PAOLA CRISTINA BRANCO

Avaliação da resposta imune inata de ouriços-do-mar antárticos Sterechinus neumayeri e tropicais Lytechinus variegatus e Echinometra lucunter frente ao aquecimento global

> Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Biologia Celular e Tecidual).

São Paulo 2014

PAOLA CRISTINA BRANCO

Avaliação da resposta imune inata de ouriços-do-mar antárticos Sterechinus neumayeri e tropicais Lytechinus variegatus e Echinometra lucunter frente ao aquecimento global

> Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

> Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva

Versão Original

São Paulo 2014 DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Branco, Paola Cristina.

Avaliação da resposta imune inata de ouriços-do-mar antarticos Sterechinus neumayeri tropicais Lytechinus variegatus e Echinometra lucunter frente ao aquecimento global / Paola Cristina Branco. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Histofisiologia evolutiva.

Versão do título para o inglês: Evaluation of innate immune response of antartic sea urchins Sterechinus neumayeri and tropical sea urchins Lytechninus variegatus and Echinometra lucunter in response to global warmi.

1. Fagocitose 2. Aquecimento Global 3. Imunidade 4. Echinodermata 5. Citoesqueleto. I. Silva, Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB027/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Paola Cristina Branco.			
Título da Tese:	Avaliação da resposta imune inata de ouriços-do-mar antarticos Sterechinus neumayeri tropicais Lytechinus variegatus e Echinometra lucunter frente ao aquecimento global .			
Orientador(a):	Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.			
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/////				
	() Aprovado(a) () Reprovado(a)			
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:			
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:			



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil Telefone (155) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438 e-mail: cep⊛icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 24 nas fls. 68do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) José Roberto Machado Cunha da Silva, Coordenador(a) da Linha de pesquisa Análise comparativa da resposta imune inata dos ouriços-do- mar antártico Sterechinus neumayeri e tropical Lytechinus variegatus frente ao aquecimento global do qual participou(aram) o(s) alunos Paola Cristina Branco, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em 02.04.09, com validade de 3 anos.

Prof.Dr.Wothan Tavares de Lima Coordenador CEEA - ICB/USP

São Paulo, 03 de abril de 2009.

Profa. Dra. PATRICIA CASTELUCCI

Secretária CEEA – ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405 e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 449/11 referente ao projeto intitulado: "Análise comparativa da resposta imune inata de ouriços do-mar tropicais Lytechinus variegatus e Echinometra lucunter frente ao aquecimento global" sob a responsabilidade de Paola Cristina Branco, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 03 de abril de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais Mario e Gislene, pelo apoio incondicional e incentivo constante.

Ao meu marido Arthur, por cada minuto passado juntos.

À minha filha Carolina, por ser minha fonte diária de alegria e coragem.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva pela oportunidade, confiança e paciência ao longo destes anos. Obrigada por permitir que eu desenvolvesse minha autonomia e senso crítico, sem dúvida de extrema relevância para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Agradeço também, por estar sempre pronto e disposto a me escutar, pela compreensão e por respeitar minha opinião ainda que muitas vezes houvesse divergências.

À Prof. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos por auxiliar em grande parte dos experimentos desta tese, por ceder espaço em seu laboratório e por ser sempre tão solícita. Obrigada ainda pela motivação e por sempre ter uma palavra certa na hora mais oportuna.

À Prof. Dra. Marília Seelaender pela constante ajuda durante esses anos, por abrir seu laboratório para o uso de equipamentos, pela excelente oportunidade de concluir dois semestres de estágio PAE e pelas valiosas sugestões.

Ao Prof Dr. Marcelo Gonzalez pela oportunidade de integrar a Expedição Antartica Chilena e também por me receber em seu laboratório para a realização de experimentos durante o estágio no exterior.

À equipe de trabalho a campo: Andrews, Débora, Douglas e Renata pela ajuda nos experimentos, pelos excelentes momentos em São Sebastião, pelos "Rochas" e claro pela amizade ao longo dos anos.

Ao pessoal do CEBIMar por toda a ajuda burocrática e de apoio técnico durante as coletas. Agradeço especialmente aos técnicos: Elso, Joseilto, Edu e Joseph (*In memoriam*) e aos secretários Simone e Emerson.

