Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento de Fisiologia Geral
Programa de Pós Graduação em Ciências
(Mestrado – Fisiologia Geral)

CAMILA HELENA DE SOUZA QUEIROZ

Estratégias e fisiologia do consumo e digestão de esponjas
(Porifera) por *Echinaster brasiliensis*
(Echinodermata: Asteroidea)

Strategies and physiology of the consumption and digestion
of sponges (Porifera) by *Echinaster brasiliensis*
(Echinodermata: Asteroidea)

SÃO PAULO 2012

CAMILA HELENA DE SOUZA QUEIROZ

**Estratégias e fisiologia do consumo e digestão de esponjas (Porifera) por
Echinaster brasiliensis (Echinodermata: Asteroidea)**

Exemplar corrigido de dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências, na área de
Fisiologia. O original de encontra na Biblioteca do Instituto de Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

SÃO PAULO 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Queiroz, C.

Estratégias e fisiologia do consumo e digestão de esponjas (Porifera) por *Echinaster brasiliensis* (Echinodermata: Asteroidea)
páginas

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

Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências. Departamento de
Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

Orientador

*Aos meus amados pais,
Jussara e Marcelo, e ao meu
grande amor, Rafael.*

VENCERÁS

Não desanimes.

Persiste mais um tanto.

Não cultives pessimismo.

Centraliza-te no bem a fazer.

Esquece as sugestões do medo destrutivo.

Segue adiante, mesmo varando a sombra dos próprios erros.

Avança ainda que seja por entre lágrimas.

Trabalha constantemente.

Edifica sempre.

Não consintas que o gelo do desencanto te entorpeça o coração.

Não te impressiones nas dificuldades.

Convence-te de que a vitória espiritual é construção para o dia-a-dia.

Não desistas da paciência.

Não creias em realizações sem esforço. (...)

Ama sempre, fazendo pelos outros o melhor que possas realizar.

Age auxiliando.

Serve sem apego.

E assim vencerás.

Emmanuel

AGRADECIMENTOS

São muitos os agradecimentos a serem feitos. Em primeiro lugar agradeço à Deus que acima de todos sempre esteve ao meu lado e me deu tudo que mais amo e todos os aprendizados necessários em minha trajetória.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa e reserva técnica, sem as quais não conseguiria realizar este trabalho.

Ao meu orientador, Márcio Reis Custódio, por aceitar o projeto, por se dedicar a ele e me orientar com sabedoria e bom humor, por ouvir minha voz alta, minhas “estabanadices” e idéias mirabolantes.

À Alessandra Pereira Majer, minha eterna orientadora, minha amiga e uma das melhores pessoas que conheço. Ale, obrigada por me ensinar a coletar no canal de São Sebastião, por me incentivar a fazer mestrado, pelas conversas sobre amor, pesquisa ou só sobre cotidiano mesmo.

Agradeço com muito amor aos meus pais que sempre estiveram presentes mesmo com a quilometragem atrapalhando. Mãe, obrigada por me atender todas as 10 vezes ao celular quanto algo não ia bem na pesquisa. E pai, obrigada por me dar conselhos de paciência e sempre me dizer que tudo tem sua hora.

Agradeço ao Rafael Nobre, por ser meu amigo, companheiro, namorado. Obrigada por aguentar meu desespero, mau humor, por me ajudar na coleta, no backup dos resultados, nas comemorações. Sem palavras amor!

À grande amiga Patrícia Lacouth por ser minha fiel escudeira (Ou eu a dela). E me ensinar o dia-a-dia do laboratório, me fazer entender a histologia e aceitar ir coletar comigo mesmo levando nadadeiras. Obrigada pelos conselhos sensatos, as broncas edificantes e a companhia inigualável.

A todos os alunos e professores do Departamento de Fisiologia Geral/IB que estiveram comigo em aulas, Curso de Inverno ou somente nos cafés da copa mesmo. Estes momentos foram muito importantes na minha formação de mestra. Maria Nathália, Leopoldo, Diego, Bruno, Suélen. Vocês tem um lugar especial no meu coração.

Ao Enrique Rozas pela experiência em experimentos, estatísticas e protocolos enzimáticos. Aos técnicos do Instituto de Biociências e do CebiMar-USP pelo auxílio nas coletas, na montagem dos experimentos e pelas conversas sobre o mar e sobre a biologia marinha. Vagner, Enio, Elcio, Joseilto, Eduardo e Joseph, vocês foram muito importantes para este projeto.

A minha família, que sempre esteve presente para os descansos de fim de semana, festas e comemorações. Todos os momentos com vocês foram um alento para que eu voltasse ao dia a dia mais feliz. Em especial ao meu avô, que mesmo perguntando sempre o que eu fazia, me fez me sentir feliz por saber que sou um orgulho pra ele.

Agradeço por fim a todos que participaram e acreditaram neste projeto e que com certeza, contribuíram para que ele por fim, fosse realizado.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	II
Introdução	1
Filo Porifera	1
Filo Echinodermata	4
Espongivoria	8
Objetivos	12
Material e Métodos	13
Modelo de estudo	13
Observações em campo, coleta e manutenção dos animais	14
Experimentos de alimentação	14
Ração de matéria orgânica e inorgânica	17
Composição orgânica das esponjas utilizadas como alimento	17
Tempo de digestão	19
Excreção e análise de componentes esqueléticos	21
Efeitos sobre o trato digestivo de <i>Echinaster brasiliensis</i>	22
Processamento histológico	23
Ensaio enzimáticos	23
Observação de celomócitos de <i>Echinaster brasiliensis</i>	25
Resultados	26
Comportamento alimentar: espécies predadas e taxas de consumo	26
Composição orgânica das principais espécies de presas	29
Digestão e excreção	32
Efeitos sobre o trato digestivo de <i>Echinaster brasiliensis</i>	37
Enzimas digestivas	39
Variações celulares devido a ingestão de componentes alimentares	40
Discussão	42
Comportamento alimentar e taxas de consumo	42
Composições orgânica das esponjas	45
Processos digestivos	49
Absorção de nutrientes e celomócitos	53
Conclusão	56
Lista de figuras e tabelas	57
Lista de abreviaturas	60
Referências	61

RESUMO

Esponjas são sésseis e possuem um esqueleto constituído por elementos inorgânicos microscópicos (espículas), fibras de colágeno e/ou combinações destes dois componentes. Embora sem proteções físicas evidentes tais como conchas ou espinhos, são pouco predadas, sendo este fato atribuído principalmente à presença de metabólitos secundários ativos. Recentemente, um papel dos componentes esqueléticos como deterrente foi experimentalmente confirmado, mas sua importância relativa ainda é bastante debatida. Algumas estrelas-do-mar são consideradas como esponjívoras, e a literatura existente geralmente coloca que a digestão é realizada externamente, sem ingestão do esqueleto da presa. Desta forma, neste trabalho foram verificados o comportamento alimentar da estrela-do-mar *Echinaster brasiliensis* em relação às esponjas, investigando o destino dos componentes esqueléticos e seus efeitos na fisiologia do organismo. Foi verificado que *E. brasiliensis* se alimenta de diferentes espécies de esponjas mas não consome apenas estes organismos, sendo mais generalista do que o suposto consumindo artêmias e anêmonas. As preferências no consumo das esponjas são determinados por fatores diversos, como a quantidade de matéria orgânica ou formato do organismo predado. A ingestão ocorre com a eversão do estômago, mas ao contrário do descrito para outras espécies, *E. brasiliensis* ingere componentes esqueléticos, sendo espículas encontradas inseridas no epitélio digestivo. Entretanto, essa ingestão é baixa e não causa injúrias severas ao organismo, sendo as espículas descartadas no material fecal.

Palavras-chave: esponjivoria; digestão; enzimas digestivas.

ABSTRACT

Sponges are sessile organisms with a skeleton made of microscopic inorganic elements (spicules), collagen fibers and/or a combination of these two components. Although without clear physical defenses, such as shells or spines, they are not preyed upon, and this is attributed mainly to the presence of active secondary metabolites. Recently, the deterrent role of skeletal components has been experimentally confirmed, but its relative importance is still debated. Some starfishes are regarded as spongivorous, and the existing literature generally considers that the digestion is performed externally, without ingestion of the sponge skeleton. In this study the feeding behavior of the starfish *Echinaster brasiliensis* in relation to sponges was studied, focusing in the fate of skeletal components and their effects on the starfish physiology. Field observations and laboratory experiments were conducted to determine the consumption strategies used by the starfish. Different species of sponges were consumed by *E. brasiliensis*, but not only these were preyed upon (also), being this species more generalist than assumed. Preferences in the consumption of sponges were influenced by several factors, such as the amount of organic matter or shape of the preyed organism. The intake occurs by the eversion of the stomach, but unlike what is described for other species *E. brasiliensis* ingests skeletal components, and spicules were found inserted in the digestive epithelium. However, this intake is small and does not cause severe injuries to the starfishes, with the spicules being discarded in fecal material.

Key-words: spongivory; digestion; digestive enzymes.

1.0 INTRODUÇÃO

Entre os fatores bióticos que afetam os animais, a alimentação é considerada de suma importância (Ivlev 1961), dependendo de mecanismos morfológicos, fisiológicos e comportamentais. Porém, estudos sobre o comportamento alimentar enfocam não só na eficiência do forrageamento, mas também em outros fatores, tais como tamanho e disponibilidade da presa, além de características do predador, como tamanho, força, comportamento e fisiologia digestiva. Por meio da combinação entre estes fatores os animais são capacitados a adquirir e ingerir os itens alimentares, reduzindo substratos complexos a moléculas, e absorvendo os nutrientes disponíveis (Sibly 1981)

Um dos fatores que interferem na alimentação são as características da presa. Organismos sésseis são mais expostos a processos físicos e biológicos que ameaçam sua sobrevivência. Eles reduzem estes desafios com variações em sua estrutura morfológica, fisiológica, com estratégias de crescimento ou regeneração, ou ainda com defesas ecológicas para evitar competição (Hoppe 1988).

1.1 *Filo Porifera*

Um dos grupos de animais sésseis com características anti-predação mais acentuadas são as esponjas (filo Porifera), organismos abundantes e bastante comuns em uma grande variedade de ambientes aquáticos. São facilmente encontradas em todos os habitats marinhos, como recifes de corais, manguezais, costões rochosos e cavernas desde os trópicos até regiões polares (Bell & Barnes 2001, Wulf 2006a). Mesmo em corpos de água doce podem representar parte importante da biomassa da macrofauna bentônica (Frost et al. 1982; Melão & Rocha 1999).

Possuem um sistema esquelético baseado em elementos inorgânicos microscópicos (espículas de sílica ou carbonato de cálcio), em fibras de colágeno

("espongina") e/ou combinações destes dois em diferentes graus. As espículas localizam-se primariamente na parte mais interna, o mesófilo, mas frequentemente se projetam em paliçada através da superfície. A quantidade e o arranjo é bastante variado nas diferentes espécies, e podem estar parcialmente ou totalmente incluídas em colágeno. São divididas em megascleras, espículas maiores e principais elementos do esqueleto; e microscleras, consideravelmente menores e em geral com funções secundárias, como o reforço de algumas áreas de contato com o meio externo (Boury-Esnault & Ruetzler 1997, Bergquist 1978). Em ambos os casos, as formas são extremamente variadas e tem uma importância fundamental na taxonomia da maioria das espécies. Devido a isso, possuem uma nomenclatura específica, com mais de 230 tipos diferentes (*e.g.* óxeas, estilos, tilotos, sigmas, anisoquelas, oniquetas, estrôngilos, entre outros - Hooper & van Soest 2002). Características estruturais dos vários formatos também são detalhadas. Por exemplo, espículas com apenas um eixo (axis) são denominadas *monoaxonais*; com mais eixos são *di*, *tri* ou *tetraxonais*. Da mesma forma, as que possuem uma única terminação pontiaguda (actina) são *monoactinais*; com duas são *diactinais*.

Embora a quantidade de espículas possa ser uma fração importante do corpo do animal, estas são em geral pequenas, numa ordem de grandeza que varia de poucos micrômetros (para as microscleras) até um ou dois milímetros (para as megascleras). Sendo assim, considera-se que esponjas não possuem estruturas defensivas específicas, como as evidentes em outros grupos (*e.g.* conchas, espinhos ou carapaças rígidas). Apesar disso, e de apresentem um alto teor de proteína e energia (Waddel & Pawlik 2000a, 2000b), prosperam em ecossistemas caracterizados por uma alta pressão de predação (Huston 1985, Pawlik 1993). São poucos os animais que se alimentam primariamente destes organismos e tipicamente somente pequenas porções de esponjas são consumidas, ao invés de indivíduos inteiros. Desta

forma, interações esponja-predador não têm sido identificadas como determinantes na estrutura das comunidades marinhas de clima temperado (Wulff 2006a).

Este uso limitado das esponjas como alimento é atribuído tradicionalmente às suas defesas químicas, que incluem toxinas com propriedades antipredação comprovadas em experimentos controlados e no campo (Pawlik et al. 1988, Pawlik 1993, Wadell & Pawlik 2000). Apesar disso, nos últimos anos vem sendo verificado um possível papel defensivo pelo menos quanto às espículas, tanto no caso de megascleras (Burns & Ilan 2003, Hill et al. 2005) como microscleras (Ferguson & Davis 2008). Tais componentes esqueléticos poderiam apresentar um potencial dissuasivo, irritando o aparelho bucal do predador (Randall & Hartman 1968).

Entretanto, experimentos para testar a efetividade das defesas físicas têm mostrado resultados contrastantes. Em alguns trabalhos as espículas de diferentes espécies, independentemente do tipo ou tamanho, foram ineficazes em reduzir as taxas de consumo de peixes, caranguejos e estrelas-do-mar (Chanas & Pawlik 1996, Wadell & Pawlik 2000a, 2000b). Por outro lado, Uriz e colaboradores (1996) demonstraram a eficiência de defesas físicas na esponja do Mediterrâneo *Crambe crambe*, cujo esqueleto intacto reduziu a alimentação por uma espécie de ouriço do mar. Em outro estudo mais recente (Burns & Ilan 2003) foi constatado que espículas isoladas desempenham papel de defesa em cerca de 40% das esponjas analisadas durante ensaios com peixes do gênero *Thalassoma* no Mar Vermelho e Caribe.

Além da possibilidade de agir diretamente como deterrentes, a presença de constituintes esqueléticos pode também alterar a qualidade nutricional dos tecidos das esponjas. Espículas de sílica são quimicamente inertes, e as fibras de espongina são especialmente resistentes a tratamentos enzimáticos e, portanto difíceis de digerir (Garrone et al. 1985, Bjorndal 1990). Uma vez que boa parte da massa tecidual das esponjas é constituída principalmente por espículas e/ou fibras de espongina, estas seriam presas de qualidade nutricional reduzida. O baixo consumo pode então ser

explicado segundo a teoria do forrageamento, pela qual predadores devem preferir presas com maior valor energético e nutricional àsquelas de menor qualidade (Pulliam 1974, Pike 1984).

Embora as esponjas claramente possuam defesas anti-predação eficientes, organismos de grupos diversos podem consumir seus tecidos. Os principais espongiívoros são algumas espécies de peixes, tartarugas e caranguejos (Wulff 2006b, Waddel & Pawlik 2000a,b), sendo nudibrânquios e equinodermos considerados como seus consumidores mais importantes (Dayton et al. 1974, McClintock et al. 2005).

