constatada em sua habilidade de contrair o corpo de maneira rítmica e coordenada, ainda que a dinâmica e o controle desse processo sejam pouco conhecidos. Neste trabalho, análises de imagens em time-lapse sob um ciclo claro-escuro (12:12h) e sob luz constante mostram que as espécies *Hymeniacidon heliophila* e *Tethya maza* exibem padrões distintos de contrações corpóreas rítmicas, com variações circadianas em suas amplitudes. Diferenças observadas nos perfis das curvas das duas espécies podem ser devidas a diferenças em seus habitats de origem e/ou a diferenças em suas estruturas corpóreas. A manutenção desses ritmos sob luz constante indica a presença de um relógio endógeno em ambos os animais. Entre as vias envolvidas na sinalização desses processos a mais ubíqua é a da melatonina, um hormônio cuja presença tem sido demonstrada em muitos filos animais, dos quais o mais basal é o Cnidaria. Considerando a ampla ação da melatonina como um sinalizador circadiano e a ausência de um sistema nervoso em esponjas, não seria surpreendente constatar um papel da molécula na coordenação dos movimentos desses animais. Ademais, o papel da molécula nas respostas imunes também já foi demonstrado ser de ampla distribuição. Nossas tentativas de revelar uma ação da molécula na reagregação celular de *H. heliophila* via receptores do tipo MT1 e MT2 não foram conclusivas. Alguns fatores que podem ter influenciado nas respostas divergentes da molécula são o estado imunitário e a presença de contaminantes no ambiente de origem do animal. Ainda, outros mecanismos de ação e/ou processos candidatos à ação da melatonina não devem ser descartados. Ainda que preliminares, nossos resultados são o primeiro relato da presença da melatonina no filo mais basal dentre os Metazoa.

Palavras-chave: Contrações, esponjas, ritmicidade, *Hymeniacidon heliophila*, *Tethya maza*, luzindol.

Abstract

Sponges (phylum Porifera) are considered current representatives of the first metazoans, with evolutionary origins close to the transition from a unicellular to a multicellular organization. All of its physiology is based on specialized cells, without organs or real tissues as found in other animals. However, the presence of a strongly integrated system can be verified in its ability to contract the body in a rhythmic and coordinated way, although the dynamic and the control of this process are little known. In this work, time-lapse image analysis under a light-dark cycle (12:12h) and constant light shows that the species *Hymeniacidon heliophila* and *Tethya maza* display different patterns of body contractions, with circadian variations in their amplitudes. These dissimilar contraction profiles of the two species can be due to their original habitats and/or in their body structures. The maintenance of these rhythms under constant light indicates the presence of an endogenous clock in both animals. Among the pathways that participate in this process the most ubiquitous is that of melatonin, a hormone whose presence has been demonstrated in several animals phyla, of which the most basal until now is Cnidaria. Considering the melatonin action as a circadian signal and the absence of a nervous system in sponges, it would not be surprising that this molecule participates in coordination in these animals. In addition, the melatonin role in the immune responses has also been shown to be widely distributed. Our attempts to reveal a molecule action in the *H. heliophila* cellular reaggregation via MT1 and MT2 receptors were inconclusive. Some of the factors that may have influenced the molecule divergent responses are the immunity condition and the presence of contaminants in the original environment of the animals. Still, other mechanisms and/or processes that are candidates for melatonin action should not be discarded. Although preliminary, our results are the first report of the presence of melatonin in the most basal phylum among the Metazoa.

Keywords: Contractions, sponges, rhythmicity, *Hymeniacidon heliophila*, *Tethya maza*, luzindole.

1. Introdução

A evolução dos metazoários permanece, ainda hoje, bastante imprecisa. Análises morfo-moleculares sugerem uma origem a partir de protozoários coloniais entre 1300-600 milhões de anos (Conway-Morris, 1998). Alguns parâmetros, como as sequências das subunidades do rRNA (Medina *et al.*, 2001), situam as esponjas na posição mais basal da filogenia desses organismos (Fig. 1). Em contrapartida, outros modelos, como dados genômicos e transcriptômicos (Hejnol *et al.*, 2009), sugerem os ctenóforos (filo Ctenophora) como os mais ancestrais dentre os metazoários. Não obstante, independentemente de sua posição mais aceita, é consenso que as esponjas são organismos extremamente basais que emergiram bastante cedo na evolução dos metazoários, o que se corrobora por seu registro fóssil que supera os 600 milhões de anos (Ellyot & Leys, 2007).

O filo Porifera integra animais marinhos e de água doce, sésseis e que se alimentam por filtração. São encontrados em todos os habitats aquáticos do globo, desde as regiões entre-marés até as fossas abissais, sendo bastante abundantes em zonas tropicais (Custódio & Hajdu, 2011; Ternon *et al.*, 2016). Sua classificação é ainda bastante controversa, questionando-se mesmo a monofilia do grupo (Borchiellini *et al.*, 2001). Atualmente, são reconhecidas 8622 espécies, classificadas em dois subfilos: Cellularia, que compreende as esponjas com células uninucleadas – essa com duas classes, Demospongiae (7156 spp.) e Calcarea (726 spp.) -, e Symplasma, com uma única classe, Hexactinellida (739 spp.), cujos representantes apresentam células multinucleadas (Simpson, 1984; Redmond *et al.*, 2014). No Brasil, foram catalogadas cerca de 350 espécies, de ambientes marinhos e continentais, sendo um grupo ainda pouco investigado (Custodio & Hajdu, 2011).

Figura 1. Filogenia de Metazoa representando várias novas e controversas hipóteses de evolução dos caracteres em relação a simetria bilateral, sistema nervoso central, segmentação e receptores esteroidais. PDA: último ancestral comum protostômio-deuterostômio; CNS: sistema nervoso central. Barras cheias indicam origem de um caracter; Barras abertas na mesma cor: perda do caracter. Barras cinzas: Dados mostram que a perda assumida de receptores esteroidais estão faltando (tirado de Sanetra et al., 2005).

Os poríferos são organismos com uma estrutura corpórea relativamente simples (Fig. 2). Possuem uma rede de câmaras e canais condutores de água, chamada de sistema aquífero, que pode variar bastante em complexidade a depender do plano corpóreo da esponja (Simpson, 1984). Células flageladas – coanócitos – presentes dentro das câmaras coanocitárias bombeiam água unidirecionalmente através dos canais e capturam partículas alimentares em uma rede de microvilos citoplasmáticos. Não há sistemas nervoso ou muscular definidos e nem tecidos

verdadeiros, *viz.* camadas de células com membrana basal e justapostas, conectadas por desmossomos (Nickel *et al.*, 2011). No entanto, apresentam células epiteliais regionalizadas e com funções específicas, que comumente chamamos de tecido: a pinacoderme e a coanoderme (Simpson, 1984; Elwanger & Nickel, 2006). Entre essas duas camadas celulares, está o mesohilo – um compartimento constituído de uma matriz colagenosa e células de diversos tipos, como arqueócitos totipotentes e células reprodutoras (Simpson, 1984; Borchellini, 2001). Apesar de sua aparente simplicidade estrutural, as esponjas apresentam uma grande complexidade molecular e um extenso repertório genético. Muitos de seus genes codificam para proteínas sinalizadoras regulatórias, várias das quais compartilhadas por metazoários mais derivados, como os mamíferos (Müller, 2003). Ademais, exibem comportamentos coordenados, como contrações rítmicas do corpo e canais aquíferos - as quais podem apresentar flutuações circadianas (Nickel, 2004), reações a estímulos externos (*i.e.*, temperatura, toque, substâncias químicas) e mesmo locomoção (Elwanger & Nickel, 2006).

Figura 2. (A) Diagrama ilustrando as diferentes organizações corpóreas encontradas em Calcarea e Demospongiae. (B) Microscopia eletrônica de varredura de uma espécie de Demospongie, *Ephydatia muelleri* (ec, canal exalante; cc, câmara coanocitária; exp, exopinacoderme) (Leys & Hill, 2012).

Os mecanismos e o controle destas reações corporais são pouco conhecidos. Ainda que não apresentem sistemas musculares organizados como os demais grupos, as esponjas possuem células contráteis chamadas miócitos ou actinócitos. Estas se assemelham estruturalmente às células do músculo liso, além de responderem de maneira semelhante à manipulação farmacológica (Jones, 1962; Elliot & Leys, 2007). Esponjas das classes Calcarea e Demospongiae podem controlar o influxo de água pela regulação da abertura e fechamento dos esfínteres ou regiões ao redor dos poros de seu sistema de canais aquíferos (Leys & Meech, 2006). A contração do corpo desses organismos é mais evidente quando do fechamento dos ósculos e poros inalantes, mas é observada também por toda superfície corpórea (Jones, 1962). Por meio de dados de microtomografia seguidos por reconstrução virtual 3D, demonstrou-se que o fenômeno da contração afeta o volume do sistema de canais, mas não o do mesohilo (Nickel *et al.*, 2011). Além disso, dados morfométricos fazem supor que tais contrações têm origem na superfície da esponja – i.e. nos pinacócitos – e se propagam por meio de uma

interação complexa entre diferentes fatores pouco conhecidos (Nickel *et al.*, 2011). Tais eventos ocorrem de maneira rítmica, e presume-se que seu principal papel possa ser o de eliminar detritos (Nickel, 2004). No entanto outras funções já foram sugeridas, como a de liberar substâncias ecotóxicas no meio (Ternon *et al.*, 2016). A lenta propagação desses movimentos - em *Tethya wilhelma* a propagação da contração ocorre em cerca de 20-50 min, sendo o relaxamento mais prolongado - torna improvável que sua condução seja elétrica (Nickel, 2004; Elliot & Leys, 2007). Somando-se a isso, não foram verificadas junções comunicantes entre suas células (Elliot & Leys, 2007).

Dada a ausência de um sistema nervoso distinto, Jones (1962) propôs alguns processos alternativos de condução dos sinais, quais sejam:

- 1) Queda local de pressão dentro do sistema de canais, que seria conduzida para partes mais distantes do organismo;
- 2) Condução mecânica por estiramento de células do epitélio contrátil (pinacoderme);
- 3) Liberação e distribuição de mensageiros químicos através do sistema aquífero ou do mesohilo; e
- 4) Condução através de junções comunicantes.

Entretanto, como ressaltam Elwanger & Nickel (2006), estes processos não explicam como são gerados e coordenados os ritmos endógenos observados nesses organismos. Considerando seu modo de vida sésil e filtrador, não surpreende que esses animais sejam capazes de reagir a uma grande gama de estímulos, garantindo, assim, respostas adequadas a variações do meio à que estão sujeitos. Nesse caso, uma comunicação via mensageiros químicos parece mais plausível. Uma série de estudos, utilizando diversos compostos, agonistas e antagonistas, candidatos à geração desses processos, têm sido realizados em esponjas e têm fortalecido bastante essa hipótese. A adição de substâncias como acetilcolina (ACh), glicina,

cafeína, óxido nítrico, serotonina, GABA e glutamato em concentrações específicas não só induzem contrações, bem como podem alterar a velocidade e a amplitude dos ritmos endógenos (Elwanger & Nickel, 2006). No entanto, as bases para a geração e coordenação dos comportamentos cíclicos, endógenos e mesmo circadianos verificados em esponjas permanecem incompreendidas.

Uma molécula que é candidata à geração dos padrões circadianos de contração em esponjas, e que pode nos auxiliar em muitas de nossas indagações relativas aos sistemas de sinalização e comunicação nesses organismos, é a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina. Fig. 3). Esse é um hormônio de ampla distribuição filogenética, detectado em todos os grandes grupos onde foi estudado: plantas, bactérias, protozoários, fungos, invertebrados e vertebrados (Vivien-Roels & Pévet, 1993; Hardeland & Poeggler, 2003; Bentkowski *et al.*, 2010). Foi primeiramente observada como uma substância presente na glândula pineal de bovinos em 1917 por McCord e Allen. Esses autores observaram que, ao ser aplicada na pele de peixes e anfíbios, tal substância promovia agregação dos melanóforos (grânulos contendo melanina) e uma consequente mudança na cor da pele desses animais (Roth *et al.*, 1980; Hardeland, 2008). Mais tarde, Lerner *et al.* (1958) isolaram essa substância e deram-na o nome de melatonina. A partir de então, com o desenvolvimento de técnicas mais acuradas de detecção, sua produção tem sido relatada para um grande número de órgãos extra-pineais, como retina, glândula Harderiana, pele, intestino e muitos outros (Roth, 1980; Mechawar & Anctil, 1997; Carrillo-Vico *et al.*, 2005; Hardeland, 2008). Sua ampla distribuição filogenética indica uma grande idade evolutiva, o que pode ter permitido seu uso para uma ampla gama de propósitos fisiológicos, embora suas propriedades físico-químicas não tenham sofrido modificações (Hardeland & Poeggeler, 2003; Carrillo-Vico *et al.*, 2005; Hardeland, 2008).

Figura 3. Estrutura molecular da melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina).

Nos vertebrados, onde sua atuação é bem caracterizada, uma das principais atribuições da melatonina é a de sinalizar a fase escura do dia, bem como a variação sazonal na luminosidade, chamada fotoperiodismo. Sendo assim, em todos os vertebrados observa-se um aumento noturno na produção e secreção do hormônio (Carrillo-Vico *et al.*, 2005). Todavia, essa associação não é universal. Em alguns não-vertebrados, foram verificados picos diurnos na concentração dessa indoleamina, como no crustáceo *Daphnia magna*, no qual foi observada uma resposta rítmica do hormônio ao estresse de predação (Markowska *et al.*, 2009). Em outros verificou-se uma divergência temporal entre os diferentes tecidos analisados, como é caso do molusco *Aplysia californica*, no qual foi constatado um pico diurno na concentração de melatonina nos olhos e noturno no gânglio cerebral (Abran *et al.*, 1994). Para alguns organismos, ainda, como na levedura *Saccharomyces cerevisiae* não foi verificada uma flutuação dependente da fase luminosa (Sprenger *et al.*, 1999).