À Karin Hoch e sua aluna Karina pela utilização de equipamentos durante as estadias no CEBIMar.

À Marinha do Brasil, SECIRM e Proantar pelo apoio logístico durante a Expedição Antártica Brasileira.

Aos colegas do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva, aos que já passaram, aos que estão e aos que estão chegando, pelos momentos juntos: Alfonso, Andrews, Camila, Débora, Douglas, Gabriel, Humberto, Iury, Joana, João, Ju Justino, Karina, Leandro (Cabeça), Lígia, Lucianas, Paula, Renan, Renata, Ricardo, Tânia, Yoel.

Aos Profs. Vicente Gomes, Maria Inês Borella e Marília Seelaender pelas contribuições durante o exame de qualificação do mestrado e por sugerirem minha passagem para o doutorado direto.

Aos Profs Pedro Ismael Silva Jr, Márcio R. Custódio e Alison Colqhoun pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação do doutorado.

Ao Adam Arai por compartilhar comigo tantas questões da pós graduação e de fora dela, pelos comentários pertinentes e ultra sinceros, por dividir protocolos e por sempre ouvir todos os tipos de desabafos, e claro, pelas inúmeras risadas.

À Cristina Menegocci pela amizade desde a infância.

À Débora Figueiredo pela ajuda em TODOS os momentos, por me auxiliar, e muito, durante a minha licença maternidade, pela paciência, por ser um excelente exemplo, por abrir meus olhos muitas vezes e por estar sempre disposta a ajudar.

Ao Douglas Amaral pela ajuda com os experimentos de GTPases, pelo excesso de sinceridade e por sempre apresentar uma visão mais realista e simples dos meus problemas.

À Eloiza de Rezende por dividir comigo medos e esperanças.

Ao Felipe Souza por transmitir tanta paz, pelas nossas conversas e pelo encorajamento de sempre.

Ao Leandro (Cabeça) Pressinotti pela ajuda durante a Expedição Antártica Brasileira, por auxiliar na análise estatística e por sempre me ouvir.

À Maíra Estanislau pela ajuda com a microscopia *time lapse*, pelas nossas conversas e por sempre ter uma palavra de otimismo.

À Maraysa Melo, Magá, por sempre estar do meu lado, pelas conversas, por vibrar com as conquistas, me apoiar sempre com uma palavra amiga e também por me incentivar a gostar de biologia do desenvolvimento.

À Renata Stecca pela companhia, pela disposição e ajuda de sempre.

À Tatiane Kanno pelas risadas, pelos conselhos, dicas e por toda companhia. Também por passar horas da madrugada arrumando "pontinhos".

Aos secretários de Pós Graduação Celiana, Regina e Paulo por toda a ajuda nos trâmites e burocracia. Também às secretárias Elô e Ana Lúcia pelo apoio.

Às técnicas de laboratório Emília, Marley e Gabriella pelo apoio técnico.

Às Profs Edna Kimura, Patricia Gama e Telma Zorn pela utilização do microscópio de fluorescência.

À Prof Irene Yan pela alíquota de solução de bloqueio utilizada e pelas ricas aulas de Biologia do Desenvolvimento

Ao Prof Dr. Niels Olsen por abrir seu laboratório para a realização dos experimentos com citometria de fluxo e ao seu aluno Tárcio Braga pelo apoio com a interpretação dos dados, pela amizade e pelas risadas.

Ao Gaspar Lima e ao Edson Oliveira pelo apoio no preparo e obtenção de imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Às alunas da Prof Marinilce por me receberem em seu laboratório e ajudarem sempre: Ana Flávia, Cilene, Juliana, Kelly, Maíra e Mariana.

Ao Prof. Dr. Fábio Siviero pela oportunidade de participar do I Curso de Verão e por permitir que eu integrasse a equipe de autores do nosso livro, pelas nossas conversas e por ter sempre uma palavra de esperança.

À Prof. Dra. Bárbara Mangiaterra pela orientação durante minha primeira IC e por me apresentar ao Prof. José Roberto.

Ao Prof. Dr. João Carlos Shimada Borges pela ajuda e confiança enquanto eu era uma aluna de IC, por me apresentar ao Laboratório de Histofisiologia Evolutiva e pela ajuda durante as fases iniciais da Pós Graduação.