1.2 Filo Echinodermata

Equinodermos (filo Echinodermata) são organismos exclusivamente marinhos e bentônicos, sendo encontrados em todos os oceanos, tanto nas zonas polares quanto tropicais, desde a região do mesolitoral até as grandes profundidades (Hyman 1955, Lawrence 1987). Atualmente existem cerca de 7.000 espécies (Pawson 2007), das quais 300 registradas no Brasil, distribuídas em seis classes: Asteroidea (estrelas-do-mar), Crinoidea (lírios-do-mar), Ophiuroidea (serpentes-do-mar), Echinoidea (ouriços e bolachas-do-mar), Holothuroidea (pepinos-do-mar) e Concentricycloidea (uma classe recém criada). Constituem um dos grupos de maior importância na estrutura das comunidades bentônicas, onde ocupam diversos níveis tróficos (Ventura et al. 2006). Apresentam grande variedade de mecanismos alimentares e nutricionais com diferentes modificações estruturais entre as classes, possivelmente uma característica responsável pelo sucesso deste filo desde o período Cambriano até o presente (Ferguson 1969).

A diversidade de mecanismos alimentares dos equinodermos tem relação com sua fisiologia e anatomia digestiva. Na classe Asteroidea, grupo que apresenta grande diversidade de itens alimentares, O trato digestivo passa diretamente pelo eixo oral-aboral da boca ao ânus no curto eixo vertical do corpo. É dividido em sucessivas

regiões especializadas, denominadas estômago cardíaco, estômago pilórico e intestino (Anderson 1960) (**Fig. 1**). Não possuem aparato mastigador específico, tais como dentes ou placas ósseas, sendo a boca circundada apenas por uma membrana peristomial espessa. No início do processo, proteases e agentes emulsificantes são secretados no estômago cardíaco para auxiliar na desintegração do alimento. O alimento parcialmente digerido é então levado aos cecos pilóricos, que se estendem ao longo dos braços e que contém proteases adicionais, amilases e lipases que atuam em meio mais ácido que a água do mar (Boolotian 1966). Completada a digestão, os restos são liberados por um ânus localizado na região aboral.

A principal fonte de alimento para a maioria dos equinodermos é constituída de material particulado pequeno, incluindo plâncton, detritos e restos de plantas e animais. Entretanto, existe um número grande de predadores entre os ofiuróides, asteróides e equinóides que podem se alimentar de porções maiores que, portanto, devem ser ingeridas e reduzidas para que ocorra sua digestão. Na maioria destes casos, após a captura e ingestão, a digestão ocorre internamente. No entanto, na classe Asteroidea esta ocorre em diversas espécies fora do corpo do animal.

Nestes casos, o estômago é evertido pela boca e as fases iniciais da digestão ocorrem externamente, uma forma de alimentação utilizada para uma grande variedade de recursos alimentares (Jangoux 1982). Este conceito de digestão extracorpórea foi reconhecido já em 1910 por H. Jordan (Jordan 1910, Cohen 1995), e não exclusiva para equinodermos. Atualmente sabe-se que este mecanismo está presente em pelo menos 12 dos 30 filos de invertebrados: Protozoa, Platyhelminthes, Rhynchocoela, Rotifera, Nematoda, Annelida, Mollusca, Arthropoda, Onychophora, Pogonophora, Sipuncula e Echinodermata (Cohen 1995).

Figura 1: Trato digestivo da classe Asteroidea. **A)** Radiografia de *Echinaster brasiliensis* mostrando o canal ambulacral e o centro com os órgãos digestivos. **B)** Esquema mostrando as regiões especializadas do corpo de uma estrela-do-mar (retirado de BIODIDAC).

Nos equinodermos que usam esta estratégia, dois tipos de pré-tratamento digestivo podem ser observados: (A) a liquefação química é realizada inteiramente dentro do corpo da presa, o que na verdade transforma este organismo em uma extensão do intestino do predador; ou (B) a desmontagem mecânica de presas e digestão química dos componentes ricos em nutrientes é efetuada dentro de uma região fora da boca do predador, mas dentro da esfera de seu aparelho bucal (Cohen 1995).

O primeiro tipo ocorre em estrelas-do-mar que se alimentam de moluscos. Nestas, a estrela exercer pressão com os pés ambulacrais sobre a concha do bivalve para abri-las. O estômago pilórico, que se localiza próximo à boca (**Fig. 2**) e é evertido e retraído com auxílio de músculos, se insere entre as valvas. A abertura aumenta à medida que a digestão acontece e a concha do molusco serve como recipiente para a ação das enzimas digestivas antes dos nutrientes serem absorvidos pelas células do estômago (Christensen 1957). Já no segundo tipo, os asteróides se alimentam sobre a superfície de animais incrustantes ou em depósitos de matéria orgânica sobre o substrato. Nestes casos, o corpo da estrela age como um invólucro de modo a criar uma cavidade e otimizar o contato entre o estômago evertido e o alimento. Além desta acentuação do contato, glândulas especiais podem produzir muco para auxiliar a apreensão e ingestão das partículas alimentares.

Algumas espécies que se utilizam deste mecanismo, como os gêneros *Acanthaster*, *Cushita* e *Asterina*, se alimentam apenas de material particulado pequeno, microorganismos e detritos orgânicos. Entretanto, várias outras são carnívoras e consomem presas significativamente maiores, mas sedentárias, como crustáceos (cracas), gastrópodes, bivalves e esponjas. Usando estes processos, as estrelas podem ser teoricamente capazes de deixar para trás partes pouco digeríveis ou mais inertes como conchas e peças de esqueleto (Dayton et al. 1974, Wulff 1995).

Figura 2: Organização do sistema digestório de Asteroidea (retirado de BIODIDAC).

1.3 Espongivoria

Diversos estudos têm observado a espongivoria dentre equinodermos, especialmente em ouriços e estrelas-do-mar (Vasserot 1961, Ferguson 1969, Guerrazzi et al. 1998). Em ouriços, grupo em que o processo de espongivoria tem sido mais estudado, espículas de esponja foram encontradas dentro do corpo do animal (Birenheide et al. 1993). Estas se encontravam inseridas na parede do canal alimentar principalmente na parte oral e possivelmente penetraram no corpo do animal através das placas entre os espinhos. Sua presença dá origem a uma resposta de proteção, na qual estruturas conhecidas como *corpos marrons* são formadas e as envolvem. Entretanto, estes equinóides aparentemente não desenvolveram qualquer sistema especializado para sua remoção, sendo possível que estas fiquem armazenadas permanentemente dentro de seu corpo (Birenheide et al. 1993).

Na classe Asteroidea, a espongivoria foi observada em organismos encontrados com o estômago parcialmente evertido sobre esponjas, sendo visíveis danos teciduais no local de contato (Ferguson 1969). No entanto, não está claro se há algum mecanismo seletivo que permita a estrela ingerir apenas a fração nutritiva, excluindo elementos esqueléticos que frequentemente são muito pequenos, da ordem

de algumas dezenas de micra. E, se estes são ingeridos, quais seriam os meios utilizados para dispor desses componentes em seu trato digestivo e na excreção. Desta forma, é ainda necessário conhecer detalhes do processo digestivo do predador em relação à sua presa, de modo a entender e avaliar o papel do esqueleto na defesa efetiva das esponjas.

Espécies da família Echinasteridae são descritas como espongiívoras, embora possam incluir outros alimentos em sua dieta (Sloan 1980, Menge 1982). Um estudo com *Echinaster echinophorus* mostrou que cerca de um terço dos exemplares observados em campo foram encontrados em postura de alimentação, com o estômago evertido sobre esponjas, e que estas eram afetadas com perda de pinacoderme (Ferguson 1969).

Independente da eversão do estômago, o processo digestivo deve envolver o contato entre o material alimentar e o epitélio do estômago para que ocorra a digestão química e a absorção dos nutrientes. As enzimas digestivas são praticamente universais entre os animais, e incluem proteases, lipases, carboidrases e nucleases. No entanto, suas quantidades relativas e participação ao longo do trato digestório são diferentes nos diversos grupos, e podem refletir o hábito alimentar e a capacidade de assimilação de um organismo. Proteinases tendem a ser dominantes em carnívoros, carboidrases entre herbívoros, e uma série de enzimas digestivas entre os onívoros (Prosser & Brown 1962).

Em estrelas, a secreção extracorporal de enzimas pelo estômago durante a eversão tem sido sugerida para algumas espécies (Jangoux 1982, Goreau 1964). Entretanto, este órgão parece não possuir grandes quantidades de enzimas digestivas, sendo estas produzidas principalmente nos cecos pilóricos que se localizam ao longo dos braços (Kettle & Lucas 1987). Além da função de produção enzimática, os cecos pilóricos também seriam os órgãos responsáveis pela absorção e armazenamento (Anderson 1953).

Desta forma, é importante o conhecimento específico acerca de suas características e atuação nos diferentes locais do sistema digestório para se entender melhor o processo e exigências nutricionais. Assim, a partir do perfil enzimático é possível conhecer mais sobre a habilidade do animal em usar diferentes tipos alimentares e também nutrientes. São poucos os estudos em estrelas-do-mar, mas sabe-se que *Oreaster reticulatus* é capaz de hidrolisar oligossacarídeos e polissacarídeos de plantas (sacarose, trealose, amilase, laminarina), mas tem pouca capacidade para digerir os componentes da parede celular (celulose, alginina, ágar) (Sheibling 1980).

A digestibilidade dos tecidos das esponjas é baixa, mesmo para outros organismos especificamente identificados como esponjívoro. Tartarugas de pente (*Eretmochelys imbricata*) apresentam apenas cerca de 45% de eficiência na absorção de material orgânico proveniente de sua dieta de esponjas (Bjornal 1990). Desta forma, fibras de esponjina podem ser pouco digeríveis para alguns predadores menos especializados. Se a fração de material não aproveitável (esponjina mais as espículas) é muito alta, os predadores podem não ingerir completamente o tecido das esponjas (Chanas & Pawlik 1995). Entretanto, não há estudos específicos sobre as enzimas de asteróides esponjívoro e em que grau o tecido das esponjas pode ser aproveitado por estes organismos.

Os mecanismos de assimilação de nutrientes em equinodermos também são pouco estudados, e parecem ser realizados por simples difusão através do epitélio ou a absorção por células do líquido celomático. O grupo apresenta cavidades periviscerais bem desenvolvidas, revestidas por um epitélio celômico e preenchidas por fluido onde são encontrados os celomócitos (Endean 1996). Estes são células livres e circulantes, que ocorrem não apenas nas cavidades celômicas, mas também no tecido conjuntivo de vários invertebrados. Seu número varia substancialmente não apenas entre as espécies, mas também entre indivíduos de acordo com seu tamanho

e condições fisiológicas (Smith 1981, Laughlin 1989, Chia & Xing 1996). Acredita-se que participem de funções diversas, como transporte e armazenamento de nutrientes, excreção, produção de componentes do tecido conjuntivo e defesa imune (Isaeva & Korenbaum 1990, Eliseikina 2001, Borges et al. 2005). De uma maneira geral, são classificados de acordo com seu tamanho, forma e conteúdo citoplasmático (Eliseikina & Margalanov 2002). Entre os asteróides são descritos três principais tipos de celomócitos, com os fagócitos (também chamados de amebócitos) sendo as células mais abundantes (Holm et al. 2008). Tal característica levou muitos autores a acreditar que estas células têm papel significativo na coleta do material do estômago e seu transporte para o resto do corpo do animal (e.g. Farmanfarmanian & Phillips 1962, Boolotian 1966, Pequignat 1966). Entretanto, as definições e nomenclatura dos celomócitos de equinodermos ainda não são bem estabelecidas, e o conhecimento sobre suas funções ainda é baseado num reduzido número de evidências.

Uma das poucas espécies de estrelas-do-mar brasileiras onde eventos de espongivoria já foram acompanhados em maior detalhe é *Echinaster brasiliensis*. Observações em campo mostram que esta espécie alimenta-se preferencialmente de esponjas, sendo *Mycale americana* consumida em 40% dos eventos, seguida por *Polymastia janeirensis* (10,8%), *Mycale magnirhaphidifera* (7%), *Amphimedon viridis* (5,6%), *Dragmacidon reticulatum* (4,8%) e *Mycale microsigmatosa* (3,4%) (Hajdu et al. 2000). No entanto, a estrela é relativamente pouco estudada, especialmente no que diz respeito ao detalhamento do seu hábito espongívoro e as possíveis adaptações e mecanismos que permitem este consumo.

Neste contexto, foram verificados neste trabalho as preferências, a forma de aquisição e a digestão do alimento em *E. brasiliensis*, de modo a investigar a fisiologia do consumo e da digestão de esponjas.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Geral

Detalhar aspectos da fisiologia e comportamento alimentar na relação esponjas-equinodermos, usando a estrela-do-mar *Echinaster brasiliensis* como modelo.

2.2 Específicos

- Descrever o comportamento alimentar e os mecanismos utilizados para a ingestão das principais espécies de presas;
- Analisar a composição orgânica das principais espécies de presas;
- Observar o tempo de digestão, os efeitos do tratamento digestivo e o tempo e modo de excreção das defesas físicas de esponjas;
- Verificar os possíveis efeitos das defesas físicas (viz. espículas e fibras) sobre o trato digestivo de *E. brasiliensis*;
- Verificar a participação dos celomócitos no processo digestivo.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo de estudo

Echinaster brasiliensis Muller & Troschel 1842 (Echinodermata: Asteroidea) tem uma distribuição ampla, abrangendo desde o Espírito Santo até o Golfo de São Matias, Argentina. É uma espécie comum em substratos consolidados no litoral brasileiro, sendo um componente importante das comunidades bentônicas (**Fig. 3**). Pode ser encontrada frequentemente em profundidades médias de 2 a 10 m e seus indivíduos atingem até 25 cm de diâmetro, com uma simetria radial bem marcada. É caracterizada por possuir entre 9 a 13 fileiras longitudinais de espinhos pequenos e numerosos, sustentados por placas planas. As placas adambulacrais possuem geralmente dois espinhos externos. A forma mais comum da espécie possui braços estreitos e alongados, mas são encontrados espécimes com braços curtos e grossos e com espinhos menos numerosos.

Figura 3: *Echinaster brasiliensis*. **A)** Vista dorsal. **B)** Vista ventral com abertura oral.

3.2 Observação em campo, coleta e manutenção dos animais

Observações do comportamento alimentar em campo foram realizadas em um total de 100 indivíduos, em mergulhos livres no canal de São Sebastião, nas proximidades do CEBIMar-USP (São Paulo). O comportamento alimentar foi confirmado removendo-se cuidadosamente cada indivíduo do substrato para verificação da eversão do estômago (a esponja predada foi identificada? O que especificamente foi observado? Você comparou horário ou o q? Qual o teste aplicado para a comparação das proporções – isso pode ser melhor explicado). Para a condução dos ensaios em laboratório, os animais foram coletados manualmente e transportados até o Departamento de Fisiologia Geral (IB-USP) em caixas resfriadas (18-20° C) e mantidos em aquários com filtro biológico até os experimentos.