Além de sua importante propriedade cronobiológica, essa molécula é responsável por uma série de outras funções, que podem variar entre os diferentes organismos, como eliminação de radicais livres, ação oncostática, regulação da massa corpórea, efeitos no citoesqueleto, dentre outras (Bubenik & Pang, 1997; Hardeland & Poeggeler, 2003; Carrillo-Vico *et al.*, 2005; Hardeland, 2008; Bentkowski *et al.*, 2010). Diversos estudos descrevendo efeitos do fotoperíodo no sistema imune têm sido publicados, confirmando a correlação entre os níveis de melatonina e a resposta imunológica de humanos e roedores (Markus *et al.*, 2007).

Em invertebrados foi demonstrado que a aplicação desse hormônio pode alterar a atividade locomotora no grilo *Acheta domesticus*, influenciar processos de regeneração na planária *Dugesia dorotocephala*, provocar alterações na reprodução do pulgão *Acyrtosiphon pisum* ou influenciar no comportamento migratório de *Daphnia magna*, entre outros (Yoshizawa, 1991; Gao & Hardie, 1997; Yamano *et al.*, 2001; Bentkowski *et al.*, 2010).

No sistema imune de vertebrados, esse hormônio foi observado no timo, baço, plaquetas, mastócitos e muitas outras células. Como essa molécula é altamente lipofílica e, portanto, atravessa facilmente a bicamada lipídica, consegue acessar vários tipos celulares (Benítez-King & Antón-Tay, 1993). Além disso, seus receptores estão distribuídos por diversos tecidos. Em mamíferos, dois subtipos de receptores acoplados à proteína G, MT1 e MT2 (Mel_{1a} e Mel_{1b}, na antiga terminologia), são responsáveis por mediar toda resposta cronobiológica (Hardeland, 2008). Suas ações podem ser complementares ou opostas, sendo possível diferenciá-los farmacologicamente. Esses receptores são amplamente expressos no núcleo supraquiasmático (NSQ) e no sistema hipófise anterior/eminência média, onde exercem um papel central no controle sazonal, principalmente da atividade reprodutiva (Lotufo *et al.*, 2001; Hardeland, 2008). Além de sua ampla distribuição no sistema nervoso central, também são expressos em muitos outros tecidos, como retina, vasculatura cerebral e periférica, glândula Harderiana, órgãos reprodutivos e córtex da adrenal. Nessas regiões, exercem uma ampla gama de ações, muitas das quais envolvidas em respostas imunomoduladoras. Em vertebrados não-mamíferos um terceiro receptor está ainda presente, Mel_{1c}, o qual não deve ser confundido com um sítio de ligação chamado MT3. O Mel_{1c} também é um receptor acoplado à proteína G, bastante homólogo aos MT1 e MT2. Foi identificado primeiramente em *Xenopus laevis* e, posteriormente, em aves e peixes (Ebisawa *et al.*, 1994; Reppert *et al.*, 1995; Lan-Chow-Wing *et al.*, 2014). Seu mecanismo de ação se assemelha muito ao mecanismo clássico dos receptores MT1 e MT2 e sua distribuição nesses animais é igualmente ampla. Já o sítio MT3 é uma

enzima quinona redutase à qual a melatonina se liga. Sua localização na célula ainda é incerta, mas é provável que seja uma enzima citosólica. Está presente em vários tecidos de mamíferos, incluindo o cérebro e apresenta uma menor afinidade pela melatonina do que a observada para os receptores MT1 e MT2, além de um perfil farmacológico distinto (Lotufo *et al.*, 2001; Hardeland, 2008). Ainda, outros sítios de ligação da melatonina podem ser encontrados. Em organismos unicelulares, fungos e plantas, nos quais a molécula está presente em altas concentrações, sua ação deve ocorrer via sítios intracelulares. Um desses sítios, de ampla distribuição, é a proteína calmodulina (Hardeland, 2008). Ainda, a ligação da melatonina a fatores de transcrição nucleares tem sido debatida. Sua ação via receptores nucleares da família ROR α , por exemplo, parece estar envolvida no processo de encistamento em dinoflagelados (Tsim *et al.*, 1996).

Maiores conhecimentos sobre as funções da melatonina foram obtidos a partir do rastreamento de enzimas envolvidas na sua biossíntese e no seu catabolismo. A síntese de melatonina pineal, que na maioria dos vertebrados é o principal sítio de sua produção, é iniciada com a hidroxilação de triptofano a 5-hidroxitriptofano (5-HTP), que é então descarboxilado à 5-hidroxitriptamina ou serotonina (5-HT). A partir daí a serotonina pode sofrer N-acetilação pela arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) formando N-acetilserotonina (NAS), precursor direto da melatonina via enzima ASMT (Vivien-Roels & Pévet, 1993; Hardeland & Poeggeler, 2003; Hardeland, 2008). Na síntese da melatonina extrapineal e em invertebrados, outras enzimas podem estar envolvidas e a regulação dos mecanismos pode ser diferente (Vivien-Roels & Pévet, 1993; Hardeland & Poeggeler, 2003). Enquanto, por exemplo, a melatonina da glândula pineal é amplamente regulada pela norepinefrina, a biossíntese da melatonina da retina é regulada por receptores GABA_A e GABA_B (Hardeland, 2008).

Apesar de sua ubiquidade e comprovada importância, o conhecimento da presença e ações da melatonina em grupos mais basais ainda é bastante escasso (Vivien-Roels & Pévet, 1993; Hardeland & Poeggeler, 2003). Estudos comparativos são necessários para responder muitas questões que permanecem em aberto, tais como a localização das células onde ocorre sua síntese, as células-alvo e a identificação de seus receptores nos tecidos (Vivien-Roels & Pévet, 1993). Curiosamente, até o momento, não há trabalhos relatando sequer a presença da melatonina em Porifera. Informações sobre sua presença e as consequências de sua variação seriam de extrema relevância, uma vez que os ancestrais das atuais esponjas são considerados como os primeiros animais multicelulares a terem surgido no planeta. Como exposto, esses animais não possuem órgãos ou tecidos desenvolvidos como os encontrados em outros metazoários mais derivados, e toda sua fisiologia é baseada em tipos celulares especializados. Sendo assim, sua posição na escala filogenética os torna modelos ideais para estudar não apenas o papel da molécula no próprio grupo, mas também a evolução dos sistemas de sinalização em organismos multicelulares (Dohrmann *et al.*, 2008; Custódio e Hadju, 2011).

2. Objetivos

- Verificar padrões de ritmos de atividade em esponjas;
- Identificar melatonina e investigar sua função em Porifera, determinando:
 - Os efeitos de diferentes concentrações de luzindol e de melatonina sobre a reagregação celular de esponjas;
 - Se os efeitos de luzindol sobre a reagregação celular podem ser revertidos por concentrações crescentes de melatonina.

3. Materiais e Métodos

3.1. Escolha do modelo de trabalho

Durante a realização do trabalho, foi testada a manutenção de cinco espécies em laboratório: de ambiente marinho as Demospongiae *Hymeniacidon heliophila* (Halichondriidae, Fig. 4) e *Tethya maza* (Tethyidae); e a Calcarea *Sycon* sp. (Sycettidae). De água doce, as Demospongiae *Drulia brownii* (Metaniidae) e *Metania reticula* (Metaniidae).

Figura 4. Exemplar de *H. heliophila*.

Para *H. heliophila*, foram realizadas 15 coletas em duas regiões entremarés localizadas no estado de São Paulo – Ilha Porchat (São Vicente) e Praia do Araçá (São Sebastião). Para transporte, os animais foram armazenados em frascos plásticos com água do mesmo local de coleta e condicionados em caixas de isopor refrigeradas ($\sim 20^{\circ}\text{C}$). Em laboratório, as esponjas foram mantidas em aquários de 80 litros, com água do mar natural, na densidade de cinco esponjas por aquário, em temperatura aproximada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob regime natural de luminosidade. No caso de *T. maza*, foram coletados três exemplares da espécie na Praia de Tarituba (Paraty, RJ), os quais foram transportados e mantidos de maneira análoga. A terceira espécie testada foi uma pequena esponja calcárea de ocorrência comum, mas eventual, em alguns aquários marinhos, identificada preliminarmente como *Sycon* sp. Exemplares dessa espécie foram obtidos de aquários da empresa Eco-Reef Invertebrados Marinhos Ornamentais

Ltda em oito coletas, tendo sido variadas as condições de manutenção, como temperatura (de 18 a 26°C), alimentação (diferentes quantidades de alimento suspenso na água) e grau de agitação.

Ainda, foram obtidas gêmulas de esponjas de água-doce das espécies *D. brownii* (coletadas na região de Santarém, PA) e *M. reticulata* (em Guajará-Mirim, RO). As gêmulas foram armazenadas em potes plásticos secos e transportadas em caixas de isopor em temperatura ambiente. No laboratório, foram armazenadas nos mesmos recipientes secos, em temperatura aproximada de 20°C, sem controle de luminosidade e sem exposição à água. Para sua eclosão, as gêmulas foram submetidas à lavagem com solução de hipoclorito de sódio 50% em água por cerca de 20 min para remoção de seu envoltório e indução do processo. Posteriormente, foram lavadas cerca de dez vezes em água destilada para remoção total do hipoclorito e mantidas em placas de cultura de poliestireno 60x15 mm. O meio de cultura consistiu de água do local onde foram originariamente obtidas ou somente de água destilada, tendo sido realizados oito testes de cultura para cada espécie.

3.2. Análise dos ritmos de atividade

Para os testes de ritmicidade, foram utilizadas as espécies *H. heliophila* e *T. maza*. Os indivíduos foram mantidos em sala climatizada, com aeração constante e temperatura de 20°C $\pm$ 2°C. Foram realizados dois tipos de experimento com cada espécie: um sob regime de luz claro/escuro de 12h:12h (C/E 12h:12h) – com N=1 para *T. maza* e N=3 para *H. heliophila* - e outro sob luz constante – N=1 para *T. maza* (o mesmo indivíduo do experimento anterior) e N=3 para *H. heliophila* (indivíduos diferentes em cada experimento). Os volumes dos aquários utilizados variaram entre os ensaios (de 2, 13 e 80 litros), numa busca de melhores condições para manutenção dos indivíduos. Em alguns dos testes, espécimes de *H. heliophila* foram mantidos em aquário de dois litros sob fluxo contínuo de água do mar, utilizando um aquário

de 80 litros como abastecedor. Para a realização das fotografias em ‘time lapse’, uma câmera digital 5MP HD 720p (H5D-00013, Microsoft) foi utilizada. A câmera foi controlada utilizando o software Pryme 1.26 e as imagens, em cores, foram feitas com uma resolução de 640x480 pixels a intervalos regulares de 300 s.

3.3. Análise das imagens

O comprimento das papilas de *H. heliophila* e o diâmetro de *T. maza* foram medidos com uma régua e os valores usados para ajustar a escala das imagens no programa ImageJ 1.8 (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Para análise das imagens, as áreas (em mm²) das papilas projetadas de *H. heliophila* e do corpo inteiro de *T. maza* foram medidas utilizando a ferramenta ‘Analyse particles’. Para isso, a parte da sequência de imagens contendo a seção da esponja a ser analisada era recortada e convertida para formato binário (preto-e-branco. Fig. 5). Pontos internos ou externos à papila gerados pela conversão, que interfeririam nas medidas, eram excluídos pelo programa e a área da papila adquirida em cada um dos quadros da sequência.

3.4. Análises estatísticas dos ciclos de contração

Os gráficos dos ciclos de contração foram construídos utilizando o programa Excel 2013, a partir das áreas obtidas no programa ImageJ. Com esses gráficos, foram determinadas as frequências de contração e as diferenças entre as fases clara e escura. Uma vez que a porcentagem de área corpórea envolvida nas contrações variou enormemente entre os diferentes indivíduos, a distinção entre contrações e subcontrações foi realizada de maneira específica para cada indivíduo, seja pela observação dos gráficos ou mesmo pela visualização das fotografias. Para verificar possíveis diferenças nas amplitudes médias entre as diferentes fases foi utilizado o programa GraphPad Prism 7. Nele, foram obtidos os valores das amplitudes médias nas fases claro/escuro, e os dados foram comparados utilizando um test-*t* paramétrico.

Figura 5. Exemplo de determinação da área de uma papila da esponja *H. heliophila* utilizando a ferramenta ‘Analyze particles’ do programa ImageJ. A: Foto original da papila; B: Foto convertida para preto-e-branco; C: Foto convertida para binária; e D: *Outline* utilizado para a medição. Barra = 2mm. Seta indica o ósculo.

3.5. Detecção da melatonina

Ensaios para a detecção da melatonina foram realizados em homogenatos da esponja *H. heliophila*, utilizando cromatografia líquida (HPLC) e imunoenaios (ELISA). Para obtenção dos homogenatos, os indivíduos foram mantidos em aquários com água do mar natural dentro de uma sala climatizada, sob aeração constante e com temperatura ($20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e regime de luminosidade (C:E 12:12) controlados. Para cada teste, após os cinco dias de aclimatização, foram coletados quatro indivíduos em dois horários diferentes: após 6 horas no período claro e após 6 horas no período escuro. Os animais coletados tiveram o excesso de água do mar drenado em papel filtro e imediatamente congelados a -80°C . Posteriormente, foram pulverizados em nitrogênio líquido e macerados com auxílio de um pistilo. Os macerados foram então colocados em tubos Eppendorf, pesados e homogeneizados em ácido perclórico na concentração de 1 mg de pulverizado por μL de ácido. Em seguida, foram centrifugados a $12000 \times g$ por 10 min (4°C), sendo o sobrenadante utilizado para os testes.

Os experimentos de HPLC foram realizados como descrito em da Silveira Cruz-Machado *et al.* (2010). O sistema cromatográfico (Waters, Mildford, MA, USA) foi operado isocraticamente em temperatura ambiente. A fase móvel para melatonina (acetato de sódio 0,1 M, ácido cítrico 0,1 M, EDTA 0,15 mM e metanol 25%, pH 3,7) fluiu com fluxo de 0,50 mL/min, através de uma coluna de fase reversa 5-mm Resolve C18 (Waters, Mildford, MA, USA). O potencial do detector foi ajustado para +0,90 V versus eletrodo de referência Ag/AgCl, acoplado a um computador para integração dos dados. Em cada ensaio, foram injetados 20 µL do sobrenadante do homogenato de esponjas ou de padrões diretamente no sistema cromatográfico.