Ao Prof Jarbas Bauer, "tio Bauer" pelas ricas e inspiradoras aulas de Histologia e por transmitir sua paixão pela docência.

Aos professores do Depto. de Biologia Celular e do Desenvolvimento pelas aulas, contribuições e ajuda ao longo destes anos. Aos funcionários da biblioteca pela revisão desta tese. Aos funcionários do ICB pela ajuda em alguma parte deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Química de Proteínas: Katie, Thiago, Eliza, Thais, Soraia e Prof Pedro pela ajuda e disposição.

À minha família, por ser meu alicerce e por estar comigo em todos os momentos – nos bons, nos ruins e nos desesperadores. Aos meus pais Mario e Gislene por terem me motivado constantemente, por terem acreditado em mim e por me fazerem acreditar que a educação é a ferramenta mais eficaz para transformar um indivíduo. Ao meu marido Arthur por estar sempre ao meu lado, por ter sempre uma palavra amiga, por me fazer ver a realidade sob outra perspectiva e por me fazer acreditar que tudo daria certo. À minha filha Carolina por ter transformado meus dias nos melhores dias da minha vida, por proporcionar a felicidade mais pura em cada sorriso. À minha avó Arlete por torcer sempre por mim, mesmo sem compreender exatamente o que faço.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (2011/06044-4). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

"Um dos paradoxos dolorosos do nosso tempo reside no fato de serem os estúpidos os que têm a certeza, enquanto os que possuem imaginação e inteligência se debatem em dúvidas e indecisões."

Bertrand Russell

RESUMO

Branco PC. Avaliação da resposta imune inata de ouriços-do-mar antárticos *Sterechinus neumayeri* e tropicais *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* frente ao aquecimento global. [tese (doutorado em biologia celular e tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2014.

O aquecimento global é uma realidade e seus efeitos são bastante estudados atualmente. No entanto, pouca atenção tem-se dado para as alterações que ocorrem com invertebrados marinhos em decorrência dessa alteração climática. Sabe-se que uma das alterações que ocorrem em consequência do aumento da temperatura da água do mar, é o aumento do aparecimento de doenças no ambiente marinho. Para tanto, é importante que se avalie sua resposta imune inata frente a esse fator estressor. Os ouriços-do-mar foram escolhidos como modelo por serem considerados bons biondicadores ambientais, além de serem filogeneticamente próximos aos cordados, partilhando com estes, amplo repertório de genes e receptores envolvidos no sistema imune inato. O presente trabalho avaliou a resposta imune inata de ouriços-do-mar antárticos (S. neumayeri) e tropicais (L. variegatus e E. lucunter) frente ao estresse térmico por diferentes temperaturas e períodos de exposição. No que se refere aos ouriços-do-mar tropicais, foram estudadas duas espécies, uma que habita regiões menos submetidas a variações de marés (L. variegatus) e outra constantemente exposta a variações de maré (E. lucunter). Constatou-se uma diferença entre a resposta ao estresse térmico nas três espécies estudadas. A espécie antártica demonstrou alterações mais significativas de aumento na porcentagem de esferulócitos vermelhos (EV) e da capacidade fagocítica no período agudo de exposição (24h) quando submetidos a temperaturas intermediárias. Por outro lado, a espécie tropical E. lucunter apresentou alteração somente na porcentagem de EV no período de exposição crônico (7 e 14 dias) a temperaturas altas, enquanto que L. variegatus apresentou alteração neste tipo celular em todas as temperaturas experimentais e períodos avaliados, além de uma importante redução da capacidade fagocítica nos mesmos períodos que foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura. Buscando compreender tais diferenças entre animais que habitam uma mesma região, verificou-se que a espécie L. variegatus apresentou alteração na adesão e espraiamento celular, no citoesqueleto de actina dos amebócitos fagocíticos (AF), na migração celular sem adição de substância quimiotática e na resposta quimiotática frente a leveduras S. cerevisiae, além de diminuição do estresse oxidativo em elevadas temperaturas. Constatou-se também que os AF desta espécie apresentaram alterações morfométricas importantes, como diminuição na circunferência celular e alteração na área de espraiamento. Por outro lado, a espécie E. lucunter não apresentou alteração em nenhum parâmetro analisado. Conclui-se, assim, que o estresse térmico atua de maneiras diferentes em espécies polares e tropicais de ouriços-domar. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais a espécie E. lucunter apresenta maior termotolerância em comparação à espécie L. variegatus permanecem imcompreendidos e merecem ser estudados.