3.3 Experimentos de alimentação

Os experimentos de predação foram conduzidos em laboratório e as Demospongiae *Dragmacidon reticulatum* (Halichondrida: Axinellidae), *Haliclona melana* (Haplosclerida: Chalinidae), *Mycale angulosa* (Poecilosclerida: Mycalidae) e

Tedania ignis (Poecilosclerida: Tedaniidae) (**Fig. 4**) foram disponibilizadas a diferentes indivíduos de *E. brasiliensis*. Com exceção de *D. reticulatum*, estas espécies já foram descritas como naturalmente consumidas por *E. brasiliensis* (Hajdu et al. 2000), e foram selecionadas devido a sua considerável abundância no local de amostragem. Os tipos de espículas presentes em cada uma das espécies estão ilustrados na **figura 5** (Muricy & Hajdu 2006). Outras esponjas como as espécies *M. microsigmatosa* e *A. viridis* também são descritas como itens alimentares na dieta de *E. brasiliensis*. Entretanto não se mantém em laboratório e por isso não foram utilizadas nos experimentos.

Uma vez que estrelas bem alimentadas demonstram reduzido interesse por possíveis presas (Rochette et al. 1994), os indivíduos a serem testados foram mantidos sem alimentação durante sete dias antes dos experimentos, para incrementar a resposta alimentar sem alterações comportamentais adicionais (Gaymer et al. 2001). Antes do início do teste, pedaços de esponjas de aproximadamente 2 cm² tiveram seus volumes quantificados por deslocamento de coluna d'água em uma proveta de 100 mL. Estes fragmentos eram então oferecidos às estrelas em aquários de 100 L. Após um consumo de 8h, o volume das esponjas era novamente medido para obtenção da quantidade de material consumido (D) pela diferença entre os volumes iniciais e finais.

Figura 4: Espécies de esponjas utilizadas nos experimentos – mas você disse no texto que *A. viridis* e *M. microsigmatosa* não foram utilizadas por não se manterem bem em lab – cuidado com a Legenda!. **A)** *Amphimedon viridis*, **B)** *Haliclona melana*, **C)** *Mycale angulosa*, **D)** *Mycale microsigmatosa*, **E)** *Tedania ignis*, **F)** *Dragmacidon reticulatum* (Fotos: Porifera Brasil).

Figura 5: Espículas das esponjas utilizadas: *A. viridis*, **A)** Óxeas; *H. melana*, **A)** Óxeas, **B)** Toxas. *M. angulosa*, **A)** Subtilóstilo, **B-C)** Sigmas I e II, **D-E)** Anisoquelas I e II; **F)** Isoquela, **G)** Toxa, **H)** Ráfides; *M. microsigmatosa*, **A)** Subtilóstilo, **B)** Sigma, **C)** Anisoquela; *T. ignis*, **A)** Estilo, **B)** Tiloto, **C-D)** Oniquetas I e II. *D. reticulatum*, **A)** Óxea, **B)** Estilo (Hajdu et al. 2011). Todos os tamanhos foram ajustados para a mesma escala.

3.4 Razão de matéria orgânica e inorgânica

Para estimar a razão entre a quantidade de matéria orgânica e inorgânica das esponjas consumidas, cada uma das espécies teve seu peso úmido, seco e das cinzas determinado. Para isso, trinta amostras de 2 cm³ de cada espécie foram pesadas, submetidas a secagem (24h a 70° C) e novamente pesadas (**Fig. 6**). Em seguida, este material foi queimado em forno mufla a 500° C por três horas, e o peso das cinzas remanescentes foi verificado. A massa de matéria orgânica foi determinada por meio da diferença entre o peso da amostra de esponja queimada e peso seco.

Figura 6. Pesagem de esponja *M. angulosa* para determinação de quantidade de matéria orgânica e inorgânica.

3.5 Composição orgânica das esponjas utilizadas como alimento

Extração dos lipídios totais

Amostras das espécies de esponjas foram congeladas e os lipídios totais foram extraídos de acordo com o método de Folch et al. (1957). Para isso, 150 mg de tecido úmido foram pesados em balança de precisão (AY220, Shimadzu), mergulhados em uma solução contendo clorofórmio, metanol e água em uma proporção de 2:1:0,5 e passados por um homogeneizador mecânico tipo Potter-Elvehjem a 1000 RPM durante 1 minuto. O homogeneizado foi então centrifugado a 170 x g por 5 minutos e a fase líquida inferior, contendo os lipídios, foi retirada através da técnica dupla pipeta. Esta técnica consiste em colocar uma pipeta Pasteur longa dentro de outra pipeta curta. A pipeta maior (230 mm) é colocada até o fundo e a camada inferior (orgânica) é retirada e transferida da outra pipeta menor (150 mm). O procedimento foi repetido mais duas vezes adicionando-se 50 mL de clorofórmio para remoção dos lipídios remanescentes. Posteriormente, o solvente foi evaporado utilizando-se nitrogênio e o extrato lipídico foi armazenado em freezer a -20° C para as análises posteriores.

Quantificação dos lipídios totais

A concentração dos lipídios totais plasmáticos e teciduais foi analisada pelo método colorimétrico de Frings et al. (1972), utilizando-se como padrão o óleo de fígado de bacalhau (*Cod liver oil fatty acid methyl esters*, SIGMA). A solução padrão e as amostras de esponjas foram ressuspensas em 50 mL de clorofórmio e uma alíquota foi pipetada em tubos de ensaio. Após evaporação do solvente em estufa, 200 µL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados ao extrato lipídico e os tubos mantidos em banho-maria por 10 minutos. Após o resfriamento, os tubos foram mantidos por mais 15 minutos a 35° C e adicionou-se 5 mL de sulfosfovanilina (35 mL de Vanilina, 5 mL de água MilliQ, 60 mL de ácido fosfórico). Posteriormente, a absorbância das amostras foi determinada em um leitor de ELISA (Spectramax 250,

Molecular Devices) em um comprimento de onda de 540 nm. A concentração de lipídios totais foi calculada utilizando-se a curva padrão de óleo de fígado de bacalhau e os resultados foram expressos em mg/g.

Extração das proteínas totais

As amostras das espécies de esponjas foram congeladas e as proteínas totais extraídas após precipitação e solubilização segundo Milligan & Girard (1993). As amostras foram pesadas em balança de precisão (AY220, Shimadzu), ressuspensas em cinco volumes (o que isso quer dizer? 5 volumes – a quanto equivale um volume? Deixe claro em algum lugar.) de uma solução de ácido perclórico 6% (PCA) e passadas em um homogeneizador mecânico tipo Potter-Elvehjem a 1000 RPM durante 1 minuto. Após a homogeneização e centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em 4 volumes de PCA novo, sendo este procedimento repetido por quatro vezes. Em seguida, foram adicionados 14 volumes de solução de KOH 2,5% e o precipitado foi mantido por 24 horas em agitação constante em temperatura ambiente. Este precipitado foi utilizado para obter as concentrações de proteínas totais.

Quantificação das proteínas totais

A concentração de proteínas totais dos tecidos foi analisada pelo método colorimétrico de Lowry et al. (1951). O precipitado obtido nas extrações foi diluído 50 vezes com água destilada para a dosagem e 100 µL pipetados em tubos Eppendorf. Um mililitro de reagente de Lowry foi então adicionado e a mistura incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 100 µL de Folin-Ciocalteu foram adicionados aos tubos, que foram deixados por mais 30 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então passadas para placas de 96 poços e sua absorbância medida em um leitor de ELISA (Spectramax 250, Molecular Devices). A

concentração de proteínas totais foi calculada utilizando-se uma curva de albumina sérica bovina e os resultados foram expressos em mg/g.

3.6 Tempo de digestão

A fim de verificar o tempo de digestão foram utilizadas as espécies de esponja mais consumidas por *E. brasiliensis* em laboratório (*H. melana* e *M. angulosa*) e para efeito de comparação, a espécie menos consumida *D. reticulatum* e um alimento sem componentes inorgânicos ou itens de difícil digestão, *Loligo brasiliensis* (lula comum). Após cada experimento de consumo de presa (**item 3.3**), as estrelas foram lavadas em água do mar filtrada para remover possíveis restos aderidos à superfície. A seguir foram colocadas individualmente dentro de um funil com fundo fechado por um tubo de centrifuga (15 mL) e preenchido com água do mar filtrada, mergulhado parcialmente dentro de um aquário de 50 L para reduzir variações de temperatura (**Fig. 7**). A cada seis horas, o material fecal produzido pelas estrelas no aparato era coletado por sucção e separado para análise das excretas. Para determinar o tempo máximo necessário até a liberação completa do material digerido, os organismos foram acompanhados até não ser mais observada a deposição de material particulado no fundo do tubo. A relação entre o volume consumido e tempo de digestão foi testada por meio de uma regressão linear.

Figura 7: Aparato para análise do tempo de digestão e coleta do material fecal. **A)** Espécime de *E. brasiliensis* em funil dentro de aquário com fundo fechado e preenchido com água do mar. **B)** Desenho esquemático do aparato de coleta do material fecal.

3.7 Excreção e análise de componentes esqueléticos

O material fecal coletado no aparato usado para aferir o tempo de digestão foi decantado em um funil de separação por 24h a 4^o C e recolhido. A biomassa ingerida foi estimada em gramas de peso úmido, a partir da diferença entre a quantidade de esponja fornecida inicialmente e o resto não consumido, e convertida em peso seco utilizando o teor de matéria orgânica determinado para cada esponja. A taxa de defecação foi calculada como:

$$\text{Taxa de defecação (\%)} = \frac{\text{Quantidade de material fecal (g)}}{\text{Quantidade de biomassa ingerida (g)}} \times 100$$

A eficiência de absorção também foi calculada, com base em Mamelona & Peltier (2005), como:

$$\text{Eficiência de absorção (\%)} = 100 - \text{Taxa de defecação (\%)}$$

As espículas e componentes de espongina presentes no material foram caracterizados e comparados ao observado em esponjas coletadas em campo, através da análise em microscopia ótica e eletrônica de varredura. Para microscopia ótica, preparações semi-permanentes foram feitas colocando o material diretamente sobre as lâminas, que então recebiam algumas gotas de álcool 70% e eram recobertas por lamínulas. As amostras selecionadas (n=5 por lâmina) foram analisadas e as espículas danificadas e/ou unidas a material orgânico foram quantificadas e comparadas entre espécies e em relação ao controle (esponjas obtidas em campo) por meio de ANOVA. Talvez aqui pudesse ficar mais claro o que foi testado pela anova – você testou o efeito da espécie consumida em relação ao número de espículas excretadas após a alimentação, certo? Só não entendo como foi que o controle (espécies obtidas em campo) entrou na análise – você quantificou o número de espículas que sobraram após a alimentação (ou o indivíduo comeu tudo o que você ofereceu?) e somou ao que foi excretado? E esse valor você comparou ao número de espículas observadas em um quadrado de mesmo tamanho ao que foi oferecido? Foi isso? Deixe isso bem claro na apresentação.

Para microscopia eletrônica de varredura, espículas do material fecal e os estômagos cardíaco e pilórico foram fixados em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio (1h a 40° C). Na seqüência foram rinsadas com o mesmo tampão, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por uma hora. Feito isto, as amostras foram submetidas a um novo banho no tampão, seguido de desidratação em série com etanol (Keogh & Keegan, 2006). As amostras processadas foram então fixadas nos suportes para microscopia (*stubs*) com fita dupla face e então submetidas ao ponto

crítico e metalização com ouro, sendo examinadas em microscópio eletrônico de varredura TSM 940 (ZEISS).

3.8 Efeitos sobre o trato digestivo de *Echinaster brasiliensis*

Para estes experimentos foi utilizada apenas a esponja *H. melana*. Esta espécie foi selecionada por ter sido uma das mais consumidas por *E. brasiliensis* e ser a única a se manter saudável nos aquários, permitindo os ensaios com tecidos vivos. Fragmentos da esponja foram oferecidos a cinco espécimes de *E. brasiliensis* e após o período de alimentação, as estrelas foram anestesiadas com cloreto de magnésio diluído em água do mar (1:1 - água do mar e MgCl_2 7,5%) e dissecadas. Para o processamento dos tecidos, os estômagos cardíaco e pilórico não foram separados, e foram analisados juntos.

Para a observação de espículas no trato digestivo os estômagos foram colocados em tubos contendo ácido nítrico concentrado, sendo estes aquecidos com bico de Bunsen até a fervura. Após a digestão total dos tecidos, os tubos foram centrifugados e as espículas ressuspendidas e lavadas três vezes por centrifugação em água destilada. Após esta etapa, os resíduos foram gotejados em lâminas semi-permanentes e analisados em microscópio.

Para determinar possíveis danos ou alterações nos tecidos, os estômagos foram processados para histologia como escrito a seguir.

3.9 Processamento histológico

As amostras de tecido foram fixadas por 24h em glutaraldeído 2,5% diluído em água do mar filtrada (0,22 μm) e posteriormente descalcificadas com EDTA 5% diluído em água do mar artificial livre de cálcio e magnésio (NaCl 460mM, Na_2SO_4 7mM, KCl 10mM, HEPES 10mM, pH 8,2 - Dunham & Weissmann 1986. Filtrada em 0,22 μm). Feito isso, os tecidos foram desidratados na seguinte série de etanol, diluído em água

destilada: 50% (30 min.), 70% (30 min.), 90% (30 min.) e 100% (30 min.). Posteriormente as amostras foram clarificadas com Xilol e Etanol (1:1 - 30 min.) e Xilol 100% (30 min., duas vezes). Em seguida foram imersas para inclusão em Paraplast (SIGMA) fundido, por 12 horas em estufa a 60°C. Após a inclusão, as amostras foram emblocadas, endurecidas à temperatura ambiente e montadas nos suportes. Os cortes foram realizados em micrótomo manual, com espessura de 15 a 20 µm. As fitas com os cortes foram colocadas em lâminas preparadas com uma fina camada de albumina e desparafinizadas com Xilol 100% (40 min., duas vezes). Após esta etapa se deu a hidratação em uma série gradativa de etanol, diluído em água destilada: 100% (30 min.), 90% (30 min.), 70% (30 min.) e 50% (30 min.), com o material sendo a seguir corado com Tricromo de Mallory ou Azul de Toluidina 0,1% (Martoja & Martoja 1967, Behmer et al. 1976).

3.10 Ensaios enzimáticos

Para obtenção dos tecidos para as análises enzimáticas, os estômagos cardíaco e pilórico e os cecos pilóricos foram dissecados e armazenados em um freezer -80° C até o processamento. Os tecidos foram amostrados na quantidade de 200 µg de tecido para 2 mL de tampão de homogeneização 0,2M Tris-HCL/0,01M fosfato. A extração foi feita sob gelo com auxílio de um pistilo e homogeneizador mecânico tipo Potter-Elvehjem a 1000 rpm/minuto durante 1 minuto. O extrato foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para os ensaios de atividade.