Para os testes ELISA, 150 µL de sobrenadante foram utilizados. A detecção da molécula foi feita pela utilização do kit Melatonin ELISA (IBL), de acordo com as instruções do fabricante.

3.6. Dissociação celular

Por questões práticas, os ensaios para sinalização da melatonina tiveram de ser realizados em volumes reduzidos, impossibilitando a utilização de esponjas inteiras. Sendo assim tais experimentos foram realizados em culturas de células *in vitro*. Essas culturas consistem em *primorfos* (Custódio *et al.* 1998), esferóides formados pela reagregação ativa de células dissociadas (Fig. 6).

Figura 6. Sequência mostrando quatro fases do processo de reagregação celular em *H. heliophila*. (A) Estágio inicial, células dissociadas; (B) Após algumas horas; (C) Após 2 a 3 dias, agregados com superfície irregular; (D) *Primorfo* com superfície lisa e contínua (pinacoderme).

Para obter as culturas, as esponjas foram dissociadas em condição estéril segundo Custódio *et al.* (1998). Todos os materiais foram esterilizados em autoclave e o meio (água do mar natural) foi filtrado em papel filtro duplo e posteriormente esterilizado em filtro de nitrocelulose (0,22 μm). Para a dissociação, as esponjas foram limpas com pincel e água do mar em placas de Petri. Em seguida, foram cortadas em fragmentos de cerca de 3-4 mm com o auxílio de bisturis, novamente utilizando placas de Petri com água do mar. Os fragmentos foram transferidos para tubos do tipo Falcon de 50 mL até o nível aproximado de 5 mL, lavados com água do mar e, ao decantarem, a água foi removida. O tubo foi preenchido com CMFSW-EDTA (*calcium-magnesium-free sea water*: NaCl 460 mM, Na₂SO₄ 7 mM, KCl 10 mM, Hepes 10 mM, EDTA 2.5 mM (Dunham & Weissman, 1986) e submetido à agitação lenta por 30 min. A solução foi descartada e o tubo novamente completado com CMFSW-EDTA e

mantido em agitação lenta por cerca de 50 min. Todos os procedimentos seguintes foram realizados em uma câmara de fluxo laminar estéril. A suspensão foi filtrada através de uma rede de nylon 40 μm , as células contadas em uma câmara de Neubauer e a densidade ajustada para 2×10^7 céls/mL. A suspensão foi então transferida para tubos Falcon de 15 ml, que foram centrifugados em temperatura ambiente (Excelsa II, Fanem). O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e o pellet ressuspendido em um volume de água do mar estéril igual ao de CMFSW-EDTA removido, de modo a manter a concentração celular. Inicialmente, a suspensão foi mantida em placas de cultura de poliestireno (60x15 mm), por uma semana, para testes de viabilidade.

3.7. Análise da sinalização da melatonina in vitro

Com o objetivo de observar os efeitos de uma possível sinalização da melatonina via receptores metabotrópicos durante o processo de reagregação, foi utilizada suspensão de células da esponja *H. heliophila* na presença de luzindol - um antagonista não-seletivo de receptores MT1 e MT2 (Dubocovich & Markowska, 2005). Foram realizados dois conjuntos de experimentos – um realizado no decorrer do ano de 2016 e outro nos meses de julho/agosto de 2017. No primeiro conjunto, foram utilizados espécimes de duas localidades distintas, São Vicente (N=6) e São Sebastião (N=6), e no segundo apenas indivíduos de São Vicente (N=6). Em todos os testes foram utilizadas placas de cultura com 24 poços, contendo cinco séries com concentrações distintas do fármaco, sendo uma como controle. Em cada poço, foram adicionados 300 μL de suspensão celular, obtida como descrito acima, e 3 μL de luzindol em uma das seguintes concentrações: 10^{-8} M (controle), 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M, de modo que as concentrações finais do inibidor foram: 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M. Para cada concentração os testes foram feitos em triplicata (total de 15 poços por placa).

Ainda, testes utilizando apenas melatonina foram realizados de maneira similar: 3 μL do composto em umas das seguintes concentrações 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M foram adicionados

a 300 μL de suspensão celular (concentrações finais: 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} M). Os testes foram feitos com indivíduos de São Vicente (N=6), também em triplicata para cada concentração da melatonina.

Por fim, para determinar se os efeitos de inibição provocados por luzindol poderiam ser revertidos na presença de concentrações crescentes de melatonina, foram realizados testes nos quais a 300 μL de suspensão celular foram adicionados 3 μL de luzindol, numa concentração de 10^{-5} M, na presença de melatonina em uma das seguintes concentrações: 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M. Os testes foram realizados de maneira similar ao descrito acima, utilizando triplicatas e todos com indivíduos de São Vicente.

Todas as placas foram fechadas com parafilm M, embrulhadas em papel alumínio para impedir a entrada de luz, colocadas em um pequeno isopor e reabertas após 24h. Cada um dos poços foi então fotografado, sendo as fotos convertidas para imagens binárias no programa ImageJ e as áreas dos agregados celulares medidas utilizando a ferramenta ‘analyze particles’ (Fig. 7), usando os mesmos procedimentos descritos no item ‘Análise das Imagens’.

Figura 7. Ensaio de dissociação de células de esponja *H. heliophila* mantidas em cultura. Imagem representativa de um dos poços em escala de cinza e convertido para binária (preto-e-branco). Cada ponto escuro é um agregado de células, do qual foi obtida a área em pixels para quantificação através do software ImageJ. N= 3 culturas/concentração de luzindol.

3.8. Análises estatísticas dos agregados

O número e o tamanho dos agregados celulares foram medidos, determinando-se assim, a área média dos agregados formados (área total/nº de agregados). Como a área média dos agregados mostrou-se demasiado variável entre os experimentos, os valores foram convertidos para percentagem, tendo como base os agregados na série controle ou de menor concentração das substâncias de cada placa, a qual foi considerada como 100% (10^{-10} M de luzindol para os testes de luzindol, 10^{-9} M de melatonina para os testes de melatonina, 10^{-9} M de melatonina para os testes de melatonina na presença de luzindol). Os valores foram plotados no programa GraphPad Prism 7, onde foram realizados testes de regressão linear e correlação de Pearson entre a área média dos agregados formados e a concentração dos fármacos.

4. Resultados

4.1. Manutenção das esponjas

Para a maioria das espécies testadas, a manutenção das esponjas em laboratório se mostrou bastante difícil. Embora algumas gêmulas de ambas as espécies de água doce, *Drulia brownii* e *Metania reticulata*, tenham eclodido após os tratamentos, a taxa de eclosão foi baixa e inconstante. Além disso, todas as culturas apresentavam contaminação por fungos, com origem provável do envoltório das gêmulas ou simbioses das próprias esponjas. No caso de *Sycon sp.*, os indivíduos não aderiam aos novos aquários no laboratório e a sobrevivência não ultrapassou os três dias, em qualquer das condições testadas.

As duas Demospongiae marinhas mostraram-se modelos melhores para os experimentos. *Tethya maza* se manteve funcional (*i.e.* com ósculo e sistema aquífero ativos) por até três meses nos aquários, apresentando padrões de contração de corpo inteiro, rítmicos e regulares. No entanto, esta espécie é relativamente rara e de acesso mais difícil, tendo sido obtidos apenas três indivíduos. Portanto, os experimentos foram limitados às observações do animal, sem ensaios *in vitro*. Já *H. heliophila* se mostrou um modelo melhor para os testes. A espécie é de fácil obtenção, por ser abundante em diversos pontos do litoral, e suas células servem bem aos experimentos de reagregação *in vitro*. Além disso, seus exemplares se mantiveram funcionais por mais de três semanas em laboratório. Todavia, as contrações são observadas nas papilas, e podem ser de difícil medição dependendo da sua posição no corpo do animal. Estas papilas também alteram seu formato nos aquários e após um período de cerca de cinco dias tornam-se demasiado afiladas, havendo uma redução progressiva nas amplitudes de suas contrações. Ao final de seis a sete dias tais contrações cessam, tornando tais organismos impróprios para testes e observações dessa natureza em tempos maiores. Portanto, os experimentos de ritmicidade se limitaram aos cerca de cinco dias em que os animais mantiveram suas contrações rítmicas.

4.2. Análise dos ritmos de atividade

4.2.1 Tethya maza

Sob um ciclo C:E 12h:12h, a espécie *T. maza*, a qual apresentava cerca de 1 cm de diâmetro, mostrou um ritmo de contração regular, com uma contração a cada 65 a 140 min, numa frequência média de $1,88 \times 10^{-4}$ Hz (Fig. 8). As observações foram realizadas duas semanas após a coleta dos indivíduos, por 110 horas consecutivas sob regime claro/escuro 12h:12h, tendo tal ritmo se mantido por todo período da coleta de dados. De maneira geral, tais contrações (*i.e.* da área máxima até a mínima de cada ciclo) ocorriam de maneira rápida, dentro de períodos que variavam de 10 a 20 min, e levavam a uma redução média de $32\% \pm 3\%$ da área corpórea. Já o processo de expansão se dava mais lentamente, com uma recuperação total da área corpórea inicial ocorrendo após 55 a 85 min (Fig. 9). Durante o tempo de observação, a esponja exibiu 72 ciclos de contração e não foram detectadas diferenças na frequência de contração entre as fases clara e escura.

Figura 8. Parte dos ciclos de contração/relaxamento de *T. maza* (48 horas em C:E). Fases clara e escura são representadas por fundos branco e cinza, respectivamente.

Figura 9. Ciclo de contração/relaxamento da esponja *T. maza*. A seta indica o ósculo e o perfil da esponja em **A** é representado pela linha pontilhada em **B-D**.

No entanto, a amplitude média – que representa a área média do corpo – apresentou uma diferença significativa ($P=0,0008$, Fig. 10) entre as fases clara e escura, com uma área média de $64,12 \pm 0,40 \text{ mm}^2$ para a fase clara e $62,71 \pm 0,36 \text{ mm}^2$ para a fase escura.

Figura 10. Comparação das áreas médias, em mm², de quatro dias de ciclos de contração/relaxamento de um espécime de *T. maza* sob C:E 12h:12h. As áreas médias diferem significativamente entre o claro e o escuro ($p = 0,0008$).

Sob um regime de claro constante, as contrações se mantiveram durante as 52 horas de observação (Fig. 11). Porém, mostraram maior irregularidade e um maior número de subcontrações, pequenas oscilações observadas nos gráficos, principalmente nos períodos de maior expansão. Os tempos médios tanto para a contração quanto para a expansão mantiveram-se semelhantes aos observados no ciclo claro/escuro, 15 e 75 min em média, respectivamente. No entanto, foi observada uma maior irregularidade tanto nas amplitudes das contrações ($A_{\text{média}} = 37,3 \text{ mm}^2$), bem como no intervalo entre elas, com uma maior ocorrência de subcontrações em relação ao organismo sob ciclo C:E. O intervalo entre as contrações variou entre 50 e 110 min, numa frequência média de $1,85 \times 10^{-4} \text{ Hz}$, levando a uma redução de $29\% \pm 6\%$ da área do corpo do animal. Foi observada, ainda, uma flutuação nas amplitudes médias, porém menos acentuada e com períodos inferiores àqueles observados em C:E (Fig. 8).

Figura 11. Ciclos de contração/relaxamento de *T. maza*, durante 48 horas sob claro constante.

4.2.2. *Hymeniacidon heliophila*

As análises foram feitas em seis indivíduos, sendo três mantidos sob regime de luminosidade C:E (12h:12h) e três em claro constante. O comprimento das papilas analisadas nas imagens variou entre 0,5 cm e 1,5 cm. Os resultados mostram uma grande variabilidade no perfil das contrações individuais das papilas das esponjas submetidas ao ciclo C:E. O indivíduo CE-1 (CE: Claro-Escuro) apresentou contrações bastante irregulares (Fig. 12), com numerosas subcontrações, o que tornou ambíguas as análises diretamente a partir dos dados numéricos. Valendo-se da inspeção visual das fotografias, foi verificado que nesse indivíduo os tempos de cada contração variaram entre 20 e 30 min, ocorrendo de maneira mais rápida que os processos de relaxamento, os quais se completaram entre 30 e 75 min. No caso desta papila, consideramos como contração reduções acima de 4% na área corpórea, uma vez que são aquelas mais visíveis nas fotografias. Tais ciclos de contração/relaxamento ocorreram dentro de intervalos de tempo extremamente variados, de 5 a 65 min, o que não permitiu inferir sua frequência.

Figura 12. Ciclos de contração/relaxamento do indivíduo CE-1 da espécie *H. heliophila* sob C:E 12h:12h, durante 52 horas. Fases clara e escura são representadas por fundos branco e cinza, respectivamente.

Foi possível verificar uma variação significativa na amplitude da papila entre as fases clara e escura ($p < 0,0001$), com uma área média $19,54 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ na fase clara e $20,79 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ na fase escura (Fig. 13).

Figura 13. Comparação das áreas médias, em mm^2 , de seis dias de ciclos de contração/relaxamento sob C:E 12h:12h do indivíduo 1 da espécie *H. heliophila*. As áreas médias diferem significativamente entre claro e escuro ($p < 0,0001$).

O indivíduo CE-2 demonstrou uma maior regularidade em seu ritmo de contração (Fig. 14). Não foi verificada uma variação na frequência de contrações entre as fases clara e escura,

mantendo uma média de oito contrações por fase (12h) em ambas, as quais levavam a uma redução entre 10 e 26% da área total da papila. Os tempos de contração e relaxamento foram também bastante variáveis em comparação com aqueles verificados para *T. maza*, de 10 a 30 min e de 15 a 75 min, respectivamente. O intervalo de tempo verificado entre as contrações variou de 65 a 155 min (média de 135 min ou $1,23 \times 10^{-4}$ Hz).