Palavras-chave: Aquecimento global. Ouriço-do-mar. Imunidade inata. Estresse térmico. Fagocitose.

ABSTRACT

Branco PC. Evaluation of innate imune response of Antarctic *Sterechinus neumayeri* and tropical sea urchins *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* in response to global warming. [PhD thesis (Cell Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2014.

Global warming is a reality and its effects are widely studied today. However, little attention has been given to the changes that occur to marine invertebrates due to this climate change. It is known that one of the changes that occur as a result of the seawater temperature rise is the increased occurrence of diseases in the marine environment. Therefore, it is important to evaluate the innate immune response against this stressor. The sea urchins were chosen as a model for being considered good environmental bioindicators, and are phylogenetically close to chordates, sharing with them large repertoire of genes and receptors involved in the innate immune system. This study evaluated the innate immune response of Antarctic (S. neumayeri) and tropical (L. variegatus and E. lucunter) sea urchins against thermal stress by different temperatures and exposure periods. With regard to tropical sea urchins, two species, one that inhabits sites less subject to tidal variations (L. variegatus) and the other constantly exposed to tidal oscilations (E. lucunter) were studied. A difference between the response to thermal stress in the three species was observed. The Antarctic species showed more significant changes regarding increase of the percentage of red spherule cells and phagocytic capacity in acute exposure period (24 h) when subjected to mild temperatures. On the other hand, tropical species E. lucunter presented only change in the percentage of red spherule cells during chronic exposure (7 and 14 days) at extreme temperatures, while L. variegatus showed a change in this cell type in all experimental temperatures and exposure periods evaluated, as well as a significant reduction in phagocytic capacity in the same periods that was directly proportional to the temperature increase. Trying to understand the differences between animals that inhabit the same region, it was found that the species *L. variegatus* showed changes in cell adhesion and spreading, actin cytoskeleton of phagocytic amoebocytes, cell migration without the addition of chemotactic substance and chemotactic response against yeasts S. cerevisiae, besides a reduction of oxidative stress at elevated temperatures. It was also found that the phagocytic amoebocyte of this species showed significant morphological changes, such as reduction in cell circunference and change in the area of spreading. On the other hand, the species E. lucunter presented no change in any parameter analyzed. Thus, it is concluded that the thermal stress acts differently in polar and tropical species of sea urchins. However, the molecular mechanisms by which the species E. lucunter shows higher thermotolerance compared to the species L. variegatus remain obscure and deserve to be studied

Keywords: Global warming. Sea urchin. Innate immunity. Thermal stress. Phagocytosis.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Histofisiologia Evolutiva do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2011/15612-6).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AF Amebócito Fagocítico
- BSA Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)
- BIR Baculovirus inhibitor domain (Domínio inibitório de Baculovirus)
- CARD Caspase recruitment domain (Domínio recrutador de caspase)
- CF Capacidade Fagocítica
- CG Capacidade Germicida
- CGLC Capacidade Germicida do Líquido Celomático
- CV Célula Vibrátil
- EI Esferulócito Incolor
- EROs Espécies Reativas de Oxigênio
- EV Esferulócito Vermelho
- GAP GTPase activating protein (Proteína ativadora de GTPase)
- GDI guanine nucleotide dissociation inhibitors (inibidores de dissociação de nucleotídeos de guanina)
- GDP guanosine diphosphate (Guanina difosfato)
- GEF *guanine nucleotide exchange factor* (fatores de troca de nucleotideo de guanina)
- GTP guanosine triphosphate (Guanina trifosfato)
- HMGB1 High-mobility group box 1 protein
- HSP Heat Shock Proteins (Proteínas do choque térmico)
- IF Índice Fagocítico
- IPCC Intergovernamental Panel on Climatic Change (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas
- IRF IFN regulatory factors (Fatores reguladores de interferon)
- LRR Leucine rich repeat (Repetições ricas em leucina)
- MAPKs *Mitogen-activated protein kinases* (proteinas-quinase ativadas por mitógeno)
- MEM Marine Essential Medium (Meio marinho essencial)
- mDIA Diaphanous-related formin-1