As proteases inespecíficas foram analisadas em um ensaio usando azocaseína como substrato (Ross et al. 2000). As amostras foram incubadas em 2,5 volumes de 5,0 mg/mL de azocaseína dissolvida em 100 mM de bicarbonato de amônio (pH 7,8). Após 60 minutos de incubação a 25° C, a reação foi interrompida adicionando 0,3 volumes de TCA 20% (ácido tricloroacético). Essa mistura foi mantida em gelo por cerca de 30 minutos e o precipitado retirado após centrifugação por 10 minutos a

17.000 x g. O sobrenadante foi então colocado em microplacas de 96 poços e a leitura da absorbância feita a 450 nm em um leitor de ELISA (Spectramax 250, Molecular Devices)

A tripsina foi analisada pelo método de Gawlicka et al. (2000), usando BAPNA (N-a-benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida) como substrato. Para os ensaios, 4,4 mg de BAPNA foram diluídos em 50 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) e então adicionados a 5 mL de um tampão bicarbonato de amônio 100 mM (pH 7,8) para obter uma solução de 2 mM de BAPNA. As amostras de tecido (25 µL) foram incubadas 50 µL de 2 mM de BAPNA e 25 µL de tampão por 60 minutos a temperatura de 25° C. Após este tempo, a reação foi interrompida com 500 µL de TCA (ácido tricloroacético) a 15% e lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. Os valores de absorbância foram registrados após 60 segundos de reação, com repetições durante 30 minutos

A atividade de lipases não-específicas foi determinada segundo metodologia adaptada de Albro et al. (1985). Os extratos (25 µL) foram incubados em meio contendo 0,4 mM p-nitrofenil miristato em uma solução tampão de bicarbonato de amônio 24 mM (pH 7,8) e 0,5% Triton X-100. Após 30 minutos, a reação era interrompida pela adição de NaOH 25 mM e a densidade ótica registrada no leitor de ELISA a 405 nm.

A atividade amilohidrolítica foi estimada segundo método proposto por Bernfeld (1955) com modificações. Na mistura de reação contendo 1,0 mL de solução de amido 5% em tampão citrato/fosfato 0,2M (pH 7,0) e 0,5mL de solução de NaCl 0,5% era adicionados 25 µL de homogeneizado de tecido. A reação era incubada a 25° C por 30 minutos e interrompida com 1,0 mL de uma solução 5% de Sulfato de Zinco e Hidróxido de Bário ($\text{ZnSO}_4:\text{Ba}(\text{OH})_2$) 0,3 N. Posteriormente, a mistura de reação era centrifugada a 12.000 x g por 3 minutos, sobrenadante passado para microplacas e a concentração de glicose livre determinada em 690 nm no leitor de ELISA.

3.11 Observação dos celomócitos de *E. brasiliensis*.

Para verificar as alterações na quantidade de celomócitos causadas por diferentes dietas, foi utilizada a mesma metodologia básica descrita no item 3.3. Porém, neste caso, foram oferecidos separadamente apenas fragmentos de *H. melana* e *D. reticulatum*, respectivamente as espécies mais e menos consumidas. Como controle para as espécies de presa oferecidas, foram usados fragmentos de lula (*Loligo brasiliensis*). Após cada episódio de alimentação, padronizados em 4h para todos os tipos de alimento, foram coletadas as células do líquido celomático de dez indivíduos. Para isto, as estrelas foram anestesiadas com Cloreto de Magnésio 7,5% conforme descrito no item 3.8 e uma pequena incisão foi feita com auxílio de um bisturi em um dos braços do animal. O fluido foi colhido com uma seringa e misturado na proporção de 1:1 em uma solução anticoagulante (0,02 M EDTA, 0,34 M NaCl, 0,019 M KCl, 0,068 M Tris-HCl, pH 8,2 - Xing & Chia 2000). A densidade da suspensão foi então verificada em uma câmara de Neubauer e plotada em número de células por mL.

4.0 RESULTADOS

4.1 Comportamento alimentar: espécies predadas e taxas de consumo

Dos indivíduos de *E. brasiliensis* observados no campo, 81 apresentavam comportamento de forrageamento (**Fig. 8**). A maioria foi encontrada sobre esponjas, sendo *Mycale microsigmatosa* a espécie mais consumida (27,5% dos indivíduos forrageando), seguida por *Haliclona melana* (26,25%), *Mycale angulosa* (15%), *Tedania ignis* (11,25%) e *Amphimedon viridis* (8,75%). Entretanto, a estrela não restringiu o seu consumo apenas às esponjas, estando 11,25% dos indivíduos observados ingerindo material particulado diretamente sobre o substrato.

Todas as espécies de esponja oferecidas para *E. brasiliensis* em laboratório foram consumidas, embora em taxas bastante diferentes. O maior percentual consumido por episódio foi observado para *H. melana* (97,7%, $q > 5,13$, $p < 0,01$). *Mycale angulosa* e *T. ignis* apresentaram valores intermediários e semelhantes de ingestão (68,2% e 66,7%, $q = 0,76$, $p > 0,05$), enquanto *D. reticulatum* apresentou a menor quantidade de material ingerido (7,5%, $q > 5,03$, $p < 0,01$) junto a espécie *M. microsigmatosa* (6,9%, $q > 4,70$, $p < 0,01$).

A ingestão das esponjas oferecidas no aquário (*H. melana*, *T. ignis*, *D. reticulatum* e *M. angulosa*) sempre se deu pela eversão do estômago. As observações do comportamento mostraram que logo após a introdução dos fragmentos no sistema, a estrela se dirigia ativamente em sua direção. Após o contato inicial entre seus pés ambulacrais e a presa, a estrela assume uma posição recurvada (**Fig. 9A-B**), colocando a região da boca sobre a esponja (**Fig. 9C**). Nesta posição, o estômago é então evertido (**Fig. 9D**) e em média após 62 minutos (DP = 27,1) 1,3 mL de presa é ingerido (DP = 0,55).

Figura 8: Porcentagem de consumo das esponjas mais utilizadas por *E. brasiliensis* em campo. As letras A e B indicam diferença significativamente menor que 0,05 no teste *a posteriori*.

Após o período de alimentação, todas as esponjas predadas apresentavam sinais de danos no tecido, mas não foram totalmente ingeridas. Na maioria dos casos este dano é superficial, acarretando perda da pinacoderme, mudança de coloração (**Fig. 10A, B**) e ausência de espículas no local (**Fig. 10C, D**). Nos casos onde o consumo é maior (*viz. H. melana*), o dano pode estender-se até a porções mais internas, atingindo também o coanossoma (**Fig. 10D**). Nestes casos, a matriz extracelular é mais afetada, enquanto que a espongina envolvendo os feixes fica mais preservada.

Figura 9: Comportamento alimentar de *Echinaster brasiliensis* em laboratório. **A)** Estrela predando a esponja *H. melana* sobre uma pedra no fundo do aquário. **B)** Pés ambulacrais de *E. brasiliensis* detectando um fragmento da esponja *H. melana*, visto através do vidro do aquário. **C)** *Echinaster brasiliensis* usando os pés ambulacrais para conduzir o fragmento da esponja para a região oral, fotografada na superfície da água (o vidro está na parte inferior da imagem). **D)** Eversão do estômago sobre fragmento da esponja *H. melana*, observada através do vidro do aquário (*Esp*: Esponja; *Est*: estômago).

Figura 10: Danos teciduais em esponjas causados pela predação de *E. brasiliensis*. **A)** Esponja *M. angulosa* com seta indicando área lesionada, marcada pela descoloração do tecido. **B)** Lesão em *H. melana*, também com a superfície descolorada. **C)** Detalhe da lesão superficial em *H. melana*. **D)** Corte semi-fino de *H. melana* mostrando área interna da esponja após a alimentação de *E. brasiliensis*, sendo visíveis os danos mais internos (Les: lesão; Ct: controle - área intacta sem lesão).

4.2 Composição orgânica das principais espécies de presas

Os resultados das análises de lipídios e proteínas totais das diferentes esponjas estão apresentados na **figura 11**. Dentre as espécies testadas *H. melana* apresentou os menores valores de lipídios totais próximos à esponja *T. ignis*. Já as esponjas *D. reticulatum* e *M. angulosa* apresentaram quase o dobro da quantidade de lipídios verificada nas outras duas espécies testadas. Com relação à quantidade de

proteínas, *H. melana* apresentou quantidades maiores que todas as outras, sendo duas vezes superior ao apresentado pela espécie menos predada, *D. reticulatum*.

A quantidade de matéria orgânica e a relação entre conteúdo orgânico e inorgânico diferiu pouco entre as espécies testadas. Foi maior em *M. angulosa* (51% de matéria orgânica, relação de 0.411 entre orgânico e inorgânico, DP = 0,11), sendo seguida por *H. melana* (41% de matéria orgânica, relação de 0.331, DP = 0,14). As menores quantidades e proporções foram observadas para *T. ignis* (35% e 0.282, DP = 0,10) e *D. reticulatum* (32% e 0.191, DP = 0,06), respectivamente ($q > 4,17$, $p < 0,01$).

Figura 11: Quantidade de proteínas (A) e lipídios (B) em miligrama por grama de tecido das diferentes esponjas. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão.

Digestão e excreção

O perfil de passagem dos alimentos pelo trato digestivo, conforme verificado pela produção de material fecal, não apresentou variações significativas. A única diferença notável foi para *H. melana*, que atingiu o máximo de produção de matéria fecal mais rapidamente (6h) que os demais, que apresentaram as maiores médias entre 12 e 24 horas. Da mesma forma, o tempo total de digestão apresentou baixa variação para os tecidos das esponjas ($p < 0.05$ – isso é resultado da ANOVA? Se for onde está a tabela com os resultados do teste?). No entanto, *Loligo* apresentou um tempo total de digestão cerca de 4 horas menor do que as esponjas ($DP=0,6$), cujos vestígios foram observados até o máximo de 50h, para a digestão de *D. reticulatum* (**Fig.12**).

Foi observada uma relação entre o volume de alimento consumido e o tempo de digestão (**Fig. 13**), sendo que *H. melana* apresentou o menor tempo de digestão relativo ao mesmo volume consumido ($p < 0.05$ – isso é ANOVA – de novo é importante a apresentação da estatística além do p – F e GL se for a ANOVA e se for multifatorial – dados totais na tabela) e *D. reticulatum* o maior tempo (**Fig.14**). Embora constituída apenas por tecido mole, sem elementos inorgânicos ou fibras, *L. brasiliensis* mostrou um tempo de digestão próximo à *H. melana* (**Fig. 14A**), mas apresentou as maiores quantidades de consumo por *E. brasiliensis* ($p < 0.05$ – de novo, a que teste esse p diz respeito – se você apresenta a estatística, F , t , U , etc – dá pra ter uma ideia do teste q você fez) (**Fig. 14D**).

Os indivíduos de *E. brasiliensis* mostraram uma quantidade média diária de defecação de 22 mg ind./dia a partir do consumo das esponjas testadas. Já quando se alimentam de *L. brasiliensis* esta média é menor, de 16 mg ind./dia (tem réplica? Dá pra testar com anova? Se der faça o teste). A taxa de defecação não se altera quando as estrelas são alimentadas com diferentes espécies de esponja ($p=0,12$ para *H. melana*, $p=0,13$ para *M. angulosa* e $p=0,19$ para *D. reticulatum* – que teste você fez

aqui? Na metodologia todos os testes tem que estar descritos), mas é menor para *L. brasiliensis* ($p < 0,01$) (**Fig. 15**). Em média, 47% da biomassa de esponja ingerida foi liberada como material fecal, indicando que as estrelas absorvem cerca de 53% do material consumido. Já para *L. brasiliensis* a média de defecação foi a mais baixa (35,4%), acompanhada pela maior eficiência de absorção, com 64,6% do material ingerido sendo aproveitado.

Por meio de microscopia eletrônica de varredura, assim como no estômago, foram também encontradas espículas no conteúdo fecal, a maioria das quais, ainda intacta (**Fig. 16A, B e C**). A análise do material fecal em microscopia ótica também mostrou a presença de espículas livres, intactas e quebradas, mas não com envelopamento orgânico (**Fig. 16D**). Não foi observada espongina nodal em nenhuma das amostras. Da mesma forma, quando comparadas com material colhido diretamente de esponjas controle, as amostras do estômago e do material fecal de conteúdo fecal mostraram uma maior quantidade de espículas danificadas do que na presa viva, indicando que o processo digestivo pode alterar estes componentes (**Fig. 17, Tab. 1**).

Figura 12: Produção de matéria fecal e tempo de digestão de *E. Brasiliensis* para as diferentes espécies de presas testadas.

Figura 13: Volume consumido ao longo do tempo (volume/tempo $\times$ 100) por *E. brasiliensis*, considerando as espécies de esponjas (letras diferentes indicam diferença significativa menor que 0,05 no teste *a posteriori* de Fisher).

Tabela 1: Resultado da ANOVA comparando Volume consumido ao longo do tempo entre as as espécies de esponjas predadas.

Variação	Gl	QM	F	P
Intercepto	1	79,5	159,01	<0.001
Amostras	2	4,8	8,50	<0.001
Erro	25	0,6

Figura 14: Regressão linear mostrando a relação entre volume consumido e tempo de digestão para os diferentes tipos de alimento oferecidos a *E. brasiliensis*.

Figura 15: Porcentagem de defecação de *E. brasiliensis* para diferentes espécies de presa

Tabela 2: Resultado da ANOVA comparando a porcentagem de defecação entre as espécies de presa.

Varição	Gl	QM	F	P
Intercepto	1	74,3	122,12	<0.001
Amostras	3	5,4	7,92	<0.001
Erro	15	0,5

Figura 16: Espículas de *H. melana* (A, B e D) e *M. angulosa* (C) contidas no material fecal de *E. brasiliensis*. (A, B e C) Microscopia eletrônica de varredura mostrando espículas livres misturadas nas fezes. (D) Espículas livres encontradas no conteúdo fecal analisadas em microscopia ótica.

Figura 17: Quantidade média de espículas quebradas observadas em diversas amostras coletadas. As amostras correspondem às esponjas em campo, e ao conteúdo estomacal e fecal após alimentação.

Tabela 3: Resultado da ANOVA comparando a quantidade de espículas quebradas observadas em diversas amostras coletadas.

Variação	Gl	QM	F	P
Intercepto	1	83,3	163,04	<0.001
Amostras	2	4,4	8,67	<0.001
Erro	27	0,5		

4.3 Efeitos sobre o trato digestivo de *Echinaster brasiliensis*

A análise de cortes histológicos da parede dos estômagos de *E. brasiliensis* após a alimentação, mostraram a presença espículas inseridas no tecido (Fig. 18A, B) e junto ao alimento parcialmente digerido (Fig. 18C, D). Mesmo junto ao tecido de

esponja não digerido são encontradas poucas espículas, sem a organização reticulada normalmente encontrada no esqueleto da esponja.

Algumas espículas não se encontravam soltas na luz do trato digestivo, mas próximas e aparentemente inseridas no tecido de revestimento. No entanto, não foram detectadas lesões significativas na área, e os danos parecem ser restritos apenas ao local de inserção. (**Fig. 18D**). Outras espículas foram ainda encontradas conectadas com esponjina nodal (**Fig. 19A, B**), ou livres e intactas na sua maioria (**Fig. 19C, D**).