Figura 14. Ciclos de contração/relaxamento do indivíduo CE-2 da espécie *H. heliophila* sob C:E 12h:12h durante 55 horas. Fases clara e escura são representadas por fundos branco e cinza, respectivamente.

De maneira análoga ao indivíduo CE-1, foi observada uma variação significativa ($P < 0,0001$) da área média (amplitude média) da papila entre as fases clara e escura (Fig. 15). Todavia, tal variação mostrou-se inversa à do indivíduo anterior, ou seja, a papila apresentou uma área média maior durante a fase clara ($47,42 \pm 0,18 \text{ mm}^2$) do que durante a fase escura ($46,08 \pm 0,23 \text{ mm}^2$).

Figura 15. Comparação das áreas médias, em mm², de quatro dias de ciclos de contração/relaxamento sob C:E 12h:12h do indivíduo CE-2 da espécie *H. heliophila*. As áreas médias diferem significativamente entre claro e escuro ($p < 0,0001$), porém, de maneira inversa àquela verificada para o indivíduo CE-1.

Assim como para o indivíduo CE-2, a papila do terceiro indivíduo (CE-3) sob regime C:E, mostrou contrações mais regulares (Fig. 16). No entanto, foi observada uma permanência maior nos estados expandidos, embora bastante variáveis. Foi verificada, ainda, uma grande variação de tempo entre as contrações, de 145 a 405 min, com uma média de 230 min ($7,25 \times 10^{-5}$ Hz) entre cada contração. As contrações levavam a uma redução de $10\% \pm 4\%$ da área total da papila (a diferenciação entre contrações e subcontrações foi inicialmente feita pelas fotografias). O tempo de cada contração foi de 33,5 min em média, variando de 15 a 50 min e o de expansão de 52,8 min, variando entre 40 e 95 min. Ainda, a esponja apresentou uma divergência significativa ($p < 0,0001$, Fig. 17) entre as áreas médias das fases clara e escura, com uma maior amplitude média para o escuro, $30,95 \pm 0,084$ mm², do que para o claro, $27,54 \pm 0,06$ mm², como observado para o indivíduo CE-1.

Figura 16. Comparação das áreas médias, em mm^2 , de quatro dias de ciclos de contração/relaxamento sob C:E 12h:12h do indivíduo CE-2 da espécie *H. heliophila*. As áreas médias diferem significativamente entre claro e escuro ($p < 0,0001$), porém, de maneira inversa àquela verificada para o indivíduo CE-1.

Figura 17. Comparação das áreas médias, em mm^2 , de 40 horas de ciclos de contração/relaxamento sob C:E 12h:12h do indivíduo CE-3 da espécie *H. heliophila*. As áreas médias diferem significativamente entre claro e escuro ($p < 0,0001$).

Para os indivíduos analisados sob claro constante, observamos uma maior regularidade das contrações, sendo mais definidas que as observadas na condição CE. Os tempos de contração do indivíduo CC-1 (CC: Claro Constante) variaram entre 10 e 25 min, levando a reduções de 4 a 12% da área corpórea (Fig. 18). Como observado para todos os outros organismos (*T. maza* e *H. heliophila* em qualquer condição), os tempos de expansão ocorreram

de maneira mais lenta, de 30 a 55 min, tendo sido observados de 17 a 19 ciclos/período (24h), com uma média de um ciclo a cada 55 min ou $3,03 \times 10^{-4}$ Hz.

Figura 18. Ciclos de contração/relaxamento de um espécime de *H. heliophila* (indivíduo CC-1) sob claro constante durante três dias.

O indivíduo CC-2 (Fig. 19), por sua vez, revelou contrações mais longas, de 20 a 55 min, e um maior número de subcontrações (determinadas pelas fotografias). Durante as contrações, verificamos uma redução de 20 a 45% da área, com tempo de expansão variando entre 40 e 50 min. Foi observada uma frequência média de um ciclo de contração a cada 87 min ou $1,92 \times 10^{-4}$ Hz.

Figura 19. Ciclos de contração/relaxamento do indivíduo CC-2 de *H. heliophila* sob claro constante durante 67 horas.

O perfil da curva do indivíduo CC-3 (Fig. 20), assemelhou-se bastante àquele obtido para o indivíduo CE-1 sob regime C:E, porém com contrações mais regulares. Ainda assim foram observadas numerosas subcontrações (determinadas pelas fotografias). As contrações levavam a uma redução de $13\% \pm 3\%$ da área total da papila e ocorriam a intervalos entre 50 e 90 min, com uma frequência média de $2,38 \times 10^{-4}$ Hz. Os tempos de cada contração variaram entre 10 e 25 min e os de relaxamento entre 10 e 25 min.

Figura 20. Ciclos de contração/relaxamento de um espécime de *H. heliophila* (indivíduo CC-3) sob claro constante durante dois dias e meio.

Ademais, nos três indivíduos analisados sob claro constante foi observada uma flutuação aparente nas amplitudes médias, o que nos faz pressupor que o ritmo circadiano de aumento na amplitude média (área média corpórea) se mantém sob condições constantes de luminosidade. No entanto, para os indivíduos CC-1 e CC-2 a duração dessas oscilações se mostrou demasiado variáveis para permitir uma inferência estatística. De maneira oposta, no indivíduo CC-3 tais flutuações mostraram-se bastante conspícuas, com diferenças significativas ($p < 0,0001$, Fig. 21) entre as fases de maior área ($A_{\text{média}} = 76,35 \pm 0,41 \text{ mm}^2$) e aquelas de menor área corpórea ($A_{\text{média}} = 62,17 \pm 0,22 \text{ mm}^2$). A duração dessas fases mostrou-se bastante regular, com uma média de $11\text{h}43 \pm 56 \text{ min}$. Tais oscilações se mantiveram durante todo período de observação (90h), embora, após 48 horas de experimento tenha sido verificada uma atenuação de suas amplitudes médias.

Figura 21. Comparação das áreas médias, em mm², de 90 horas de ciclos de contração/relaxamento sob claro constante do indivíduo CC-3 da espécie *H. heliophila*. As áreas médias diferem significativamente entre claro e escuro ($p < 0,0001$).

4.3. Detecção de melatonina

4.3.1. HPLC

Um dos ensaios por HPLC com extratos de *H. heliophila* detectou um pico correspondente ao tempo de retenção do padrão de melatonina. No entanto, a amplitude foi baixa demais para permitir uma confirmação, uma vez que a concentração do extrato utilizado esteve abaixo do limiar de detecção da técnica.

4.3.2. ELISA

A detecção da melatonina em esponjas da espécie *H. heliophila* por ensaio de ELISA foi positiva. No entanto, as concentrações mostraram-se muito superiores às necessárias para realizar a dosagem da molécula. Portanto, embora tenhamos utilizado amostras coletadas em diferentes horários do dia, não foi possível verificar a existência de ritmicidade na produção da indoleamina.

4.4. Análise da sinalização da melatonina in vitro

4.4.1. Ensaio com antagonista de receptores melatonina

Para os testes de dose-resposta de reagregação celular na presença de luzindol, foram realizados dois conjuntos de experimentos: o primeiro conjunto (grupo-anual) foi realizado no decorrer do ano de 2016 e o segundo nos meses de julho-agosto de 2017 (grupo-julho). No grupo anual, feito inicialmente, foram utilizados exemplares da espécie *H. heliophila* provindos de duas localidades distintas, São Vicente (N=6) e São Sebastião (N=6), coletados em épocas variadas ao longo do ano. No grupo-julho, utilizado essencialmente para repetir as análises, os exemplares foram coletados todos no mês de julho, numa mesma localidade de São Vicente (N=6). Uma concentração de 10^{-8} M de luzindol foi utilizada como controle em todos os testes. Foram observadas diferenças nas respostas de reagregação celular na presença do inibidor dependendo da área de coleta dos indivíduos. Efeitos foram também observados quando comparados os dois conjuntos de experimentos.

Assim, para os organismos do grupo-anual coletados em São Sebastião não foi verificada uma correlação dependente da dose entre a área dos agregados celulares formados e a concentração de luzindol ($p = 0,728$; $r^2 = 0,046$). Por outro lado, nos organismos provenientes de São Vicente, a correlação entre concentração de luzindol e área média dos agregados mostrou-se significativa ($p = 0,011$; $r^2 = 0,91$), indicando que nesses indivíduos a formação dos agregados foi inibida na presença de luzindol (Fig. 22). No entanto, os resultados para cada indivíduo usado nos experimentos em ambos os grupos revelaram uma grande variabilidade entre si, com correlações positivas significativas e correlações não significativas.

Figura 22. Ensaio de reagregação celular dos indivíduos do grupo-anual provenientes de duas localidades distintas na presença de antagonista de receptor de melatonina. **(A)** Para os indivíduos de São Sebastião (quadrados verdes) não foi observada uma correlação dose-resposta da área dos agregados formados *versus* concentração de luzindol ($p = 0,728$; $r^2 = 0,046$). Já para os indivíduos de São Vicente (círculos vermelhos) observa-se uma redução significativa na área dos agregados formados com o aumento da concentração de inibidor ($p = 0,011$; $r^2 = 0,91$). Os valores foram normalizados como % do valor controle (10^{-8} M); **(B)** Diferença entre as áreas médias (normalizadas como % do controle) entre o controle (10^{-8} M) e a maior concentração de luzindol (10^{-4} M) para os indivíduos de São Vicente. Os valores mostram uma diferença significativa ($p = 0,010$) **(C)** Diferença entre as áreas médias (normalizadas como % do controle) entre o controle (10^{-8} M) e a maior concentração de luzindol (10^{-4} M) para os indivíduos de São Sebastião. Os valores não mostram uma diferença significativa ($p = 0,682$).

Já nos experimentos do grupo-julho, realizados apenas com indivíduos de São Vicente, não verificamos uma correlação dose-resposta significativa para a reagregação celular na presença de luzindol ($p = 0,99$; $r^2 \sim 0$, Fig. 23). Mais uma vez, os resultados individuais mostraram-se bastante heterogêneos.

Figura 23. (A) Ensaio de reagregação celular do grupo-julho na presença de luzindol. Não foi verificada uma correlação dose-resposta significativa ($p = 0,99$). (B) Diferença entre as áreas médias (normalizadas como % do controle) entre o controle (10^{-8} M) e a maior concentração de luzindol (10^{-4} M). Os valores não mostram uma diferença significativa ($p = 0,575$).

4.4.2. Ensaio com melatonina

Os testes utilizando melatonina foram realizados com os mesmos indivíduos utilizados para os testes com luzindol coletados no mês de julho de 2017. Nossos testes não revelaram uma correlação dose-dependente para a reagregação celular na presença de melatonina ($p = 0,685$; $r^2 = 0,062$, Fig. 24), demonstrando que, nesses organismos, o composto não exerceu efeito sobre a reagregação celular. Assim como verificados nos experimentos com luzindol, foi observada uma grande heterogeneidade entre os resultados individuais, seja no perfil da curva obtida, seja na média dos agregados.

Figura 24. (A) Ensaio de reagregação celular na presença de concentrações crescentes de melatonina (grupo-julho). Não foi verificada uma correlação dose-resposta significativa ($p = 0,685$). (B) Diferença entre as áreas médias (normalizadas como % do controle) entre a menor concentração (10^{-7} M) e a maior concentração de melatonina (10^{-4} M). Os valores não mostram uma diferença significativa ($p = 0,668$).

4.4.3. Ensaio com 10^{-5} M de luzindol na presença de concentrações crescentes de melatonina

Foram realizados testes de reagregação celular utilizando melatonina mais seu antagonista, luzindol. Não foi observada uma correlação dose-resposta entre a área média dos agregados celulares formados e a concentração de melatonina ($p = 0,24$; $r^2 = 0,42$. Fig. 25). Dessa forma, não foi verificado efeito do luzindol, nem tampouco da melatonina no que concerne a esta variável. Ademais, no que diz respeito à média dos agregados e mesmo aos perfis das curvas obtidas, verificamos uma alta heterogeneidade entre os testes.

Figura 25. (A) Ensaio de reagregação celular na presença de 10^{-5} M de luzindol e de concentrações crescentes de melatonina (grupo-julho). Não foi verificada uma correlação dose-resposta significativa ($p = 0,24$). (B) Diferença entre as áreas médias (normalizadas como % do controle) entre a menor concentração de melatonina (10^{-7} M) e a maior concentração de melatonina (10^{-4} M), ambos na presença de 10^{-5} M de luzindol. Os valores não mostram uma diferença significativa ($p = 0,510$).

5. Discussão

5.1. Manutenção das esponjas

Os protocolos de germinação utilizados para as gêmulas das espécies obtidas de água doce não se mostraram adequados. Tivemos uma taxa muito baixa de eclosão para que fosse possível utilizá-las como modelo para os testes subsequentes. Por isso, novos protocolos continuam a ser testados em nosso laboratório. Por outro lado, a manutenção dos exemplares da espécie *H. heliophila* por um período maior que três semanas nos aquários e sua viabilidade para os testes *in vitro* por todo esse período mostrou ser esta uma espécie ideal para tais experimentos. Além disso, a espécie já havia sido utilizada em outros estudos de análises da dinâmica de reagregação e é de fácil obtenção em algumas regiões do litoral de São Paulo (Custódio *et al.*, 2004). Tais características otimizaram nossos estudos *in vitro*. No entanto, a rápida degeneração de seus ritmos de contração e afinamento de suas papilas em laboratório, impediu sua utilização por um período superior a uma semana após a coleta. Ainda, mesmo durante essa primeira semana, sua estrutura corpórea complexa, em que muitas papilas estão presentes, dificultou nossas medições. Concluímos, então, que embora a espécie tenha se mostrado um modelo bastante conveniente para estudos *in vitro*, seu uso para estudos de contração mostra-se menos adequado. Ao contrário, a espécie *T. maza* além de apresentar uma maior longevidade nos aquários, preserva por muito tempo suas contrações características. Além disso, sua estrutura corpórea circular, na qual um único ósculo está presente facilitou nossas análises. Todavia, seu acesso se mostrou muito mais difícil e, por isso, sua utilização foi limitada.