Figura 18: Cortes histológicos de estômago de *E. brasiliensis*. **A-B)** Espículas de *H. melana* inseridas no tecido. **C)** Espícula dentro do estômago de *E. brasiliensis* com restos de esponja não digerida. **D)** Óxea inserida no estômago de *E. brasiliensis*.

Figura 19: Espículas de *H. melana* encontradas no conteúdo estomacal de *E. brasiliensis*. **A-B)** Óxeas unidas por espongina nodal contidas no estômago pilórico da estrela. **C)** Óxea livre e intacta encontrada no estômago cardíaco. **D)** Espícula livre (óxea ou estilo) com as terminações quebradas encontrada no estômago cardíaco. (Jun: junção por espongina nodal).

4.4 Enzimas digestivas

Todas as enzimas testadas foram detectadas nos três tecidos analisados: estômagos cardíaco e pilórico e cecos (**Fig 20**). Comparando a atividade obtida nos ensaios específicos, os cecos mostraram valores significativamente maiores para amilase e proteases inespecíficas do que os estômagos cardíaco e pilórico. Por outro lado, a atividade da lipase e da tripsina foi bastante baixa nos três tecidos.

Figura 20: Valores de atividade enzimática específica em unidades por miligrama de proteína, nos diferentes órgãos de *E. brasiliensis*. * ** *** Símbolos diferentes significam valores estatisticamente diferentes.

4.5 Variações celulares devido à ingestão de componentes alimentares

O número total de celomócitos foi quantificado para verificar a ocorrência de alterações no número destas células em resposta ao tipo de presa consumida por *E. brasiliensis*. Foi observada uma variação no número de celomócitos entre indivíduos em jejum e após a alimentação (Fig. 21, Tab. 2). A média em organismos em jejum foi mais baixa que nos alimentados ($1,3 \pm 0,94$, média $\pm$ desvio padrão cels/mL). Os valores verificados nos indivíduos alimentados com *D. reticulatum* foram os mais baixos, $2,9 \pm 0,50$ sendo maiores na esponja *H. melana* com quantidades de células de $4,1 \pm 0,22$. Estes valores foram mais próximos aos de estrelas alimentadas com *L. brasiliensis*, que apresentaram o número médio de celomócitos mais alto após o período de alimentação, sendo de $5,3 \pm 1,49$.

Figura 21: Celomócitos de *E. brasiliensis* aderidos em placa de cultura.

Tabela 4: Resultado da ANOVA comparando o número de amebócitos observados no líquido celomático de *E. brasiliensis* de acordo com o tipo de alimento .

Varição	Gl	QM	F	P
Intercepto	1	2328	1874,5	<0.001
Tipo de alimento	3	12045,7	95,5	<0.001
Erro	36	126		

5.0 DISCUSSÃO

Existe certo consenso na literatura de que a baixa preferência na ingestão de esponjas seja determinada apenas por dois fatores: primariamente pelos compostos deterrentes produzidos por estes organismos, tendo os componentes do esqueleto um papel secundário (e.g. Wulff 1994, 1995, Pawlik et al. 1995, Chanas & Pawlik 1996). Como foi observado para *Echinaster spinulosus* (Vasserot 1961, Ferguson 1969), a espécie *Echinaster brasiliensis* também é encontrada frequentemente predando esponjas, mas o volume de alimento ingerido é sempre baixo em cada episódio. Os resultados deste trabalho mostram que *E. brasiliensis* se alimenta de esponjas que possuem deterrentes químicos e físicos, e ingere tanto o conteúdo orgânico quanto o inorgânico das presas.

5.1 Comportamento alimentar e taxas de consumo

A esponja mais utilizada como fonte de alimento, *H. melana*, não tem nenhum metabólito com atividade documentada, embora já tenha sido investigada neste sentido (RGS Berlinck, *com. pess.*). Mas tais compostos estão presentes nas outras três espécies consumidas (Schmitz et al. 1984, Kohmoto et al. 1988, Fusetani et al. 1991, West et al. 2000, Monks et al. 2002). Entretanto, foi verificado que outras características podem influenciar as escolhas do predador, que pode estar relacionada também ao tamanho das espículas, à quantidade de matéria orgânica, e mesmo à morfologia geral das esponjas (Wulff 1995, McClintock 1987, Cerrano et al. 2000, Waddel & Pawlik 2000b).

A simples presença das espículas pode dificultar a ingestão e diminuir a palatabilidade do material consumido (Randall & Hartman 1968, Wainwright et al. 1982). Espículas grandes (acima de 250 μm) já foram descritas como irritantes para o trato digestivo de peixes (Bergquist 1978, Burns & Ilan 2003). Entretanto, mesmo

conteúdos espiculares densos não necessariamente previnem a predação, como observado em diversas espécies antárticas (Dayton et al. 1974). As esponjas utilizadas neste trabalho possuem alguns dos seus componentes esqueléticos morfologicamente similares (espículas monoaxiais, com uma ou as duas pontas afiladas), mas que se distribuem em classes de tamanho diferentes. Desta forma, o consumo maior de *H. melana* pode estar também relacionado à presença de espículas menores, com tamanho máximo de 156 µm, enquanto que as das outras espécies podem atingir 271 µm para *T. ignis*, 340 µm em *M. angulosa* e 392 µm para *D. reticulatum* (Hajdu et al. 2011).

Um outro fator que parece influenciar nestas escolhas pode ser relacionado à morfologia geral. *Haliclona melana* e *T. ignis* têm superfícies mais lisas e homogêneas que as demais esponjas testadas (Muricy & Hajdu 2006). Embora *M. angulosa* tenha o maior valor nutricional, apresenta uma superfície bastante irregular e com várias projeções digitiformes (Wulff 1995, Muricy & Hajdu 2006). A presença de áreas irregulares na superfície pode dificultar a predação por eversão do estômago utilizado por *E. brasiliensis*. Além disso, *Haliclona melana* possui uma consistência mais macia e compressível, com maior quantidade de tecido mole do que as demais, o que pode também contribuir para seu maior consumo por *E. brasiliensis*. Isto é reforçado pelos resultados, mostrando que as esponjas menos predadas possuem maior número de espículas em seus tecidos.

O fato de que apenas pequenas quantidades são ingeridas, e não esponjas inteiras pode estar relacionado com o seqüestro de metabólitos para autodefesa ou impalatabilidade do predador (Bryan et al. 1997, Iorizzi et al. 1993). Este processo é descrito para outros animais espongiívoros e particularmente bem documentado em nudibrânquios (Cimino & Ghiselin 1999). Produtos naturais isolados de equinodermos também possuem propriedades anti-predação e são capazes de inibir o crescimento de outros organismos, tais como algas e briozoários (Bryan et al. 1997, McClintock et

al. 2006). Entretanto, não há registros de aquisição e seqüestro de compostos deterrentes a partir da dieta para o grupo, e mais estudos são necessários para determinar se isso ocorre em *E. brasiliensis*. Alternativamente, esta tendência de consumo reduzido de diversas espécies de esponjas pode ser uma estratégia para contornar os efeitos de compostos tóxicos destes organismos. Outras espécies de animais parecem também consumir uma variedade de itens, cuja variabilidade pode ser influenciada pela disponibilidade, tamanho das presas e outros fatores temporais e espaciais (Andrea et al. 2007), num comportamento conhecido por *smorgasbord*. Para espongívoros, esta seria uma estratégia em que o consumidor se alimenta de pequenas quantidades de muitas espécies para diminuir o risco de ingerir grandes quantidades de esponjas tóxicas ou de reduzido valor nutricional (Randall & Hartman 1968). A ingestão de pequenas quantidades de cada substância, de diferentes espécies de esponja e em episódios isolados, permitiria à estrela lidar com os compostos de maneira mais adequada (Wulff 1994). Outro aspecto importante relacionado à alimentação de diferentes espécies foi demonstrado através de atividades de peixes espongívoros, cujo impacto sobre quaisquer uma das populações de esponja foi negligenciável, não afetando a estrutura geral da comunidade (Wulff 1994).

Echinaster brasiliensis é caracterizada essencialmente como espongívora. No entanto, a ingestão de diferentes espécies e mesmo de outros organismos eventualmente disponíveis sugere que seja bem mais generalista no consumo do que atualmente é descrito. Com base em observações de campo e análise de conteúdo estomacal, alguns autores verificaram que outras espécies da família Echinasteridae podem se alimentar de vários tipos de alimento como material particulado, moluscos, algas e ascídias. (Ferguson 1969, Brun 1976, Sloan 1980). Embora a maior parte da dieta de *E. brasiliensis* pareça ser constituída por esponjas, a utilização de outros itens alimentares (artêmias e anêmonas) foi observada em laboratório. Em especial, na

predação de artêmias as estrelas mostraram um comportamento específico, estendendo os braços para capturar dos organismos nadando na coluna d'água. Este processo é pouco comum em asteróides, pois seus braços não são especializados para auxiliar diretamente na alimentação (Lawrence 1987). No entanto, mostram a presença de um mecanismo adicional que aumenta a variabilidade de presas e pode ser fundamental para a espécie em casos de baixa disponibilidade de alimento ou na busca de fontes nutricionais adequadas.

5.2 Composições orgânica das esponjas

Enquanto alimentos contendo metabólitos secundários e grande quantidade de espículas podem ser rejeitados, outros contendo as mesmas defesas, mas com alta qualidade energética, podem ser consumidos. A composição bioquímica e energética de esponjas pode fornecer informações importantes sobre seu valor como presas em potencial, assim como sobre os padrões de alocação de recursos no corpo (McClintock 1987). Em esponjas, não há homogeneidade na composição dos tecidos entre as diversas ordens ou gêneros e esta composição pode ainda mudar nas diferentes estações do ano e nos ciclos reprodutivos (Barthel 1988). Nossos resultados apontam que a quantidade de matéria orgânica das espécies testadas é baixa (aproximadamente 40%), mas similar ao encontrado em outras esponjas tropicais/sub-tropicais (Barthel 1995). Outro fator a considerar é a quantidade de esqueleto orgânico (espongina e fibras de colágeno), que contribui em grande parte na composição orgânica total das demospongas (Barthel 1995).

O consumo maior de *H. melana* e *M. angulosa* pode estar associado a este maior conteúdo orgânico. Resultados similares foram encontrados, mostrando a relação entre a qualidade nutricional de um alimento e a presença de elementos estruturais ou metabólitos secundários (Duffy & Paul 1992, Pennings et al. 1994). A avaliação calórica de *H. melana* mostrou a espécie possui maior valor energético e

maior quantidade de proteínas solúveis que outros itens alimentares de *E. brasiliensis*, incluindo a esponja *Mycale americana* (Guerrazzi 1999). Estudos com esponjas antárticas também mostraram que outra espécie do mesmo gênero, *Haliclona* cf. *gaussiana* possui maior teor de matéria orgânica (52,2%) que espécies do gênero *Tedania* (10,5 a 33,92%) e a espécie *Mycale acerata* (16,8%) (Barthel 1995). Para esponjas tropicais, apesar dos valores de matéria orgânica serem mais altos, as proporções entre os gêneros são mantidas (Barthel 1995).

Mais especificamente, a preferência por *H. melana* pode estar associada a sua maior quantidade protéica aproveitável. A maior parte da matéria orgânica das esponjas é constituída por lipídios e proteínas. No entanto, nas diferentes espécies, uma parte significativa dessas proteínas pode ser de natureza estrutural, insolúvel e pouco digerível (fibras de espongina). Desta forma, é possível que a principal fonte de proteína encontrada nas esponjas analisadas possa não estar disponível para alguns consumidores generalistas, pois exigiria longos períodos de digestão e enzimas específicas para isto. O esqueleto de espongina é difícil de digerir por ser muito condensado e com ligações cruzadas que unem uma cadeia polimérica com a outra. Também não há na literatura, enzimas digestivas específicas documentadas para este fim (Meylan 1988, Bjorndal 1990). As tartarugas-de-pente (*Eretmochelys*), por exemplo, não são capazes de digerir os esqueletos de algumas esponjas (Meylan 1988). Peixes espongiívoros do gênero *Pomacanthus* (peixe anjo) possuem tempos de retenção mais longos no intestino, o que pode permitir a digestão da espongina. Amostras dos conteúdos do intestino anterior de várias espécies de *Pomacanthus* possuíam fragmentos de espongina, enquanto que as do intestino posterior não (Chanas & Pawlik 1995). Esta situação pode ser análoga à encontrada entre os herbívoros terrestres, que digerem a celulose (com a ajuda de microorganismos), diminuindo a taxa de passagem de alimentos através do intestino. Por outro lado, peixes predatórios do gênero *Paracheilinus*, podem eliminar o conteúdo de seus

intestinos antes das fibras de espongina serem digeridas (Randall & Hartman 1968). O conteúdo estomacal e amostras do estômago pilórico de *E. brasiliensis* contém fragmentos de espongina, mas estes não foram encontrados nas fezes, indicando sua digestão.

As alterações morfológicas observadas nas esponjas após os episódios de alimentação foram causadas principalmente pelo muco digestivo de *E. brasiliensis*. Danos locais já foram registrados em espécies de *Isodyctia* predadas pela estrela *Henricia sanguinolenta* (Brun 1976, Vasserot 1961, Shield & Witman 1993). Nestes eventos, as esponjas mostraram áreas despigmentadas e tiveram grandes perdas de tecidos, levando a morte do organismo dependendo da área afetada. No caso de *E. brasiliensis*, depois da predação ocorre uma retração visível do tecido, mas as esponjas permaneceram vivas, dado a pequena quantidade de tecidos consumida.

Estudos anteriores afirmam que nem espículas ou fragmentos de esqueleto de esponjas do Caribe ou da Antártica detêm a predação por diferentes espécies de asteróides (Dayton et al. 1974, McClintock 1987, Wulff 1995). A explicação para essas observações é que o muco liberado pelo estômago evertido afetaria somente o material celular da esponja, que é depois absorvido. Neste caso, o esqueleto envolvido por fibras de espongina seria deixado para trás intacto. A observação de *E. brasiliensis* mostra que o dano na esponja é sempre acompanhado pela perda de espículas no local, indicando que ocorre também a ingestão de componentes esqueléticos.

Estes resultados mostram que não há um mecanismo seletivo que permita às estrelas ingerir apenas a fração orgânica dissolvida. Fragmentos do esqueleto ainda unidos por espongina nodal estavam presentes no estômago e espículas isoladas puderam ser observadas no estômago e nas fezes. No entanto, isto não aparenta ser resultado de algum processo mecânico para remoção ativa de partes das esponjas. A frequência de espículas encontradas no estômago é baixa em relação à quantidade normalmente encontrada nos tecidos. Esta ingestão parece ser, portanto, incidental,

resultante da digestão e conseqüente perda da integridade estrutural dos tecidos no local afetado, liberando então partes do esqueleto. Esta observação, em conjunto com a presença de fragmentos esqueléticos ainda com espongina nodal no estômago, mas apenas espículas livres nas fezes, é de certa forma inesperada. O colágeno de esponjas é descrito como extremamente resistente a todos os tratamentos enzimáticos conhecidos (Garrone et al. 1985), mesmo collagenases normalmente usadas em outros tecidos. No entanto, *E. brasiliensis* parece ter algum mecanismo ainda indeterminado para sua remoção e aproveitamento.

Embora as espículas sejam rígidas, com terminações bastante pontiagudas, e estejam presentes intactas no trato digestivo, possíveis danos causados pela sua presença aparentam ser localizados e restritos. As espículas das espécies testadas são compostas basicamente por sílica e, portanto, permanecem inertes no interior do organismo, sem causar efeitos sistêmicos danosos. O oposto pode ser observado com espículas de algas calcáreas. O carbonato de cálcio age como tampão, e modifica o pH do trato digestivo de potenciais predadores facilitando desta forma a ação de metabólitos secundários (Hay et al. 1994). Em *E. brasiliensis* foram observadas espículas inseridas nas paredes dos estômagos, mas os danos causados são localmente restritos. As paredes do estômago têm um epitélio grosso e protegido por muco. Adicionalmente, qualquer dano local limitado pode ser rapidamente contrabalançado pela grande capacidade regenerativa dos equinodermos (Carnevali & Bonasoro 2001).

Já foi observado que espículas silicosas podem passar ao longo do trato digestivo de organismos maiores, *e.g.* répteis marinhos (Meylan 1988) e peixes (Randall & Hartman 1968), sem efeitos deletérios. Por outro lado, alguns equinodermos, como ouriços, aparentemente não são capazes de remover as espículas ingeridas. Nestes organismos a parede do intestino anterior é formada por músculos e protegida por muco. Através de peristaltismo ocorre o transporte do

alimento e como resultado há o contato entre o alimento e a parede do intestino. Neste processo, algumas das espículas ingeridas penetram no epitélio e entram na cavidade celômica, onde são encapsuladas por celomócitos (amebócitos e esferulócitos) formando os chamados "corpos marrons" (Valembois et al. 2002). Estas estruturas podem conter melanina e são alocadas posteriormente em cavidades especiais do corpo, especialmente nas ampolas e no órgão de Stewart (Birenheide et al. 1993). Em *E. brasiliensis*, tais estruturas não foram observadas. Diferentemente dos ouriços espongívoros, em *E. brasiliensis*, espículas livres foram encontradas nas pelotas fecais e não apresentavam qualquer tipo de envelopamento orgânico detectável, indicando que são expelidas naturalmente pelo organismo.

5.3 Processos digestivos

O tempo de digestão dos alimentos é afetado primeiramente pela estrutura do aparelho digestivo do animal. De uma maneira geral, o trato digestivo de animais pode ser dividido em três modelos: reator de lote, reator de fluxo contínuo ou de reservatório de mistura (Penry & Jumars 1987). Assim como observado em equinóides (Lawrence & Klinger 2001), o trato digestivo de *E. brasiliensis* é do tipo fluxo contínuo, com passagem contínua de alimento e liberação de material fecal já a partir de 6h e continuando até 50h após a ingestão. Consequentemente, a primeira aparição de material fecal não indica o trânsito de todo o material consumido.

O processo de digestão também é influenciado pelas características do alimento, tais como carboidratos solúveis, lipídios totais e proteínas. Depende em primeiro lugar da digestibilidade dos macronutrientes que compõem o alimento e também de sua abundância nos diferentes alimentos (Klinger et al. 1985, Frantziz & Grémare 1992, Lawrence & Klinger 2001). Alimentos mais difíceis de serem digeridos podem ser retidos por tempos maiores e em maiores quantidades no aparelho digestivo (Sibly 1981), uma compensação para permitir a digestão e absorção no

decorrer do processo. Em *E. brasiliensis* o tempo de digestão é afetado tanto pela quantidade de alimento ingerido, quanto pelo tipo de alimento. Dependendo da espécie de esponja, as estrelas ingerem uma menor quantidade e esta permanece mais tempo no trato digestivo do animal. Já quando alimentados com *L. brasiliensis*, foram verificados tempos de digestão baixos, próximos apenas à *H. melana*, e as maiores quantidade de volume consumido. Apesar de *L. brasiliensis* possuir uma maior quantidade de proteínas e outros nutrientes (Rosa et al. 2005), tal fato é possivelmente influenciado também pela ausência de componentes esqueléticos. Assim, esta equivalência no tempo de digestão entre *L. brasiliensis* e *H. melana* pode estar relacionada à maior proporção de material orgânico nesta esponja quando comparada com as demais.

Além de dificultar a digestão, a presença de componentes orgânicos resistentes e espículas pode diminuir a palatabilidade do material consumido (Randall & Hartman 1968, Wainwright et al. 1982). Espículas grandes já foram descritas como sendo irritantes para o trato digestivo de peixes (Bergquist 1978, Hoppe 1988). Entretanto, mesmo conteúdos espiculares densos não necessariamente previnem a predação, como observado nas relações de consumo entre diversas espécies de estrelas e esponjas antárticas (Dayton et al. 1974). Uma forma de evitar a ingestão de componentes esqueléticos ou de difícil digestão é digerir o alimento fora do corpo. Embora a digestão extracorpórea seja reconhecida como uma estratégia para obtenção de nutrientes, a prática também é ecologicamente importante, pois permite que predadores relativamente pequenos possam se utilizar de presas grandes que não poderiam ser engolidas inteiras ou fragmentadas. Fisiologicamente, este processo também reduz a utilização de espaços do corpo para armazenar partes do alimento adquirido. Por outro lado significa uma superfície de absorção potencialmente exposta ao meio externo, o que pode ser problemático em um ambiente aquático.

Talvez em vista disto, a maioria dos animais que apresentam digestão extracorpórea está representada entre organismos terrestres. Muitas teorias afirmam que tal método de alimentação não poderia funcionar em um ambiente aquático porque os componentes digestivos e seus produtos seriam facilmente diluídos (Cohen 1995). Contudo, exemplos destes mecanismos não são incomuns entre os animais marinhos. O uso externo de catalizadores ou abrasivos como enzimas e ácidos para cavar buracos ou túneis em substratos duros também é uma prática que seria custosa para os animais devido à diluição em um ambiente aquático (Cohen 1995). Ainda assim, representantes de praticamente todos os filos utilizam-se deste processo no ambiente marinho (Decae 1984). Predadores generalistas, especialmente invertebrados como estrelas-do-mar, são bem conhecidos pela sua capacidade de digerir a presa fora de seus corpos (Anderson 1966). Isso ocorre, pois os animais que utilizam mecanismos químicos para dissolver ou digerir o material sob a água apresentam adaptações especiais para evitar sua diluição. No caso de *E. brasiliensis*, isto pode estar representado pela parede flexível do estômago cardíaco. Ao ser evertido, o tecido se ajusta aos contornos do substrato, criando uma área central relativamente isolada do meio externo.

Apesar de isosmóticos com o habitat marinho o pH do trato digestivo das estrelas-do-mar varia entre 6,6 a 7,5 nos poucos organismos já estudados, portanto abaixo do pH da água do mar que é de 8,3 (Anderson 1966, Sloan 1980). Estudos sobre o perfil enzimático das estrelas-do-mar iniciaram-se com Fredericq em 1878 (Anderson 1953). Desde então experimentos demonstraram a presença de proteases, lipases e amilases em extratos de cecos pilóricos, e proteases e amilases nos estômagos. Essas enzimas estão presentes em quantidades diferentes e atividades características nas espécies polares ou subtropicais, não sendo observadas adaptações específicas para facilitar a digestão em baixas temperaturas (Klinger et al. 1997). Entretanto, estudos sugerem possíveis diferenças marcantes na sua

distribuição no trato digestivo e, dependendo da espécie estudada, com as enzimas sendo encontradas apenas nos cecos (Brahimi-Horn et al. 1989, Taylor & Williams 1995, Klinger et al. 1997).

Neste trabalho o método utilizado não distinguiu tipos de proteases, amilases ou lipases, exceto da tripsina. O perfil obtido a partir dos cecos pilóricos de *E. brasiliensis* apresentou uma mistura complexa de enzimas proteolíticas e também de lipases e amilases totais em maiores quantidades quando comparadas com os estômagos cardíaco e pilórico. Isso indica que os cecos são o principal local de digestão do alimento consumido, embora este possa ser processado desde sua ingestão inicial. Resultados similares foram encontrados para a espécie *Pisaster ochraceus* e também para outros equinodermos (Araki & Giese 1970, Féral 1989, Obrietan et al. 1991).

A digestão oral e extracorpórea é utilizada por *E. brasiliensis*, e danos extensivos podem ser verificados nos tecidos das presas. Sendo assim, seria de se esperar que o estômago cardíaco apresentasse maior atividade enzimática em relação aos outros tecidos do que o observado. Entretanto, nossos dados não suportam esta hipótese, pois a atividade encontrada não foi alta para os tecidos na região oral, sendo comparativamente menor que as encontradas no estômago pilórico e nos cecos. É possível que a secreção das enzimas seja feita na forma de precursores inertes, ativados em contato com o meio externo salino e de pH básico, e não detectados nas condições usados para os ensaios enzimáticos. De qualquer forma, tendo em vista o observado em termos de danos no local e conteúdo estomacal, a ação nesta região parece ser mais voltada a desestabilizar os tecidos da presa. Fragmentos poderiam então ser encaminhados ao interior do trato digestivo pela parede muscular do estômago cardíaco e processados em detalhe posteriormente.

Sendo uma das funções dos cecos pilóricos a produção de enzimas, os produtos da digestão extracelular realizada no estômago passam para seu interior,

onde o processo é completado e acontece a absorção. Assim, a baixa produção enzimática verificada no estômago cardíaco pode ser complementada com enzimas produzidas por outras partes do corpo de *E. brasiliensis*, como os cecos pilóricos.

5.4 Absorção de nutrientes e celomócitos

Após o consumo de *Loligo brasiliensis*, a estrela estudada apresentou maior número de celomócitos quando comparada ao pós-consumo das esponjas, provavelmente devido a sua melhor qualidade nutricional. Da mesma forma, o aumento verificado a partir do consumo de esponjas também acompanha a qualidade e preferência pela presa, sendo maior em *H. melana* e menor em *D. reticulatum*. Em equinodermos, aparentemente existe a necessidade do envolvimento direto de celomócitos no transporte de nutrientes, principalmente de lipídios (Oudejans & Rutten 1982, Beijnkink & Voogt 1984). Tal fato também pode explicar porque *D. reticulatum* teve o maior tempo de digestão por volume consumido, visto que esta espécie possui maior porcentagem lipídica em sua constituição.

Existem evidências que estas células realizem a fagocitose tanto de corpos estranhos quanto de nutrientes, auxiliando em sua absorção e transporte no corpo do animal. Alterações nestas populações são sempre relacionadas a reações de defesa contra injúrias (Pinsino et al. 2007), aumento de temperatura, presença de poluentes, acidose e exposição a raios UV-B, (Matranga et al. 2000, 2002, 2006) e também em hipóxia (Holm et al. 2008). Entretanto, o aumento verificado em *E. brasiliensis* não parece estar relacionado à proteção quanto aos componentes espiculares ou detoxificação, e sim à quantidade ou a qualidade dos nutrientes provenientes do alimento. O aumento menor no número de celomócitos após a ingestão de esponjas em relação a *L. brasiliensis* evidencia que não há uma resposta fisiológica aparente a este tipo de alimento em particular, embora possam ser ingeridos componentes potencialmente danosos (*viz.* espículas e possíveis compostos tóxicos).

As fezes encontradas são compostas de detritos menores, com tamanhos entre 0.45 μm e 1 mm, sendo classificados como material orgânico particulado e que ainda podem ser utilizados posteriormente como fonte alimentar por outros detritívoros (Wotton 1994). A eficiência de absorção de nutrientes relatada na literatura é estimada em porcentagem de material fecal, sendo 100% a taxa máxima de eficiência absorptiva. *Echinaster brasiliensis* libera 47% da biomassa de esponja ingerida como material fecal. Estrelas alimentadas com esponjas apresentam eficiência digestiva baixa quando comparadas com os valores de 80% de digestão para tecidos de outros animais (Bjornal 1985). Isso concorda com a má digestão de esponjas já descrita para tartarugas e peixes espongiívoros (Bjornal 1990, Chanas & Pawlik 1995), sendo esta baixa digestibilidade e absorção associada à presença de fibras de colágeno e grande quantidade de espongina. Apesar de uma eficiência de digestão baixa, a absorção é maior quando comparadas com equinodermos herbívoros, que precisam digerir a celulose como componente esquelético. Ouriços-do-mar alimentados com algas apresentam 67 a 81% da biomassa ingerida encontrada no material fecal (Frantzis & Grémare 1992, Agatsuma 2000).

Segundo a teoria de otimização de absorção de nutrientes (Vadas 1977, Himmelman & Nédélec 1990), seria esperado que as porcentagens de defecação deveriam ser menores para o alimento mais consumido, *H. melana*. Nossos resultados mostram que esta espécie junto com *M. angulosa*, já apontada como preferência alimentar de *E. brasiliensis* na natureza (Guerrazzi 1998, Hajdu et al. 2000) apresenta maior absorção quando comparados com a espécie menos predada, *D. reticulatum*. Entretanto, esta absorção é menor que a encontrada em estrelas alimentadas com *L. brasiliensis*. Essa otimização na absorção de nutrientes pode basear-se em uma maior quantidade de energia encontrada neste tipo de alimento. Entretanto, embora outros tipos de alimento, uma vez capturados, possam ser superiores no que diz respeito ao seu valor nutricional por unidade de volume, esponjas possibilitam maior ganho

energético. São organismos comuns no habitat de *E. brasiliensis*, sésseis e portanto mais facilmente encontrados e capturados (Wulff 1995).

6.0 CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que em *E. brasiliensis* possui hábito espongiívoro, embora este não seja exclusivo, e se alimenta de pequenas quantidades de diferentes espécies de esponjas (e portanto de diferentes toxinas associadas a estas espécies). É possível que devido à baixa quantidade energética deste alimento *E. brasiliensis* forrageie sobre outros itens quando possível, como observado em campo. Este forrageamento pode também estar relacionado às diferentes necessidades nutricionais, o que faz o animal adotar uma estratégia de otimização de benefícios energéticos derivados de uma dieta mista (Rapport 1980). Ao se considerar os dados qualitativos das enzimas digestivas nos espécimes analisados em estudo preliminar, a presença de diferentes enzimas em todas as partes do sistema digestório de *E. brasiliensis* pode também favorecer a existência de uma dieta diversificada nestes animais.

Em geral, a presença de compostos deterrentes e o conteúdo esquelético das esponjas são tratadas de forma separada, buscando identificar um dos fatores como principal determinante do consumo. No entanto, nossos resultados demonstram que estas relações são bem mais complexas do que o suposto. A preferência alimentar de *E. brasiliensis* não depende só destes dois itens, mas é determinada pelo balanço de um conjunto de fatores, que incluem também a disponibilidade, a quantidade de matéria orgânica e mesmo o formato e consistência do organismo predado.

Ao contrário da literatura disponível para espécies de asteróides espongiívoros, *E. brasiliensis* ingere componentes esqueléticos das esponjas, e as espículas podem se inserir no epitélio digestivo. Esse resultado enfatiza a necessidade de pesquisas futuras sobre o forrageamento destes animais, bem como sobre os metabólitos secundários e o sequestro de substâncias químicas das esponjas.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Trato digestivo da classe Asteroidea. **A)** Radiografia de *Echinaster brasiliensis* mostrando o canal ambulacral e o centro com os órgãos digestivos. **B)** Esquema mostrando as regiões especializadas do corpo de uma estrela-do-mar (retirado de BIODIDAC).