5.2. Análise dos ciclos de contração

A capacidade de antecipar-se a eventos cíclicos do ambiente não é uma característica exclusiva de organismos terrestres. Ao contrário, organismos marinhos, especialmente aqueles que habitam as zonas entremarés, estão expostos a uma gama extremamente complexa de variáveis cíclicas sujeitas, sobretudo, aos ciclos lunar (~28 dias), semilunar (~15 dias), lunar diurno (~24,8 h), diurno (~24 h) e lunar semi-diurno (~12,4 h) (Tessmar-Raible *et al.*, 2011). Para sobreviver a eventos cíclicos extremos do ambiente, esses organismos devem ser capazes de se preparar e de responder de maneira rápida a alterações em variáveis como salinidade, temperatura, umidade, insolação, disponibilidade de alimento ou oxigenação, as quais atingem, muitas vezes, valores que podem ser críticos. A maior parte dos estudos utilizando animais que habitam regiões entremarés, limita-se a organismos móveis como crustáceos e poliquetas, os quais, quando expostos a condições extremas, movimentam-se em busca de abrigo ou de condições mais propícias. Quando em laboratório, esses animais possuem períodos em livre-curso, que correspondem à convergência entre um ou mais de seus osciladores ambientais (Barnwell, 1968; Last *et al.*, 2009). Dado que animais sésseis, como as esponjas, devem suportar tais alterações sem que seja possível transferir-se para ambientes mais favoráveis, é de se esperar alterações ainda mais profundas e complexas em sua fisiologia, as quais carecem enormemente de estudos. A espécie *H. heliophila* é uma habitante muito bem-sucedida desses ambientes, sendo de ampla distribuição mesmo em locais com altos níveis de poluição - níveis estes que também possuem regimes cíclicos - como é o caso de São Vicente (Ilha Porchat), onde realizamos parte de nossas coletas. Os resultados com estes indivíduos mostram uma grande heterogeneidade nos perfis das curvas dos ciclos de contração/relaxamento, o que pode estar relacionado à grande complexidade de pressões ambientais às quais esses animais estão submetidos. A análise das respostas desses animais a um ritmo circadiano de iluminação e sob claro constante mostra que esses ciclos foram suficientes para gerar o arrastamento nos

indivíduos analisados. No entanto, observamos também que os animais se tornaram arrítmicos após um período relativamente curto, de cerca de quatro dias. A grande irregularidade nos padrões de contração nos faz ponderar sobre a possibilidade de que outros sincronizadores possam estar presentes no ambiente natural para o arrastamento ser completo. Alternativamente, tal irregularidade pode provir da baixa capacidade desses organismos em recuperar seus ritmos integralmente em laboratório, dado os problemas da sua manutenção em ambientes fechados (Schippers *et al.*, 2012).

Comparando-se os dados, parece-nos que a combinação desses fatores é que está gerando os padrões observados, sendo necessários novos estudos, sob novas condições. A irregularidade nos padrões resulta, principalmente, da grande variação nas frequências das contrações - seja em um mesmo indivíduo, seja entre os diferentes indivíduos - e de uma variação na porcentagem de área corpórea envolvida na contração. As velocidades de contração, ao contrário, se mantiveram relativamente estáveis, seja sob C:E ou sob C:C, sendo sempre maior que aquela de relaxamento, a qual também mostrou-se relativamente pouco variável. Sob C:E verificamos ainda uma variação circadiana na amplitude média – área média do corpo. Nos indivíduos 1 e 3, foi observada uma maior amplitude na fase escura do dia e no indivíduo 2 na fase clara. Esses resultados apontam fortemente para o ciclo diário de luz como um dos sincronizadores dos ritmos de contração desses organismos, porém, sugerem que outros fatores devem atuar no processo de arrastamento. Ao analisarmos os ciclos sob um regime de claro constante, observamos a manutenção dos ritmos em três dos indivíduos, ainda que sejam observadas variações profundas entre os perfis das curvas. Com isso, mais uma vez, reafirmamos a importância do ciclo de luz como *zeitgeber* para esses organismos – ainda que outros fatores possam estar envolvidos. Além disso, de maneira contundente, foi possível confirmar o caráter endógeno dos ciclos de contração/relaxamento, que já havia sido previsto

anteriormente (Weissennfels, 1990; Nickel, 2004), mas não demonstrado em estudos laboratoriais.

As análises de ritmicidade dos ciclos de contração/relaxamento utilizando a espécie *T. maza* revelaram ser este um organismo bastante ativo, exibindo contrações muito vigorosas, as quais envolvem o corpo como um todo. Embora tais análises tenham se limitado a poucos dias de observação e seja necessário ampliar tanto o número de espécimes utilizados quanto o de horas de observação, nossos dados revelam um modelo que se mostra ideal para estudos posteriores de ritmicidade. A espécie é abundante em áreas litorâneas do nordeste do Brasil (Hajdu *et al.*, 2011), se mantém relativamente bem em aquários (G. Muricy, MN-UFRJ, com. pess.) e tem um formato corpóreo e um perfil de contração bastante conspícuos e regulares que otimizam tais estudos. Além disso, nossos resultados mostraram uma forte correspondência com aqueles obtidos da literatura, tendo sido constatado para *T. maza* um comportamento bastante semelhante ao verificado para outra espécie pertencente ao mesmo gênero, *T. wilhelma*, considerada por Nickel (2004) uma das espécies de esponja mais ativas conhecidas. No referido estudo, *T. wilhelma* ostentou uma frequência de contração de $2,3 \times 10^{-4}$ Hz em condições mais próximas às naturais e $2,7 \times 10^{-5}$ Hz quando mantidas em câmaras de fluxo aberto, valor este, menor do que a média obtida para *T. maza*, $1,88 \times 10^{-4}$ Hz, a qual mantivemos em uma condição intermediária a estas duas. Ainda, para *T. wilhelma* foi descrita uma variação circadiana significativa nas frequências dos ciclos de contração, com uma maior atividade observada na fase escura do dia. Tendo em vista os dados limitados, não pudemos avaliar se essa variação na frequência também está presente em *T. maza*. Por outro lado, observamos uma variação circadiana na área média da esponja, com um aumento significativo em seu valor na fase escura do dia, a qual não foi completamente eliminada sob claro constante. Dessa forma, de maneira preliminar, nosso resultado aponta para uma maior atividade de *T. maza* também na fase escura do dia, uma vez que uma maior área corpórea indica um maior volume de água bombeada pela esponja. Por conseguinte, isto corrobora a existência de uma ritmicidade circadiana nos ciclos de

contração/relaxamento, indicando que ambas as espécies podem ser consideradas como animais de maior atividade noturna.

A estabilidade dos ritmos de contração mantida por todo o tempo da coleta de dados – revelada também em outras espécies, como *Spongia officinalis* e *Tethya crypta* (Pavans de Cecatty, 1971; Reswig, 1971) - e a aparente manutenção dessa ritmicidade sob luz constante pressupõe a existência de um relógio endógeno nesses organismos, como observado para *H. heliophila* neste trabalho. Recentemente, um estudo utilizando a espécie *Amphimedon queenslandica* (Jindrich *et al.*, 2017) revelou, pela primeira vez, a presença de genes do relógio em Porifera, os quais mostraram uma flutuação circadiana, bem como sazonal, tanto em larvas como em esponjas adultas. Ainda, a manutenção desses ciclos em *A. queenslandica* sob escuro constante confirma a presença de um relógio endógeno. No entanto, embora para *T. maza* o ciclo de luz pareça ser suficiente em gerar padrões regulares de contração, o mesmo não foi observado para *H. heliophila*. Esta espécie parece depender fortemente de outros fatores além dos ciclos de luz para que seus ritmos sejam arrastados de maneira integral. Uma hipótese é que as discrepâncias entre as duas espécies poderiam decorrer das diferenças verificadas em seus habitats. *Tethya Maza* é de hábito ciáfilo e ocorre no infralitoral, enquanto *H. heliophila* é fotófila e uma habitante de zonas entremarés. Uma outra hipótese é que essas discrepâncias possam derivar das diferenças em suas organizações corporais. Cada indivíduo de *H. heliophila* apresenta um número variável de ósculos, cada um deles drenando um sistema de canais aquíferos. Por outro lado, os indivíduos de *T. maza* apresentam invariavelmente um único ósculo e uma única rede de canais. Observações feitas no laboratório, principalmente em ensaios feitos com uma outra esponja de água doce, *Radiospongilla inesi*, indicam que a contrações tem início na região do ósculo. Esta é propagada em ondas pela pinacoderme e afeta ósculos adjacentes, dando início à contração das áreas adjacentes (Fig. 26). Se for confirmado ser o ósculo o local inicial e verificado o efeito das ondas de contração, poderíamos esperar que no caso de *H. heliophila*, contrações em um dos ósculos interfira naquelas produzidas em outros, gerando um comportamento mais complexo. No

entanto, tendo nossas análises, no caso de *T. maza*, sido limitadas a um único indivíduo sob duas condições distintas, estudos mais detalhados são necessários para a confirmação destas observações.

Figura 26. Sequência mostrando uma onda de contração (linha pontilhada) na espécie *Radiospongilla inesi*.

5.3. Mecanismos envolvidos nos processos de contração e relaxamento

Considerando o hábito de vida sésil das esponjas, sua capacidade de contrair o corpo de maneira ativa torna-se, muitas vezes, o único mecanismo disponível para uma série de processos essenciais ligados à alimentação, excreção de detritos e mesmo reprodução. A aparente simplicidade desses organismos esconde a verdadeira complexidade envolvida nos processos de movimentação corpórea, os quais exigem uma forte integração, segundo Pavans de Ceccatty (1974), entre três sistemas de coordenação: o fluido extracelular, as células móveis e os tecidos. Em todas as espécies analisadas, as contrações ocorrem de maneira lenta, restrita a um pequeno grupo de células ou são transmitidas por ondas “peristálticas” para áreas maiores (Pavans de Ceccatty, 1974; Fig. 26). Há muito se especula como essas contrações se propagam através do corpo desses animais e, ainda hoje, este permanece um tema em debate. Alguns autores defendem que a transmissão dos movimentos ocorre por meio da liberação de mensageiros químicos no mesohilo ou no sistema de canais das esponjas, nesse caso, sendo transportados pelo fluxo de água. Elwanger & Nickel (2006) testaram uma série de substâncias - muitas delas homólogas àquelas de animais mais derivados - candidatas à regulação

dessas contrações e que agiriam de maneira autócrina ou parácrina sobre receptores específicos. Segundo os autores, é bastante provável que muitas vias de sinalização e diferentes mensageiros estejam presentes, dado que um hábito de vida sésil traz consigo a necessidade de responder a uma variedade de estímulos ambientais. Leys (2007), por sua vez, acredita que a propagação das contrações ocorra pela interação de diversos mecanismos ocorrendo simultaneamente ou de maneira isolada, dados os diferentes padrões de contração e velocidades observadas no processo das espécies de esponja estudadas. Aparentemente, ondas disparadas pela aplicação de estímulos externos podem ser conduzidas de maneira distinta daquelas produzidas endogenamente. A autora traz como exemplo a espécie de água doce *Ephydatia muelleri*, que ao ser estimulada mecanicamente dispara dois tipos de contração. Um é conduzido como uma onda peristáltica que parte do local do estímulo, e o outro ocorre em forma de espasmos em locais distantes, os quais poderiam ser causados por mudanças mínimas na pressão detectadas por receptores celulares de estiramento nestas áreas (Leys & Meech, 2006; Leys, 2007). Ademais, as diferenças observadas nas velocidades de contração e expansão, essa ocorrendo de maneira muito mais lenta – médias de 15 e 75 min, respectivamente, em *T. maza*, por exemplo – pressupõe o envolvimento de mecanismos distintos para os dois processos (Nickel, 2004).

No que concerne aos tipos celulares e tecidos envolvidos no processo de contração não-muscular, duas possibilidades são discutidas: a) contrações mediadas por células contráteis chamadas miócitos ou actinócitos, presentes no mesoílo (Boury-Esnault & Rützler, 1997); b) contrações epiteliais mediadas pelos pinacócitos (células da pinacoderme) (Nickel, 2004; Nickel *et al.*, 2011). Atualmente, embora ainda se careça de estudos definitivos, acredita-se que os pinacócitos sejam os elementos primários no processo de contração, e onde os movimentos seriam gerados e conduzidos. Um possível papel dos actinócitos não é descartado, porém, é mais provável que funcionem de maneira acessória ou localizada (Nickel, 2004; Leys & Hill, 2012). Essa hipótese foi fortalecida ao se constatar a existência de uma rede de actina que atravessa e conecta as células de uma das porções da pinacoderme, os endopinacócitos, em *E. muelleri*. Ao redor dos canais aquíferos, tais microfilamentos formam feixes

em forma de esfíncteres (Elliott & Leys, 2007). Ainda, registros de ondas contráteis na superfície de *T. wilhelma*, também observadas em nossos dados para *T. maza*, *H. heliophila* e mesmo para *R. inesi*, indicam um envolvimento da pinacoderme na contração (Nickel, 2004). Os processos de contração e relaxamento são divididos em duas fases, uma lenta e outra rápida. A contração se inicia com uma fase lenta que sugere uma resistência provavelmente gerada pela água presente nas câmaras e canais. A suspensão eventual do bombeamento dos coanócitos levaria à diminuição dessa pressão, possibilitando uma contração mais rápida na segunda fase. A etapa inicial do processo de expansão é rápida, sugerindo a existência de um mecanismo ativo. A diminuição tardia nessa velocidade deve indicar o limite dessas forças e/ou um aumento da resistência gerado pelo retorno do batimento dos coanócitos. Um acréscimo lento final na área da esponja deve, assim, ser devido a um aumento na pressão de água (Nickel *et al.*, 2011). Nickel *et al.* (2011) propõem a existência de um sistema agonista/antagonista regulando os processos de contração e relaxamento. Segundo sua interpretação, feita a partir de dados morfométricos, o processo de contração seria gerado inicialmente na superfície da esponja pelos pinacócitos. O processo ativo de expansão seria dirigido pelo mesohilo, que funcionaria de maneira antagônica à contração, tendo aí os actinócitos e/ou forças visco-elásticas armazenadas na matriz de colágeno durante a contração, o papel de produzir o relaxamento da esponja. A pressão de água gerada pelos coanócitos seria responsável pela resistência à contração e, posteriormente, pela manutenção final da expansão.