Figura 2: Organização do sistema digestório de Asteroidea (retirado de BIODIDAC).

Figura 3: *Echinaster brasiliensis*. **A)** Vista dorsal. **B)** Vista ventral com abertura oral.

Figura 4: Espécies de esponjas utilizadas nos experimentos (Porifera Brasil).

Figura 5: Esquema das espículas das espécies de esponjas utilizadas nos experimentos (Porifera Brasil).

Figura 6: Pesagem de esponja *M. angulosa* para determinação de quantidade de matéria orgânica e inorgânica.

Figura 7: Aparato para análise do tempo de digestão e coleta do material fecal. **A)** Espécime de *E. brasiliensis* em funil dentro de aquário com fundo fechado e preenchido com água do mar. **B)** Desenho esquemático do aparato de coleta do material fecal.

Figura 8: Porcentagem de consumo das esponjas mais utilizadas por *E. brasiliensis* em campo. As letras A e B indicam diferença significativamente menor que 0,05 no teste *a posteriori*.

Figura 9: Comportamento alimentar de *Echinaster brasiliensis* em laboratório. **A)** Estrela predando a esponja *H. melana* sobre uma pedra no fundo do aquário. **B)** Pés ambulacrais de *E. brasiliensis* detectando um fragmento da esponja *H. melana*, visto através do vidro do aquário. **C)** *Echinaster brasiliensis* usando os pés ambulacrais para conduzir o fragmento da esponja para a região oral, fotografada na superfície da água (o vidro está na parte inferior da imagem). **D)** Eversão do estômago sobre

fragmento da esponja *H. melana*, observada através do vidro do aquário (*Esp*: Esponja; *Est*: estômago).

Figura 10: Danos teciduais em esponjas causados pela predação de *E. brasiliensis*.

A) Esponja *M. angulosa* com seta indicando área lesionada, marcada pela descoloração do tecido. **B)** Lesão em *H. melana*, também com a superfície descolorada. **C)** Detalhe da lesão superficial em *H. melana*. **D)** Corte semi-fino de *H. melana* mostrando área interna da esponja após a alimentação de *E. brasiliensis*, sendo visíveis os danos mais internos (*Les*: lesão; *Ct*: controle - área intacta sem lesão).

Figura 11: Quantidade de proteínas (**A**) e lipídios (**B**). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão.

Figura 12: Produção de matéria fecal e tempo de digestão de *E. Brasiliensis* para os diferentes alimentos testados.

Figura 13: Volume consumido ao longo do tempo (volume / tempo x 100) por *E. brasiliensis*, considerando as espécies de esponjas (letras diferentes indicam diferença significativa menor que 0,05 no teste *a posteriori* de Fisher).

Figura 14: Regressão linear mostrando a relação entre volume consumido e tempo de digestão para os diferentes tipos de alimento oferecidos a *E. brasiliensis*.

Figura 15: Porcentagem de defecação de *E. brasiliensis* para diferentes tipos de alimentos.

Figura 16: Espículas de *H. melana* (**A, B e D**) e *M. angulosa* (**C**) contidas no material fecal de *E. brasiliensis*. (**A, B e C**) Microscopia eletrônica de varredura mostrando espículas livres misturadas nas fezes. (**D**) Espículas livres encontradas no conteúdo fecal analisadas em microscopia ótica.

Figura 17: Quantidade média de espículas quebradas observadas em diversas amostras coletadas

Figura 18: Cortes histológicos de estômago pilórico de *E. brasiliensis*. **A-B)** Espículas de *H. melana* inseridas no tecido. **C)** Espícula dentro do estômago de *E. brasiliensis* com restos de esponja não digerida. **D)** Espícula inserida no estômago pilórico de *E. brasiliensis*.

Figura 19: Espículas de *H. melana* encontradas no conteúdo estomacal de *E. brasiliensis*. **A-B)** Óxeas unidas por espongina nodal contidas no estômago pilórico da estrela. **C)** Óxea livre e intacta encontrada no estômago cardíaco. **D)** Espícula livre (óxea ou estilo) com as terminações quebradas encontrada no estômago cardíaco. (Jun: junção por espongina nodal).

Figura 20: Atividade enzimática em diferentes partes do sistema digestório de *E. brasiliensis*. **A)** Amilase, **B)** Lipase, **C)** Proteases inespecíficas, **D)** Tripsina (pH 7.2).

Figura 21: Celomócitos de *E. brasiliensis* aderidos em placa de cultura.

Tabela 1: Resultado da ANOVA comparando Volume consumido ao longo do tempo entre as espécies de esponjas predadas.

Tabela 2: Resultado da ANOVA comparando a porcentagem de defecação entre as espécies de presa.

Tabela 3: Resultado da ANOVA comparando a quantidade de espículas quebradas observadas em diversas amostras coletadas.

Tabela 4: Resultado da ANOVA comparando o número de amebócitos observados no líquido celomático de acordo com o tipo de alimento (espécies testadas) oferecido a *E. brasiliensis*. e a quantidade de amebócitos no líquido celomático de *Echinaster brasiliensis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
HEPES	Ácido Hidroxietil-piperazineetasulfónico
Tris-HCl	Tris-Hidrocloreto
BAPNA	N-a-benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida
DMSO	Dimetilsulfóxido

7.0 BIBLIOGRAFIA

- AGATSUMA, Y., 2000. Food consumption and growth of the juvenile urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Fisher Science* 66: 467-472.
- ALBRO, P.W., HALL, R.D., CORBETT, J.T., SCHROEDER, J. 1985. Activation of non-specific lipase by BILE salts. *Biochemistry et Biophysica Acta* 835, 477–490.
- ANDERSON, J.M. 1960. Histological studies on the digestive system of a starfish *Henricia* with notes on Tiedsmann's pouches in starfishes. *Biological Bulletin* 119: 371-398.
- ANDERSON, J.M. 1953. Structure and function in the pyloric caeca of *Asterias forbesi*. *Biological Bulletin* 105: 47-61.
- ANDERSON, J.M. 1966. Aspects of nutritional physiology. In *Physiology of Echinodermata* (Edited by Boolootian R.A.), pp. 329-359. Interscience, New York.
- ANDERSON 1978.
- ANDRÉA, B.R., BATISTA, D., SAMPAIO, C.L.S., MURICY, G. 2007. Spongivory by juvenile angelfish (Pomacanthidae) in Salvador, Bahia State, Brazil. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability* p.131-137.
- ARAKI, G. S., GIESE, A. C. 1970. Carbohydases in sea stars. *Physiological Zoology* 43:296-305.
- BELL, J.J., BARNES, D.K.A. 2001. Sponge morphological diversity: a qualitative predictor of species diversity? *Aquatic Conservation: Marine Freshwater Ecosystem* 11: 109–121.
- BARTHEL, D. 1988. On the ecophysiology of the sponge *Halichondria panicea* in Kiel Bight. It. Biomass, production, energy budget and integration in environmental processes. *Marine Ecology Progress Series* 32: 291-298.
- BARTHEL, D. 1995. Tissue composition of sponges from the Weddel Sea, Antartica: not much meal on the bones. *Marine Ecology Progress Series* 123: 149-153.
- BEHMER, O.A., TOLOSA, E.M.C., FREITAS, NETO, A.G. 1976. Manual de técnicas de histologia normal e patológica. EDART / EDUSP, São Paulo. 122.
- BEIJNINK, F.B., VOOGT, P.A. 1984. Nutrient translocation in the sea star: whole body and microautoradiography after ingestion of radiolabeled leucine and palmitic acid. *Biological Bulletin* 166: 669-682.
- BERGQUIST, P.R. 1978. Sponges. Hutchinson & Co, London. 268 pages.
- BERNFELD, P. 1955. Amylases, α and β . In: Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (eds.) *Methods in enzymology*. Vol. I. Academic Press, New York, p.149-158.

- BIODIDAC. <http://biodidac.bio.uottawa.ca>. Acessado em 05 de janeiro de 2012.
- BIRENHEIDE, R., AMEMIYA, S.Z., MOTOKAWA, T. 1993. Penetration and storage of sponge spicules in tissues and coelom of spongivorous echinoids. *Marine Biology* 115: 677-683.
- BJORNAL, K.A. 1985. Nutritional ecology of sea turtles. *Copeia* 736-751.
- BJORNAL, K.A. 1990. Digestibility of the sponge *Chondrilla nucula* in the green turtle, *Chelonia mydas*. *Bulletin of Marine Science* 47(2): 567-570.
- BOOLOTIAN, R.A. 1966. Feeding and digestion. In: Boolotian, R.A. (ed) *Physiology of Echinodermata*. New York, Interscience Publishers p.13-21.
- BORGES, JOÃO CARLOS SHIMADA; JENSCHJUNIOR, BERNARD ERNESTO GARRIDO, PAULA; MANGIATERRA, MARIA BÁRBARA BAPTISTA CEPELLOS DARUI; SILVA, J.R.M.C. 2005. Phagocytic amoebocytes sub populations in the perivisceral coelom of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). *Marine Biology* (Berlin), v. 303a: 241-248.
- BOURY-ESNAULT. N. & RUETZLER. K. (eds), 1997. *Thesaurus of sponge morphology*. *Smithonian Contribution to Zoology* 596, 55 p.
- BRAHIMI-HORN, M.C., GUGLIELMINO, M.L., SPARROW, L.G., LOGAN, R.I., MORAN, P.J. 1989. Lipolytic enzymes of the digestive organs of the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*): comparison of the stomach and pyloric caeca. *Comparative Biochemical Physiology* 92B: 637-643.
- BRUN, E. 1976. Ecology and taxonomic position of *Henricia oculata* Pennant. *Thalassia Jugoslavia* 12: 51-64.
- BRYAN, P.J., MCCLINTOCK, J.B., HOPKINS, T.S. 1997. Structural and chemical defenses of echinoderms from the northern Gulf of Mexico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 210(2): 173-186.
- BURNS E., ILAN M. 2003. Comparison of anti-predatory defenses of Red Sea and Caribbean sponges. II. Physical defense. *Marine Ecology Progress Series* 252: 115-123.
- CARNEVALI, M.D.C., BONASORO, F. 2001. Introduction to the biology of regeneration in echinoderms. *Microscopy Research Technology* 55: 365-368.
- CERRANO, C., BAVESTRELLO, G., CALCINAI, B., CATTANEO-VIETTI, R., SARÀ, A. 2000. Asteroids eating sponges from Tethys Bay, East Antarctica. *Antarctic Science* 12 (4): 425-426.
- CHANAS, B., PAWLIK, J.R. 1996. Does the skeleton of a sponge provide a defense against predatory reef fish? *Oecologia* 107: 225-231.

- CHANAS, B., PAWLIK, J.R. 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. II. Spicules, tissue toughness, and nutritional quality. *Marine Ecology Progress Series* 127: 195- 211.
- CHIA F, XING J. 1996. Echinoderm coelomocytes, a review. *Zoological Studies* 35: 231-254.
- CHRISTENSEN, A. M. 1957. The feeding behavior of the seastar *Evasterias troschelli* Stimpson. *Limnol. Oceanogr.* 2, 180-197.
- CIMINO, G., GHISELIN, M.T. 1999. Chemical defense and evolutionary trends in biosynthetic capacity among dorid nudibranchs (Mollusca: Gastropoda: Opisthobranchia). *Chemoecology* 9: 187-207.
- COHEN, A. C. 1995. Extra-oral digestion in predaceous terrestrial arthropoda. *Annual Review Entomological* 40:85-103.
- DAYTON, P.K., ROBILLIARD G.A., PAINE R.T., DAYTON L.B. 1974. Biological accommodation in the benthic community at McMurdo Sound, Antarctica. *Ecologic Monographs* 44: 105-128.
- DECAE, A. 1984. A theory on the origin of spiders and the primitive function of spider silk. *Journal of Arachnology* 12: 21-28.
- DUFFY, J.E., PAUL, V.J. 1992. Prey nutritional quality and the effectiveness of chemical defenses against tropical reef fishes. *Oecologia* 90: 333-339.
- DUNHAM, P., WEISSMAN, G. 1986. Association of marine sponge cells induced by Ca pulses, Ca ionophores, and phorbol esters proceeds in the absence of external calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 134: 1319 - 1326.
- ELISEIKINA M. G. MARGALAMOV T. YU. 2001 Coelomocyte Morphology in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). *Russian Journal of Marine Biology* 28(3): 197-202.
- ENDEAN, R. 1996. The coelomocytes and coelomic fluids. *In: Physiology of Echinodermata*. Ed. Boolootian, R.A. New York : Interscience Publishers. p.301-321.
- FARMANFARMAIAN, A., PHILLIPS, J.H. 1962. Digestion, storage, and translocation of nutrients in the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) *Biological Bulletin* 123(1): 105-120.
- FÉRAL J.P. 1989. Activity of the principal digestive enzymes in the detritivorous apodous holothuroid *Leptosynapta galliennei* and two other shallow-water holothuroids. *Marine Biology* 101:367-379.

- FERGUSON, J.C. 1969. Feeding activity in *Echinaster* and its induction with dissolved nutrients. *Biologic Bulletin* 136: 374-384.
- FERGUSON A.M., DAVIS A.R. 2008. Heart of glass: spicule armament and physical defense in temperate reef sponges. *Marine Ecology Progress Series* 372: 77-86.
- FRANTZIS, A., GRÉMARE, A., 1992. Ingestion, absorption, and growth rates of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed different macrophytes. *Marine Ecology Progress Series* 95: 169-183.
- FROST, T.M., DENAGY, G.S., GILBERT, J.J. 1982. Population-dynamics and standing biomass of the fresh-water sponge *Spongilla lacustris*. *Ecology* 63(5): 1203-1210.
- FOLCH, J., LESS, M., STANLEY G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-503.
- FRINGS, C.S., FENDLY, T.W., DUNN, R.T., QUENN, C.A. 1972. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clinical Chemistry* 18: 673-674.
- FUSETANI, N., SUGAWARA, T., MATSUNAGA, S. 1991. Cytotoxic metabolites of the marine sponge *Mycale adhaerens* Lambe. *Journal of Organic Chemistry* 56: 4971-4974.
- GAWLICKA, A., PARENT, B., HORN, M.H., ROSS, N., OPSTAD, I., TORRISSEN, O.J. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture* 184(3-4): 303-314.
- GARRONE R., GUENIN P., MAZZORANA M. 1985. Sponge collagens: Structural diversity and fibril assembly. *Annals of the New York Academy of Sciences* 460: 434-438.
- GAYMER, C.F., HIMMELMAN, J.H., JOHNSON, L.E. 2001. Use of prey resources by the seastars *Leptasterias polaris* and *Asterias vulgaris*: a comparison between field observations and laboratory experiments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 262: 13-30.
- GOREAU, T.F. 1964. On the predation of coral by the spiny starfish *Acanthaster planci* (L.) in the southern Red Sea Sea. *Fisheries Research Station (Haifa) Bulletin*, 35: 23-36.
- GUERRAZZI, M.C., HAJDU, E.; MORGADO, E.H. ; DUARTE, L.F.L. 1998. Spongivory by the Brazilian starfish *Echinaster brasiliensis*. In: Vth International Sponge Symposium - Origin & Outlook, 1998, Brisbane. *Memoirs of the Queensland Museum*, volume 44.