5.4. Produção de melatonina e possíveis funções

Ainda que de maneira preliminar, a produção de melatonina foi detectada por ELISA em extratos da esponja *H. heliophila*. Embora, até o momento, não tenha sido possível determinar a concentração da molécula nas amostras ou a existência de uma ritmicidade em sua produção, estes resultados indicam fortemente que a maquinaria responsável pela produção do hormônio está presente nesse animal. Dessa forma, nosso trabalho pode ser o primeiro a relatar a presença

da molécula em um representante do filo Porifera. Como já citado, a melatonina se mostrou presente em todos os grandes grupos onde foi estudada (Bubenik & Pang, 1997; Vivian & Pévet, 1993; Carrillo-Vico *et al.*, 2005). Em vertebrados sua importância e aplicação em uma gama enorme de ações evidencia-se na imensidão de trabalhos que, ainda hoje, dedicam-se em desvendar e descrever suas diversas funções nos organismos desse grupo. Nesses animais, grande parte dos processos envolvidos em sua sinalização são relativamente bem conhecidos, embora novas aplicações e locais de síntese da molécula continuem a ser desvendados.

Em invertebrados, a melatonina também foi relatada em muitos grupos, como em insetos (Vivien-Roels *et al.*, 1984; Finocchiaro *et al.*, 1988), crustáceos (Vivien-Roels & Pévet, 1993; Bentkowski *et al.*, 2010), moluscos (Abran *et al.*, 1994) e planárias (Itoh *et al.*, 1999). Até o momento, cnidários e ctenophoros, como o antozoário *Renilla köllikeri*, e o ctenóforo *Bolinopsis vitrea* (Mechawar & Anctil, 1997; Peres *et al.*, 2014), são os metazoários mais basais no qual a melatonina foi descrita. A molécula foi ainda relatada em plantas, algas, fungos, bactérias e protozoários (Pöggeler *et al.*, 1991; Fuhrberg *et al.*, 1996; Hardeland & Pöggeler, 2003; Paredes *et al.*, 2009). No entanto, pouco se conhece sobre os mecanismos e as funções exercidas pela molécula nesses grupos. A posição basal das esponjas na escala filogenética, aliada às características da melatonina de poder agir localmente ou de maneira endócrina, torna essa associação ideal para compreender como a comunicação e a sinalização celular evoluíram de organismos unicelulares para aqueles multicelulares. O número de possíveis aplicações da melatonina nesse filo é proporcional à infinidade de funções já encontradas nos demais grupos. Uma dessas prováveis funções seria a de sinalização no sistema circadiano, *i.e.*, para os aqui relatados ciclos de contração/relaxamento. Parece-nos ainda mais provável, seu envolvimento em ações do sistema imune de esponjas, dada a grande variedade e ancestralidade dessa sua ação na filogenia. Dessa forma, tal descoberta, abre um campo amplo de estudos, seja no que concerne ao estudo da fisiologia de poríferos, seja

buscando desvendar a evolução dos processos cronobiológicos e, mesmo, de sinalização e comunicação celulares em organismos multicelulares.

5.5. Reagregação celular em esponjas e o possível envolvimento da melatonina

Em 1907, Wilson desenvolveu um método de dissociação celular de esponjas, extremamente simples e replicável, utilizado até os dias de hoje (Wilson, 1907a). Nele, pedaços pequenos de esponja são pressionados através de uma malha fina, produzindo células isoladas. Foi utilizando esse método, que o autor demonstrou que tais células, quando mantidas em um meio com todos os elementos necessários – *i.e.* água do mar - são capazes de reagregar-se e dar origem a um novo indivíduo completo e totalmente funcional. Ainda, ao misturar suspensões de células dissociadas de três espécies de esponjas – *Microciona sp.*, *Stylotella sp.* e *Lissodendoryx sp.* -, combinadas duas a duas, Wilson (1907b) observou que os agregados formados eram ‘puros’ e individualizados. Dessa forma, ficou evidente que tais células tinham a capacidade de diferenciar o que é próprio daquilo que não é. Esse trabalho foi, então, o marco que deu origem a uma série de estudos que, ainda hoje, buscam compreender os mecanismos do reconhecimento celular e da regeneração em esponjas.

Esse evento se inicia quando as células, uma vez isoladas, tornam-se esféricas e aderem ao substrato (Fernández-Busquets, 2008; Lavrov & Kosevich, 2014). Alguns autores sugerem que para que a reagregação seja possível, é necessário que as células se desdiferenciam em tipos celulares pluripotentes, voltando a se rediferenciar em momentos mais tardios do processo. Estudos utilizando diferentes espécies de esponjas, como *Clathria prolifera* (originalmente *Microciona prolifera*) e *Ephydatia fluviatilis*, descrevem a presença de apenas três tipos celulares nos estágios iniciais da reagregação: arqueócitos, pinacócitos e coanócitos (Simpson, 1984). Os pinacócitos e, principalmente, os arqueócitos produzem um número

variado de pseudópodes que os permite movimentar-se ativamente de maneira amebóide. Coanócitos, por sua vez, movem-se apenas por um curto período de tempo pelo batimento de seu flagelo único (Lavrov & Kosevich, 2014). A observação de células de *C. prolifera* e *Clathrina sp.* mostrou que a direção desses movimentos é randômica (Galtsoff, 1923, citado por Lavrov & Kosevich, 2014; Gaino *et al.*, 1985). Nossas observações em células dissociadas de *H. heliophila* corroboram essa hipótese e indicam que o encontro entre as células é casual. A direção e a velocidade do movimento mudam constantemente e isso não parece depender de fatores como proximidade entre as células. Uma vez que se encontram, em geral elas se unem e o agregado permanece em movimento aleatório, formando agregados cada vez maiores que, ao final, sob condições apropriadas, podem dar origem a uma pequena esponja (Fernández-Busquets, 2008; Lavrov & Kosevich, 2014).

Essa capacidade, embora seja apontada como uma característica ‘primitiva’ desses animais, exige um aparato complexo de reconhecimento e adesão celular. Ainda que as esponjas tenham sido os primeiros animais nos quais o fenômeno foi experimentalmente demonstrado, ele não é exclusivo destes organismos. Estudos posteriores revelaram que o princípio é a base de uma variedade de processos em invertebrados e vertebrados. Alguns exemplos são aqueles relacionados à movimentação e à adesão de linfócitos durante a resposta imunitária, à patogênese microbiana e mesmo aqueles envolvidos na metástase tumoral e na rejeição de enxertos (Müller & Müller, 1980; Bucior *et al.*, 2004; Lavrov & Kosevich, 2014; Eerkes-Medrano *et al.*, 2014). Está envolvido, ainda, nos mecanismos de histocompatibilidade de tecidos embrionários de vertebrados. Dessa forma, desvendar os processos e as macromoléculas envolvidas no fenômeno da reagregação celular de esponjas contribui para nossa compreensão sobre eventos relacionados, como o da divisão celular coordenada, da movimentação e das interações celulares (Müller & Müller, 1980). Todos esses processos dependem da interação entre macromoléculas posicionadas na superfície celular (Müller &

Müller, 1980; Bucior *et al.*, 2004). No caso das esponjas, o reconhecimento *self-non self* e a adesão celular são mediados por um proteoglicano solúvel, denominado Fator de Agregação (FA). A adesão promovida por esse fator ocorre em duas etapas: uma ligação Ca^{2+} -dependente entre FAs e uma ligação Ca^{2+} -independente entre o FA e um receptor de membrana (Fèrnandez-Busquets & Burger, 1999; Bucior *et al.*, 2004; Custódio *et al.*, 2004; Fèrnandez-Busquets, 2008). Assim, a agregação celular nesses animais depende de, no mínimo, três componentes: o proteoglicano, receptores na superfície das células e íons Ca^{2+} (Dunham *et al.*, 1983). Qualquer falha nos sistemas de regulação e sinalização transmembrânica no decorrer desse processo deve ser acompanhada de um mau funcionamento ou mesmo de uma ruptura no processo de regeneração. Uma causa possível de deficiência pode ser um estado imunitário debilitado do animal e/ou a exposição a um ambiente impróprio, os quais já mostraram afetar a velocidade e o tamanho dos agregados formados (Philp, 1997; 2001).

Seguindo tais evidências, parece-nos bastante plausível presumir que a melatonina tenha algum papel em, pelo menos, um dos estágios dos processos de reagregação em Porifera. Diversas ações da molécula relacionadas à regeneração em organismos de diferentes níveis filogenéticos já foram descritas. Foi demonstrado que a planária *Dugesia dorotocephala* apresenta uma ritmicidade circadiana na reprodução assexuada por fissão, com a partição ocorrendo apenas na fase escura do dia. Ao expor esses animais a altas concentrações de melatonina (maiores que 18,7 ppm), foi observada uma inibição do processo (Morita *et al.*, 1984). Ainda, o tratamento com melatonina após lesão de partes do corpo de *D. japonica*, revelou que a molécula é responsável por retardar a regeneração tanto da cabeça quanto da cauda desses animais (Yoshizawa *et al.*, 1991). No peixe-zebra (*Danio rerio*), um modelo bastante utilizado em estudos, a melatonina induz aumento no recrutamento (migração) de neutrófilos para locais de injúria (Ren *et al.*, 2015). Esse fenômeno foi observado tanto na fase clara do ciclo C:E, quanto em qualquer momento do dia sob claro constante e o tratamento com

luzindol, um inibidor não-seletivo dos receptores MT1 e MT2, promoveu atenuação desse efeito. Uma resposta oposta, de inibição do rolamento e adesão de leucócitos (principalmente neutrófilos) na presença da molécula, foi reportada em ratos (Lotufo *et al.*, 2001). A inibição do rolamento dos leucócitos é mediada por receptores de alta afinidade, provavelmente MT2, enquanto sua adesão está relacionada à ligação da melatonina aos sítios MT3.

Uma hipótese é de que esse efeito inconsistente da melatonina possa ser decorrente das divergências observadas em sua concentração nas diferentes espécies estudadas (Ren *et al.*, 2015). Uma série de outras respostas inflamatórias mostram uma flutuação circadiana induzida pela melatonina. A presença endógena da molécula na fase escura do dia ou sua administração exógena em camundongos pinealectomizados, por exemplo, levam a uma redução da permeabilidade vascular e do inchaço da pata de camundongos lesionados (Lopes *et al.*, 1997). Muitas dessas ações são locais e estão relacionadas à propriedade antioxidante e de eliminação de radicais livres inerentes à molécula (Lotufo *et al.*, 2001). No entanto, esses efeitos protetores da melatonina exigem sua presença em altas concentrações, maiores do que aquelas observadas durante o pico de sua produção, na fase escura do dia. Sua ação em baixas concentrações pode ser melhor explicada por sua ligação a receptores capazes de gerar uma amplificação do sinal (Lotufo *et al.*, 2001). Como citado, três subtipos de receptores (MT1, MT2 e MT3) estão presentes em mamíferos, enquanto que em vertebrados não-mamíferos um terceiro subtipo de receptor (Mellc) também está presente (Lotufo *et al.*, 2001; Hardeland, 2008). A presença de receptores de melatonina em diversas regiões do corpo de cordados mais basais - anfioxos, mixiniformes, lampreias e peixes cartilaginosos - foi verificada utilizando-se melatonina marcada radioativamente. No entanto, seus subtipos não foram determinados (Vernadakis *et al.*, 1998). Em invertebrados e demais grupos, pouco se conhece sobre os receptores envolvidos nas várias ações exercidas pela melatonina. Em muitos desses organismos a molécula está presente em altas concentrações e é provável que sítios de ligação

intracelulares de menor afinidade, como os receptores nucleares RZR/ROR, estejam envolvidos em sua sinalização (Tsim, 1996; Hardeland, 2008).

5.6. Papel da melatonina na reagregação de células de esponja

Observamos uma ampla variação nos resultados obtidos para a reagregação celular na presença de concentrações crescentes de luzindol. Nossos experimentos iniciais, utilizando indivíduos coletados na cidade de São Vicente, ao serem analisados em conjunto, mostram uma correlação negativa significativa ($p=0,011$; $r^2=0,91$) entre a área média dos agregados formados e a concentração de luzindol. Assim, os resultados indicam uma atenuação da reagregação celular na presença da molécula. Individualmente, no entanto, os ensaios mostraram-se bastante variáveis entre si - alguns apresentaram correlações negativas e outros, nenhuma correlação. Já os experimentos realizados com células obtidas dos indivíduos coletados em São Sebastião não mostram qualquer correlação entre a área média dos agregados e a concentração de luzindol ($p=0,728$; $r^2=0,046$). Nesse caso, portanto, o fármaco não teve nenhum efeito sobre o tamanho dos agregados formados. Da mesma forma, a repetição dos testes utilizando novos indivíduos coletados na cidade de São Vicente não mostrou qualquer efeito do luzindol, revelando uma inconsistência entre estes resultados e aqueles obtidos inicialmente. Mais uma vez, os resultados individuais mostraram-se bastante variáveis, com correlações positivas, negativas ou mesmo nenhuma correlação. A adição de concentrações crescentes de melatonina exógena às suspensões celulares obtidas de indivíduos coletados no mesmo local, também não mostraram qualquer efeito da molécula sobre a reagregação celular. Por último, a adição de concentrações crescentes de melatonina à suspensão celular na presença de uma concentração padronizada (10^{-5} M) de luzindol, não mostra qualquer efeito sobre a área média dos agregados, mostrando novamente que, nesse caso, o luzindol não parece estar exercendo nenhum efeito sobre o tamanho dos agregados.

Assim, a partir da análise geral dos resultados obtidos, três hipóteses podem ser propostas:

- 1) Os resultados iniciais são um artefato e a melatonina não exerce qualquer efeito sobre esse estágio da reagregação, como depreendido dos resultados posteriores;
- 2) Como indicado pelos resultados iniciais, a melatonina exerce um efeito sobre esse estágio da reagregação celular em esponjas via receptores MT1 e/ou MT2. Porém, a discordância com os resultados posteriores pode indicar a interferência de outros fatores indeterminados; ou
- 3) A sinalização da melatonina nesse estágio da reagregação não é mediada por receptores MT1 ou MT2.

Uma condição essencial para a ocorrência da reagregação celular é um funcionamento adequado dos mecanismos envolvidos no reconhecimento e na adesão celular. Esses processos podem ser afetados por fatores como quantidade de poluentes, pH e salinidade do ambiente de proveniência da esponja. Estudos com a espécie *Clathria prolifera* mostram, por exemplo, que a quantidade de Cd^{2+} no ambiente de origem do animal pode causar disrupção na reagregação celular, provavelmente pelo bloqueio dos canais de Ca^{2+} (Philp, 1997; 2001). Ainda, a presença de substâncias oxidantes como H_2O_2 e NaClO potencializam a reagregação celular em pH 6,5 e a inibem sob um pH 7,0, sendo que a adição de catalase reduziu ou mesmo eliminou os efeitos dessas substâncias (Philp, 1997). Todos esses efeitos parecem resultar de alterações nos níveis de Ca^{2+} intracelular, provocadas pela interferência em mecanismos homeostáticos, seja induzindo sua liberação dos estoques intracelulares, seja aumentando sua absorção, ou mesmo ambos (Philp, 1997).

Em esponjas, a adesão célula-célula e célula-matriz são efetuadas por proteoglicanos (o fator de agregação) e mediadas por cálcio (Simpson, 1984). Além de ser imprescindível nas

interações entre os fatores de agregação, o Ca^{2+} também atua no processo como um mensageiro intracelular, demonstrado pela redução na reagregação provocada pela inibição da proteína calmodulina (Dunham, 1983). Isto posto, mais uma vez, podemos prever uma série de possibilidades de ação da melatonina nas respostas de agregação celular em esponjas. Uma dessas possibilidades baseia-se na sua interação com receptores de membrana MT1 ou MT2. As vias de sinalização desses receptores envolvem a modulação de mensageiros intracelulares, como cAMP e cGMP, comuns a uma variedade de organismos, como plantas, protistas e metazoários, como o cnidário *Renilla köllikerii* (Anctil, 1989; Anctil *et al.*, 1991; Pandi-Perumal *et al.*, 2008). Ainda, a sinalização da melatonina via receptor MT1 envolve a modulação da concentração de Ca^{2+} intracelular e o controle do fluxo de outros íons e canais (Pandi-Perumal *et al.*, 2008), cuja presença também já foi detectada em esponjas (Zocchi *et al.* 2001).

Assim, a falta de consistência nos resultados poderia ser explicada pelas diferenças observadas nos níveis e nos tipos de poluentes presentes no ambiente de origem dos animais. Como foi verificado, alterações em variáveis como pH e salinidade do ambiente são esperadas alterar as respostas de reagregação. O estuário de Santos-São Vicente é populoso e um grande pólo industrial e portuário bastante próximo à Cubatão. A região é conhecida por seus elevados níveis de poluição com origem em diversas fontes: efluentes domésticos e industriais e cargas difusas urbanas e agrícolas (Hortellani *et al.*, 2008). Além das alterações em variáveis físico-químicas da água como pH, temperatura e salinidade, análises ambientais mostram a presença de metais pesados, como Pb, Ni, Hg, Cd, Al, Fe, Cu e outros (Hortellani *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2016). Foram encontrados ainda traços de diversos medicamentos, como anti-inflamatórios, anti-hipertensivos, analgésicos, cafeína e mesmo cocaína (Pereira *et al.*, 2016). Por outro lado, amostragens de sedimentos coletados de praias de São Sebastião mostram um baixo nível de contaminação industrial, sendo a maior parte do impacto provocada por carga orgânica vinda

de efluentes domésticos (Gubitoso *et al.*, 2008). Em ambas as localidades foi verificada uma variação anual nos níveis de contaminação por bactérias fecais, devido a alterações, por exemplo, nas correntes marinhas e mesmo no turismo (CETESB, 2016). Não foram encontrados registros sobre variações anuais dos níveis de metais pesados e outros contaminantes no local das coletas.

Desse modo, considerando as diferenças observadas nos níveis e tipos de poluentes nas duas localidades de coleta, podemos prever consequências e ajustes em variáveis fisiológicas dos indivíduos analisados de acordo com seu ambiente de origem. Um ajuste provável poderia ocorrer nos níveis de melatonina endógena e na atividade de seus receptores de acordo com o nível de contaminantes presentes no ambiente. Da mesma maneira, dada a variação anual observada na quantidade de poluentes, uma flutuação anual nos níveis e atividade da molécula também poderia ocorrer. Isto seria uma consequência de sua atuação nos processos imunomoduladores, os quais devem flutuar com o estado fisiológico do animal. Seguindo nessa linha, a falta de resposta verificada da adição de melatonina exógena pode decorrer de uma flutuação na atividade/presença de seus receptores ou outros componentes da via. Ou ainda, é esperada no caso de concentrações saturantes de melatonina endógena já estarem presentes, como foi verificado em organismos unicelulares, fungos e algumas plantas (Hardeland, 2008).

Tendo em vista a ambiguidade verificada em nossos resultados, fica evidente a necessidade de que outros experimentos sejam realizados. As três hipóteses aqui propostas podem servir de base para que novos testes sejam elaborados. Discorreremos extensamente a hipótese de ação da melatonina na fase inicial do processo de reagregação via receptores MT1 e/ou MT2, porque acreditamos que essa possibilidade não deva ser descartada sem que antes novos estudos sejam realizados. Ainda, as mesmas variáveis vistas poder influenciar nas respostas mediadas pelos receptores estudados, são esperadas interferir também no caso da participação de outros receptores ou mesmo de uma ação direta da melatonina. Não deve ser

excluída do mesmo modo, a possibilidade de ação da molécula sobre outras etapas e/ou processos relacionados à imunomodulação. Ao contrário, uma vez confirmada sua presença nesses organismos, uma série de outras funções imunomoduladoras - além de outras não relacionadas, como aquelas de sinalização no sistema circadiano - podem ser propostas e testadas. Ademais, nossos testes limitaram-se à utilização de um único tipo de inibidor, o qual antagoniza dois dos receptores de melatonina presentes em animais bastante derivados. De fato, como já discutimos, outras vias de sinalização da melatonina devem estar presentes, seja por sua ligação a outros sítios/receptores, seja por sua ação como antioxidante e na eliminação de radicais livres. Quanto à última, discutimos amplamente a ancestral e ubíqua ação da molécula, seja por sua ação direta ou pela estimulação de enzimas antioxidantes. Assim, mesmo que não tenha sido possível chegar a uma conclusão ainda que parcial sobre os mecanismos de ação ou mesmo determinar um sítio de ação da melatonina, nossos estudos abrem um horizonte de pesquisas relacionadas ao papel da molécula na imunomodulação de poríferos.

6. Conclusões

Detectamos a presença de melatonina em extratos de esponja *H. heliophila*. No entanto, como já discutido, não nos foi possível realizar sua dosagem, sendo necessárias novas análises para determinar uma possível ritmicidade em sua síntese, bem como seu local de produção. Até o momento, os cnidários haviam sido o grupo de invertebrados mais basal no qual a melatonina foi relatada (Peres *et al.*, 2014). Nesses animais, o papel da molécula como sinalizadora no sistema circadiano é o único averiguado até o presente. No entanto, a importante e vasta função dessa indoleamina no sistema imune, isso incluindo, seu papel quase universal como agente antioxidante, é bastante conhecido e investigado em uma ampla gama de organismos, desde bactérias e protozoários até seres humanos. Sendo assim, o presente trabalho teve como um de seus objetivos investigar as possíveis funções da melatonina no sistema imune de poríferos. Ademais, uma vez demonstrado o comportamento rítmico desses animais - com variações circadianas em seu comportamento - e a ausência de um sistema neural, um papel simultâneo da molécula como sinalizador no sistema circadiano torna-se deveras factível. Assim, nosso trabalho além de ser o primeiro a demonstrar a presença de melatonina em poríferos, empenhou-se em traçar os possíveis papéis da molécula na sinalização daqueles que são considerados por muitos estudiosos, os primeiros organismos multicelulares na filogenia dos metazoários. Tais informações vão fornecer importantes subsídios para estudos subsequentes, no que concerne aos mecanismos envolvidos na evolução funcional e integrativa de organismos multicelulares.

7. Referências

- Abran, D.; Anctil, M. & Ali, M. A. Melatonin activity rhythms in eyes and cerebral ganglia of *Aplysia californica*. *Gen. Comp. Endocr.* **96**, 215-222 (1994).
- Anctil, M. Modulation of a rhythmic activity by serotonin via cyclic AMP in the coelenterate *Renilla köllikeri*. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **159**, 491–500 (1989).
- Anctil, M., Pani, A.K., and Ali, M.A. Modulation of rhythmic contractions by melatonin via cyclic GMP in the coelenterate *Renilla koellikeri*. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **161**, 569–575 (1991).
- Barnwell, F. H. The role of rythmic systems in the adaption of fiddler crabs to the intertidal zone. *Am. Zool.* **8**, 569–583 (1968).
- Benítez-King, G. & Antón-Tay, F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* **49**, 635–641 (1993).
- Bentkowski, P.; Markowska, M. & Pijanowska, J. Role of melatonin in the control of depth distribution of *Daphnia magna*. *Hydrobiologia* **643**, 43–50 (2010).
- Borchiellini, C.; Manuel, M.; Alivon, E.; Vacelet, J. & Parco, Y. L. E. Sponge paraphyly and the origin of Metazoa. *J. Evo. Biol.* **14**, 171–179 (2001).
- Boury-Esnault, N. & Rützler, K. Thesaurus of sponge morphology. *Smithsonian Contrib. Zool.* **596**, 1-55 (1997).
- Bubenik, G. A. & Pang, S. F. Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians, and a reptile. *Gen. Comp. Endocrinol.* **106**, 415–9 (1997).
- Bucior, I.; Scheuring, S.; Engel, A. & Burger, M. M. Carbohydrate-Carbohydrate Interaction Provides Adhesion Force and Specificity for Cellular Recognition. *J. of Cell Biology* **165**(4), 529–37 (2004).
- Carrillo-Vico, A.; Guerrero, J. M.; Lardone, P. J. & Reiter, R. J. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* **27**, 189–200 (2005).
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Relatório de qualidade das praias no estado de São Paulo 2016**. São Paulo: CETESB, 2016.
- Conway-Morris, S. Early metazoan evolution: Reconciling paleontology and molecular biology. *Amer. Zool.* **38**, 867–877 (1998).

- Custódio, M. R.; Prokic, I.; Steffen, R.; Koziol, C.; Borojevic, R.; Brümmer, F.; Nickel, M. & Müller, W. E. G. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech. of ageing and develop.* **105**: 45-59 (1998).
- Custódio, M. R.; Hajdu, E. & Muricy, G. Cellular Dynamics of in Vitro Allogeneic Reactions of Hymeniacidon Heliophila (Demospongiae: Halichondrida). *Marine Biology* **144**(5), 999–1010 (2004).
- Custódio, M. R. & Hadju, E. Checklist de Porifera do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* **11**, 427-444 (2011).
- Cruz-Machado, S. S.; Carvalho-Souza, C. M.; Tamura, E. K.; Pinato, L.; Cecon, E.; Fernandes, P. A. C. M.; Avellar, M. C. W.; Ferreira, Z. S. & Markus, R. P. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFkB pathway. *J. Pineal Res.* **49**, 183-192 (2010).
- De Ceccatty, M. P. Coordination in Sponges. *The Foundations of Integration*. 895–904 (1974).
- Dohrmann, M.; Janussen, D.; Reitner, J.; Collins, A. G. & Worheide, G. Phylogeny and Evolution of Glass Sponges (Porifera, Hexactinellida). *Syst. Biol.* **57**, 388–405 (2008).
- Dunham, P., Anderson, C., Rich, A. M. & Weissmann, G. Stimulus-response coupling in sponge cell aggregation: Evidence for calcium as an intracellular messenger. *Develop. Biol.* **80**, 4756–4760 (1983).
- Dunham P, Weissmann G (1986). Aggregation of marine sponge cells induced by Ca pulses, Ca ionophores, and phorbol esters proceeds in the absence of external Ca. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**:1319–1326.
- Dubocovich, M. & Markowska, M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocr.* **27**, 101-110 (2005).
- Ebisawa, T.; Karnet, S.; Lerner, M. R.; Reppert, S. M. & Haven, N. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Neurobiology.* **91**, 6133–6137 (1994).
- Eerkes-Medrano, D.; Feehan, C. J. & Leys, S. P. Sponge cell aggregation: checkpoints in development indicate a high level of organismal complexity. *Invert. Biol.* **(X)X**, 1–18 (2014).
- Efremova, S. M. Morphological analysis of the development of sponge *Ephydatia fluviatilis* from dissociated cells, *Vestn. Leningr. Univ.* **9**, 39–53 (1969).