- GUERRAZZI, M.C. 1999. Padrões populacionais e ecologia do forrageamento de *Echinaster brasiliensis* Müller & Troschel (Echinodermata:Asteroidea), no Canal de São Sebastião, SP. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista.
- HAJDU, E., CUSTÓDIO, M.R., GUERRAZZI, M.C. 2000. Abundância e recobrimento de Porifera em um costão rochoso no Canal de São Sebastião (litoral norte do Estado de São Paulo). In: XV Simpósio de Biologia Marinha, São Sebastião. Anais do XV Simpósio de Biologia Marinha.
- HAJDU E., PEIXINHO S., FERNANDEZ, J.C.C. 2011. Esponjas Marinhas da Bahia: Guia de campo e Laboratório. Museu Nacional, Série Livros 45: 276p.
- HAY, M.E., KAPPEL, Q.E., FENICAL, W. 1994. Synergisms in plant defenses against herbivores: interactions of chemistry, calcification, and plant quality. *Ecology* 75: 1714-1726.
- HILL, M.S., LOPEZ, N.A., YOUNG, K.A. 2005. Anti-predator defences in Western North Atlantic sponges with evidence of enhanced defence through interactions between spicules and chemicals. *Marine Ecology Progress Series* 291: 93-102.
- HIMMELMAN, J.H., NÉDÉLEC, H., 1990. Urchin foraging and algal survival strategies in intensely grazed communities in Eastern Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 47: 1011-1026.
- HOLM, K. HERNROTH, B., THORNDYKE, M. Coelomocyte numbers and expression of HSP70 in wounded sea stars during hypoxia. *Cell and Tissue Research* 334(2): 319-325.
- HOOPER, J.N.A., VAN SOEST RWM, 2002. *Systema Porifera: A guide to the classification of sponges*. Springer-Verlag 1810p.
- HOPPE, W.F. 1988. Growth, regeneration and predation in three species of large coral reef sponges. *Marine Ecology Progress Series* 50: 117-125.
- HYMAN, L. H. 1955. *The Invertebrates: Echinodermata. The Coelomate Bilateria*. McGraw-Hill Book Company 4: 763.
- HUSTON, M.A. 1985. Patterns of species diversity on coral reefs. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 149-177.
- IORIZZI,M., RICCARDIS,F. DE MINALE, RICCIO, R. 1993. Starfish saponins, 52. Chemical constituents from the starfish *Echinaster brasiliensis*. *Journal of Natural Products* 56 (12): 2149-2162.
- ISAEVA, V.V., KORENBAUN, E.S. 1990. Defense functions of coelomocytes and immunity of echinoderms. *Soviet Journal of Marine Biology* 15: 353-363.
- IVLEV, V. 1961. *Experimental ecology of the feeding of fishes*. Yale University Press, New Haven Conn. 302p.

- JANGOUX, M. 1982. Food and feeding mechanisms: Asteroidea. In: M Jangoux, J.M. Lawrence (eds), Echinoderm nutrition. AA Balkema. Rotterdam, p.117-159.
- JORDAN, H. 1910. Über extraintestinale Verdauung im allgemeinen und bei *Carabus auratus* im besonderen. *Biological Zelltralbl* 30:85-96
- KETTLE, B.T., LUCAS, J.S. 1987. Biometric relationships between organ indices, fecundity, oxygen consumption and body size in *Acanthaster planci* (L.) (Echinodermata, Asteroidea). *Bulletin of Marine Science* 41:541-551
- KLINGER, T.S., HSIEH, H.L., PANGALLO, R.A., CHEN, C.P., LAWRENCE, J.M. 1985. The effect of temperature on feeding, digestion and absorption of *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). *Physiological Zoology* 59: 332-336.
- KLINGER, T.S., MCCLINTOCK, J. B., WATTS S. A. 1997. Activities of digestive enzymes of polar and subtropical echinoderms. *Polar Biology* 18(2): 154-157.
- KOHMOTO, S., KASHMAN, Y., MCCONNELL, O.J., RAINEHART, K.L., WRIGHT, A.JR., KOEHN, F. 1988. Dragmacidin F, a new cytotoxic bis(indole) alkaloid from a deep water marine sponge *Dragmacidon* sp. *Journal of Organic Chemistry* 53(13): 3116-3118.
- LAUGHLIN, J.D. 1989. Coelomocytes of the urchin *Lytechinus pictus* (Echinoidea). *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 404-405.
- LAWRENCE, J.M., KLINGER, T.S., 2001. Digestion in sea urchins. In: Lawrence, J.M. (Ed.), *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p.103-113.
- LAWRENCE, J. A. 1987. *A functional biology of echinoderms*. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press. 340p.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- MARTOJA, R., MARTOJA, M., 1967. *Initiation aux Techniques de l'Histologie Animale*. Masson et C^{ie}, 354p.
- MATRANGA, V., TOIA, G., BONAVENTURA, R., MÜLLER, W.E.G. 2000. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. *Cell Stress Chaperones* 5: 113-120.
- MATRANGA, V., BONAVENTURA, R., DI BELLA, G. 2002. HSP70 as a stress marker of sea urchin coelomocytes in short term cultures. *Cellular and Molecular Biology* 48: 345-349.

- MATRANGA, V., PINSINO, A., CELI, M., DI BELLA, G., NATOLI, A. 2006. Impacts of UV-B radiation on short-term cultures of sea urchin coelomocytes. *Marine Biology* 149: 25-34.
- MCCLINTOCK, J.B. 1987. Investigation of the relationship between invertebrate predation and biochemical composition, energy content, spicule armament and toxicity of benthic sponges at McMurdo Sound, Antarctica. *Marine Biology* 94: 479-487.
- MCCLINTOCK, J.B., AMSLER, C.D., BAKER, B.J., VAN SOEST, R.W.M. 2005. Ecology of Antarctic marine sponges: An overview. *Integrative and Comparative Biology* 45(2): 359-368.
- MCCLINTOCK, J.B., AMSLER, M.O., AMSLER, C.D., BAKER, B.J. 2006. The biochemical composition, energy content, and chemical antifeedant defenses of the common Antarctic Peninsular sea stars *Granaster nutrix* and *Neosmilaster georgianus*. *Polar Biology* 29(7): 615-623.
- MELÃO, M.G.G., ROCHA, O. 1999. Biomass and productivity of the freshwater sponge *Metania spinata* (Carter, 1881) (Demospongiae: Metaniidae) in a Brazilian reservoir. *Hydrobiologia* 390: 1-10.
- MENGE, B.A., 1982. Effects of feeding on the environment: Asteroidea. In: M. Jangoux. JM Lawrence (eds) *Echinoderm nutrition*. AA Balkema. Rotterdam. P. 521-551.
- MEYLAN, A. 1988. Spongivory in Hawksbill turtles: a diet of glass. *Science* 239(4838): 393-395.
- MILLIGAN, C.L., GIRARD, S.S. 1993. Lactate metabolism in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 180: 175-193.
- MONKS, N.R., LERNER, C., HENRIQUES, A.T., FARIAS, F.M., SCHAPOVAL, E.E.S., SUYENAGA, E.S., DA ROCHA, A.B., SCHWARTSMANN, G., MOTHES, B. 2002. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 281(1-2): 1-12
- MURICY, G., HAJDU, E. 2006. *Porifera Brasilis: guia de identificação das esponjas mais comuns do Sudeste do Brasil*. Série Livros 17, Museu Nacional, Rio de Janeiro.
- OBRIETAN, K., DRINKWINE, M., WILLIAMS, D.C. 1991. Amylase, cellulase and protease activities in surface and gut tissues of *Dendraster excentricus*, *Pisaster ochraceus* and *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinodermata). *Marine Biology* 109: 53-57.

- OUDEJANS, R.C.H.M., RUTTEN, V.P.G.M. 1982. Fate of the glycerol and acyl moieties from dietary trioleylglycerol in the sea star, *Asterias rubens*. Comparative Biochemistry and Physiology 73B: 685-693.
- PAWLIK, J.R. 1993. Marine invertebrate chemical defenses. Chemical Reviews 93: 1911-1922.
- PAWLIK J.R., CHANAS B., TOONEN R.J., FENICAL W. 1995. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish .1. Chemical deterrence. Marine Ecology Progress Series 127(1-3): 183-194.
- PAWLIK J.R., KERNAN M.R., MOLINSKI T.F., HARPER M.K., FAULKNER J. 1988. Defensive chemicals of the Spanish dancer nudibranch *Hexabranchus sanguineus* and its egg ribbons: macrolides derived from a sponge diet. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 11(9):99-10.
- PAWSON, D.L. 2007. Phylum Echinodermata. Zootaxa 1668: 749 - 764.
- PENNINGS, S.C., PABLO, S.R., PAUL, V.J., DUFFY, J.E. 1994. Effects of sponge secondary metabolites in different diets on feeding by three groups of consumers. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 180: 137-149.
- PENRY, D.L., JUMARS, P.A. 1981. Modeling animal guts as chemical reactors. American Naturalist 129: 69-96.
- PEQUIGNAT, E. Skin digestion and epidermal absorption in irregular and regular urchins and their probable relation to the outflow of spherule-coelomocytes. Nature 210: 397-399.
- PYKE, G. H. 1974. Studies in the foraging efficiency of animals. Ph.D. Thesis, University of Chicago.
- PINSINO, A., THORNDYKE, M.C., MATRANGA, V. 2007. Coelomocytes and post-traumatic response in the common sea star *Asterias rubens*. Cell Stress Chaperones 12:331-341.
- PORIFERA BRASIL. <http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/>. Acessado em 10 de janeiro de 2012.
- PROSSER, C.L, BROWN, F.A. 1961. Comparative animal physiology. Saunders, Philadelphia.
- PULLIAM, H.R. 1974. On the theory of optimal diets. American Naturalist 108: 59-74.
- RAPPORT, D.J. 1971. An optimization model of food selection. American Naturalist 105: 575-87.
- RANDALL, J.E., HARTMAN W.D. 1968 Sponge-feeding fishes of the West Indies. Marine Biology 1: 216-225.

- Rochette, R., HAMEL, J.F., HIMMELMAN, J.H. 1994. Foraging strategy of the asteroid *Leptasterias polaris*: role of prey odors, current and feeding status. Marine Ecology Progress Series 106: 93-100.
- ROSA, J. PEREIRA AND M. L. NUNES. 2005. Biochemical composition of cephalopods with different life strategies, with special reference to a giant squid, *Architeuthis* sp. Marine Biology 146(4): 739-751.
- SCHMITZ, F.J., S.P. GUNASEKERA; YALAMANCHILI, G. HOSSAIN, M.B., VAN DER HELM, D. 1984. Tedanolide: a potent cytotoxic macrolide from the Caribbean sponge *Tedania ignis*. Journal of the American Chemical Society, 106(23): 7251-7252.
- SIBLY, R. 1981. Strategies of digestion and defecation. In: Physiological ecology: an evolutionary approach to resource use. Sinauer, Dunderland, Massachussets.
- SLOAN, N. A. 1980. Aspects of the feeding biology of asteroids. Oceanography and Marine Biology: An annual review 18: 57-124.
- SCHEIBLING, R.E. 1980. Carbohydrases of the pyloric caeca of *Oreaster reticulatus* (Echinodermata: Asteroidea). Comparative Biochemistry and Physiology 67B: 297-300.
- SHEILD, C.J., WITMAN, J.D. 1993. The impact of *Henricia sanguinolenta* (O. F. Müller) predation on the finger sponges. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 166:107-133.
- SMITH, V.J. The echinoderms. In: Ratcliffe NA, Rowley, AF (Eds). 1981. Invertebrate blood cells. London: Academic Press. p.513-562.
- TAYLOR, R., WILLIAMS, D.C. 1995. B-glucanase activity in the seastar *Pisaster ochraceus*. Marine Biology 123: 73-740.
- URIZ, M.J., TURON, X., BECERRO, M.A., GALERA, J. 1996. Feeding deterrence in sponges: the role of toxicity, physical defenses, energetic contents, and life-history stage. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 205:187-204.
- VADAS, R.L. 1977. Preferential feeding: an optimization strategy in sea urchins. Ecological Monographs 47: 337-371.
- VALEMBOIS, P., LASSEGUES, M., ROCH, P. 2002. Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells. Developmental and Comparative Immunology 16(2-3): 95-101.
- VASSEROT, J. 1961. Caractère hautement specialize du régime alimentaire chez les astérides *Echinaster.cephositus* et *Henricia sanguinolenta*, prédateurs de spongiares. Bulletin de la Societe Zoologique de France 86: 796-809.

- VENTURA, C.R.R., LIMA, R.P.N., NOBRE, C.C., VERISSIMO, I., ZAMA, P.C. 2006. Filo Echinodermata. In: Biodiversidade bentônica da região central da Zona Econômica Exclusiva Brasileira. LAVRADO, H.P. & IGNACIO, B.L. (eds). Museu Nacional, Rio de Janeiro, (Série Livros, 18), 389p.
- XING, J., CHIA, F.S. 2000. Oposonin-like molecule found in the coelomic fluid of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota*. Marine Biology 136: 979-986.
- WADDEL, B., PAWLIK, J.R. 2000a. Defenses of Caribbean sponges against invertebrate predators: I. Assays with hermit crabs. Marine Ecology Progress Series 195: 125-132.
- WADDEL, B., PAWLIK, J.R. 2000b. Defenses of Caribbean sponges against invertebrate predators: II. Assays with sea stars. Marine Ecology Progress Series 195: 133-144.
- WAINWRIGHT, S.A., BIGGS, W.D., CURREY, J.D., GOSLINE, J.M. 1982. Mechanical design in organisms. Princeton University Press, Princeton.
- WEST, L. M., NORTHCOTE, P. T., BATTERSHILL, C. N. 2000. Peloruside A: a potent cytotoxic macrolide isolated from the New Zealand marine sponge *Mycale* sp. Journal of Organic Chemistry 65: 445-449.
- WOTTON, R.S. 1994. The classification of particulate and dissolved matter. IN: Wotton, R.S. (ed), The biology of particles in aquatic systems (2nd ed.), Lewis Publishers, Boca Raton, p.1-6.
- WULFF, J.L. 1994. Sponge feeding by Caribbean angelfishes, trunkfishes, and filefishes. In: R W M van Soest, Th MG van Kempen, JC Braekman (eds), Sponges in Time and Space Proc IVth int Sponge Symp Balkema, Rotterdam, p. 265-271.
- WULFF, J.L. 1995. Sponge-feeding by the Caribbean starfish *Oreaster reticulatus*. Marine Biology 123: 13-325.
- WULFF, J.L. 2006a. Ecological interactions of marine sponges. Canadian Journal of Zoology 84: 146-166.
- WULFF, J.L. 2006b. Sponge systematics by starfish predators distinguish cryptic sympatric species of Caribbean fire sponges, *Tedania ignis* and *Tedania klausii* n. sp. (Demospongiae, Poecilosclerida). Biological Bulletin 211: 83-94.