- Elliott, G. R. D. & Leys, S. P. Coordinated contractions effectively expel water from the aquiferous system of a freshwater sponge. *J. Exp. Biol.* **210**, 3736–3748 (2007).
- Ellwanger, K. & Nickel, M. Neuroactive substances specifically modulate rhythmic body contractions in the nerveless metazoon *Tethya wilhelma* (Demospongiae, Porifera). *Front. Zool.* **3**, 7 (2006).
- Ellwanger, K., Eich, A. & Nickel, M. GABA and glutamate specifically induce contractions in the sponge *Tethya wilhelma*. *J. Comp. Physiol. A.* **193**, 1–11 (2007).
- Fernández-Busquets, X. & Burger, M. M. Cell Adhesion and Histocompatibility in Sponges. *Microscopy Research and Technique* **44** (4), 204–18 (1999).
- Fernández-Busquets, X. The sponge as a model of cellular recognition. *Source B. Model. Biomed. Res.* 75–83 (2008).
- Finocchiaro, L.; Callebert, J.; Launay, J. M. & Jallon, J. M. Melatonin biosynthesis in *Drosophila*: its nature and its effects. *J. Neurochem.* **50**, 382–387 (1988).
- Fuhrberg, B.; Balzer, I.; Hardeland, R.; Werner, A. & Liining, K. The vertebrate pineal hormone melatonin is produced by the brown alga *Pterygophora californica* and mimics dark effects on growth rate in the light. *Planta* **200**, 125–131 (1996).
- Gaino, E.; Zunino, L. Burlando, B. & Sarà, M. The Locomotion of Dissociated Sponge Cells: A Cell-by-cell, Time-lapse Film Analysis. *Cell Motility* **5**, 463–73 (1985).
- Galtsoff, P. S. Regeneration after Dissociation (an Experimental Study on sponges). *Biol. Bull.* **45**, 183–221 (1923).
- Gao, N. & Hardie, J. I. M. Melatonin and the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* **43**, 615–620 (1997).
- Gubitoso, S.; Duleba, W.; Teodoro, A. C.; Prada, S. M; Rocha, M. M.; Lamparelli, C. C.; Bevilacqua, J. E. & Moura, D. O. Estudo Geoambiental da região circunjacente ao emissário submarino de esgoto do Araçá, São Sebastião (SP). *Rev. Bras. Geoc.* **38**(3), 467-475 (2008).
- Hajdu E.; Peixinho, S. & Fernandez, J. C. C. **Esponjas Marinhas da Bahia**. Museu Nacional (RJ). Série Livros 45. 276 págs. (2011).
- Hardeland, R. & Poeggeler, B. Non-vertebrate melatonina. *P. Res.* **34**, 233–241 (2003).
- Hardeland, R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2001–18 (2008).

- Hejnal, A.; Obst, M.; Stamatakis, A.; Ott, M.; Rouse, G. W.; Edgecombe, G. D.; Martinez, P.; Baguña, J.; Bailly, X.; Jondelius, U.; Wiens, W.; Müller, W. E. G.; Seaver, E.; Wheeler, W. C.; Martindale, M. Q.; Giribet, G.; Dunn, C. W. Assessing the root of bilaterian animals with scalable phylogenomic methods. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **276**, 4261–4270 (2009).
- Hortellani, M. A.; Sarkis, J. E. S.; Abessa, D. M. S. & Sousa, E. C. P. M. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do Estuário Santos - São Vicente. *Quim. Nova* **31**, 10–19 (2008).
- Itoh, M. T.; Shinozawa, T. & Sumi, Y. Circadian Rhythms of Melatonin-Synthesizing Enzyme Activities and Melatonin Levels in Planarians. *Brain Research* **830**, 165–73 (1999).
- Ji, Y. L.; Wang, H.; Meng, C.; Zhao, X.F.; Zhang, C.; Zhang, Y.; Zhao, M.; Chen, Y. H.; Meng, X. H. & Xu, D.X. Melatonin alleviates cadmium-induced cellular stress and germ cell apoptosis in testes. *J. Pineal Res.* **52**, 71–79 (2012).
- Jindrich, K.; Roper, K. E.; Lemon, S.; Degnan, B. M.; Reitzel, A. M. & Degnan, S. M. Origin of the Animal Circadian Clock: Diurnal and Light-Entrained Gene Expression in the Sponge *Amphimedon queenslandica*. *Front. Mar. Sci.* **4**, 463–473 (2017).
- Jones, B. Y. W. C. Is there a nervous system in sponges? *Biol.Rev.* **37**, 1–50 (1962).
- Lan-Chow-Wing, O.; Confente, F.; Herrera-Pérez, P.; Isorna, E.; Chereguini, O.; Rendón, M. C.; Falcón, J. & Muñoz-Cueto, J. A. Distinct expression profiles of three melatonin receptors during early development and metamorphosis in the flatfish *Solea senegalensis*. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 20789–20799 (2014).
- Last, K. S.; Bailhache, T.; Kramer, C.; Kyriacou, C. P.; Rosato, E. & Olive, P. J. W. Tidal, daily, and lunar-day activity cycles in the marine polychaete *Nereis virens*. *Chronobiol. Int.* **26**, 167–183 (2009).
- Lavrov, A. I. & Kosevich, I. A. Sponge cell reaggregation: Mechanisms and dynamics of the process. *Russ. J. Dev. Biol.* **45**, 205–223 (2014).
- Lerner, A.B., Case, J.D.; Takahashi, Y.; Lee, T.H. & Mori, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 2587 (1958).
- Leys, S. P. & Meech, R. W. Physiology of coordination in sponges. *Can. J. Zool.* **84**, 288–306 (2006).

- Leys, S. P. Sponge coordination, tissues, and the evolution of gastrulation. *Porifera Res.* 53–59 (2007).
- Leys, S. P. & Hill, A. The physiology and molecular biology of sponge tissues. *Advances in marine biology* **62**, 1-56 (2012).
- Lopes, C.; DeLyra, J. L.; Markus, R. P. & Mariano, M. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J. Pineal Res.* **23**, 72–8 (1997).
- Lotufo, C. M. C.; Lopes, C.; Dubocovich, M. L.; Farsky, S. H. P. & Markus, R. P. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur. J. Pharmacol.* **430**, 351–357 (2001).
- Markowska, M.; Bentkowski, P.; Kloc, M. & Pijanowska, J. Presence of melatonin in *Daphnia magna*. *J. Pineal Res.* **46**, 242–4 (2009).
- Markus, R. P.; Ferreira, Z. S.; Fernandes, P. A. C. M. & Cecon, E. The Immune-Pineal Axis: Paracrine Melatonin Sources. *Neuroimmunomodulation* **14**, 126–133 (2007).
- McCord C. P. & Allen F. P. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.* **23**, 207–224 (1917).
- Mechawar, N. & Anciaux, M. Melatonin in a primitive Metazoan: Immunohistochemical seasonal changes of levels and immunohistochemical visualization in neurons. *J. Comp. Neur.* **387**: 243-254 (1997).
- Medina, M.; Collins, A.G.; Silberman, J. & Sogin, M.L. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 9707-9712 (2001).
- Morita, M. & Best, J. B. Effects of photoperiods and melatonin on planarian asexual reproduction. *J. Exp. Zool.* **231**, 273–282 (1984).
- Müller, W. E. G. & Müller, I. Sponge Cell Aggregation. *Mol. & Cell. Biochem.* **29**(3), 131-143 (1980).
- Müller, W. E. G. The Origin of Metazoan Complexity: Porifera as Integrated Animals. *Integr. Comp. Biol.* **43**, 3–10 (2003).
- Nickel, M. Kinetics and rhythm of body contractions in the sponge *Tethya wilhelma* (Porifera: Demospongiae). *J. Exp. Biol.* **207**, 4515–24 (2004).

- Nickel, M.; Scheer, C.; Hammel, J. U.; Herzen, J. & Beckmann, F. The contractile sponge epithelium sensu lato – body contraction of the demosponge *Tethya wilhelma* is mediated by the pinacoderm. *J. Exp. Biol.* **214**, 1692–1698 (2011).
- Pandi-Perumal, S. R.; Trakht, I.; Srinivasan, V.; Spence, D. W.; Maestroni, G. J. M.; Zisapel, N. & Cardinali, D. P. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.* **85**, 335–353 (2008).
- Paredes, S. D.; Korkmaz, A.; Manchester, L. C.; Tan, D. & Reiter, R. J. Phytomelatonin: a review. *J. Exp. Bot.* **60**, 57–69 (2009).
- Pavans de Ceccatty, M. Effects of drugs and ions on a primitive system of spontaneous contractions in a sponge (*Euspongia officinalis*). *Experientia* **27**, 57–59 (1971).
- Pavans de Ceccatty, M. Coordination in sponges. The foundations of integration. *Am. Zool.* **14**, 895–903 (1974).
- Pereira, C. D. S.; Maranhão, L. A.; Cortez, F. S.; Pusceddu, F. H.; Santos, A. R.; Ribeiro, D. A.; Cesar, A. & Guimarães, L. L. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Sci. Total Environ.* **548–549**, 148–154 (2016).
- Peres, R.; Reitzel, A. M.; Passamaneck, Y.; Afeche, S. C.; Cipolla-Neto, J.; Marques, A. C.; Martindale, M. Q. Developmental and light-entrained expression of melatonin and its relationship to the circadian clock in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Evodevo* **5**, 26 (2014).
- Philp, R. B. Effects of pH and oxidant stressors (hydrogen peroxide and bleach) on calcium-induced aggregation of cells of the marine sponge *Microciona prolifera*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **118**, 347–351 (1997).
- Philp, R. B. Effects of experimental manipulation of pH and salinity on Cd^{2+} uptake by the sponge *Microciona prolifera* and on sponge cell aggregation induced by Ca^{2+} and Cd^{2+} . *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **41**, 282–288 (2001).
- Poggeler, B.; Balzer, I. & Hardeland, R. Pineal Hormone Melatonin Oscillates Also in the Dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften* **78**, 268–269 (1991).
- Redmond, N. E.; Morrow, C. C.; Thacker, R. W.; Diaz, M. C.; Boury-Esnault, N.; Cárdenas, P.; Hadju, E.; Lôbo-Hadju, G.; Picton, B. E.; Pomponi, S. A.; Kayal, E. & Collins, A. G.

- Phylogeny and Systematics of Demospongiae in light of new small-subunit ribosomal DNA (18S) sequences. *Int. Comp. Biol.* **53**, 388-415 (2014).
- Ren, D. L.; Li, Y. J.; Hu, B. B.; Wang, H. & Hu, B. Melatonin regulates the rhythmic migration of neutrophils in live zebrafish. *J. Pineal Res.* **58**, 452–460 (2015).
- Reppert, S. M.; Weaver, D. R.; Cassone, V. M.; Godson, C. & Kolakowski, L. F. Melatonin Receptors Are for the Birds: Molecular Analysis of Two Receptor Subtypes Differentially Expressed in Chick Brain. *Neuron.* **15**, 1003–1015 (1995).
- Reiswig, H. M. In-situ pumping activities of tropical Demospongiae. *Mar. Biol.* **9**, 38-50 (1971).
- Roth, J. J.; Gern, W. & Roth, E. C. Nonpineal Melatonin in the Alligator (*Alligator mississippiensis*). *Science* **210**, 548–550 (1980).
- Sanetra, M.; Begemann, G.; Becker, M. & Meyer, A. Conservation and co-option in developmental programmes: the importance of homology relationships. *Frontiers in Zoo.* **2**: 15. (2005).
- Simpson, T. L. The cell biology of sponges. Springer, Berlin Heidelberg New York (1984).
- Schippers, K.; Sipkema, D.; Osinga, R.; Smidt, H.; Pomponi, S.A.; Martens, D.; Wijffels, R.H. Cultivation of sponges, sponge cells and symbionts: achievements and future prospects. *Adv. Mar. Biol.* **62**:273–337 (2012).
- Sprenger, J.; Hardeland, R.; Fuhrberg, B. & Han, S. Melatonin and Other 5-Methoxylated Indoles in Yeast: Presence in High Concentrations and Dependence on Tryptophan Availability. *Cytologia (Tokyo).* **64**, 209–213 (1999).
- Ternon, E.; Zarate, L.; Chenesseau, S; Croué, J.; Dumollard, R.; Suzuki, M.T. & Thomas, O.P. Spherulization as a process for the exudation of chemical cues by the encrusting sponge *C. crambe*. *Nature.* 1–11 (2016).
- Tessmar-Raible, K.; Raible, F. & Arboleda, E. Another place, another timer: Marine species and the rhythms of life. *BioEssays* **33**, 165–172 (2011).
- Tsim, S. T.; Wong, J. T. & Wong, Y. H. CGP 52608-induced cyst formation in dinoflagellates: possible involvement of a nuclear receptor for melatonin. *J.Pineal Res.* **21**, 101–107 (1996).

- Vernadakis, A. J.; Bemis, W. E. & Bittman, E. L. Localization and partial characterization of melatonin receptors in amphioxus, hagfish, lamprey, and skate. *Gen. Comp. Endocrinol.* **110**, 67–78 (1998).
- Vivien-Roels. B.; Pevet, P.; Beck, O. & Fevre-Montange, M. Identification of Melatonin in the Compound Eyes of an insect, the locust (*Locusta migratória*), by radioimmunoassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Neurosc. Letters.* **49**: 153–57 (1984).
- Vivien-Roels, B. & Pévet, P. Melatonin: presence and formation in invertebrates. *Experientia.* **49**, 642–647 (1993).
- Weissenfels, N. Condensation rhythm of fresh-water sponges (*Spongillidae*, *Porifera*). *Eur J Cell Biol.* **53**, 373-383 (1990).
- Wilson, H. V. A new method by which sponges may be artificially reared. *Science.* **XXV**: 912-915 (1907a).
- Wilson, H. V. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J. Exp. Biol. Zool.* **5**: 245-258 (1907b)
- Yamano, H.; Watari, Y.; Arai, T. & Takeda, M. Melatonin in drinking water influences a circadian rhythm of locomotor activity in the house cricket, *Acheta domesticus*. *J. Insect Physiol.* **47**, 943–949 (2001).
- Yoshizawa, Y.; Wakabayashi, K. & Shinozawa, T. Inhibition of planarian regeneration by melatonin. *Hydrobiologia* **227**, 31–40 (1991).
- Zocchi, E. Carpaneto, A.; Cerrano, C.; Bavestrello, G.; Giovine, M.; Bruzzone, S.; Guida, L.; Franco, L. & Usai, C. The temperature-signaling cascade in sponges involves a heat-gated cation channel, abscisic acid, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14859–14864 (2001).