MyD88 – Myeloid differentiation response gene 88 (Gene 88 de resposta de diferenciação mielóide)

NEAA - Non-essential amino acids (Amonoácidos não essenciais)

NF kB – *Nuclear fator kB* (Fator nuclear kappa B)

NGS - Normal Goat Serum (Soro normal de cabra)

NLR - Nod-Like Receptors (Receptores do tipo Nod)

NOD - Nucleotide binding oligomerization domain (Domínio de oligomerização

p140Sra-1 – Specific Rac 1 associated proteins (Proteínas específicas associadas a Rac1)

PAMP – *Pathogen-associated molecular patterns* (Padrões moleculares associados a patógenos)

PAK – p21-activated kinase (Quinase ativada por p21)

PBS – Phosphate Buffered Saline (Solução salina tamponada com fosfato)

PBST – PBS contendo 0,1% de Triton X-100

PI(4,5)P2 – Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato)

POR-1 – Partner of Rac (Parceiro de Rac)

PRR- Pattern-recognition receptors (Receptores de reconhecimento de padrões)

ROCK – Rho kinase (quinase de Rho)

SOD – Superóxido dismutase

SFB – Soro Fetal Bovino

SRCR – Scavenger Receptor Cystein-Rich (Receptores do tipo Scavenger ricos em cisteína)

TCP-1 – *T-complex protein 1* (Complexo polipetídeo T1)

TIR – *Toll/IL1-receptor* (Toll/recetor IL1)

TLR - Toll-Like Receptor (Receptor do tipo Toll)

TRAM – *TRIF-related adaptor molecule* (Molécula adaptadora relacionada a TRIF)

WAVE – WASP-family verprolin-homologous protein (Proteína homóloga a verprolina da família WASP)

WASP - Wiskott-Aldrich syndrome protein (Proteína da syndrome Wiskott-Aldrich)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Filogenia do ouriço-do-mar32
Figura 2 – Mecanismo de funcionamento básico das RhoGTPases
Figura 3 – Processo simplificado de migração celular
Figura 4 – Exemplares de ouriços-do-mar Sterechinus neumaueri50
Figura 5 – Mapa da região de coleta dos animais antárticos51
Figura 6 – Exemplares de ouriços-do-mar tropicais53
Figura 7 – Mapa da região de coleta dos animais tropicais
Figura 8 – Delineamento Experimental55
Figura 9 – Registros de temperaturas da água do mar no ano de 2009 nas
proximidades do ponto de coleta em São Sebastião, SP
Figura 10 – Celomócitos de ouriços-do-mar a fresco sob microscopia de fase.
Figura 11 – Proporção dos tipos celulares em ouriços-do-mar antárticos
Sterechinus neumayeri76
Figura 12 – Proporção dos tipos celulares em ouriços-do-mar tropicais
Lytechinus variegatu77
Figura 13 – Proporção dos tipos celulares em ouriços-do-mar antárticos
Echinometra lucunter
Figura 14 – Fagocitose in vitro de Amebócito Fagocitico (AF) de ouriços-do-
mar80
Figura 15 – Capacidade Fagocítica (CF) de S. neumayeri82
Figura 16 – Índice Fagocítico (IF) de <i>S. neumayeri</i> 83
Figura 17 – Capacidade Germicida (CG) de <i>S. neumayeri</i> 84
Figura 18 – Correlação entre Capacidade Fagocítica e porcentagem de
esferulócitos vermelhos em ouriço-do-mar <i>S. neumayeri</i>
Figura 19 – Capacidade Fagocítica (CF) de <i>L. variegatus</i>
Figura 20 – Índice Fagocítico (IF) de <i>L. variegatus</i> 88
Figura 21 – Capacidade germicida de <i>L. variegatus</i>
Figura 22 – Capacidade Fagocítica (CF) de <i>E.lucunter</i>

Figura 23 – Índice Fagocítico (IF) de <i>E.lucunter</i> 92
Figura 24 – Capacidade germicida de <i>E. lucunter</i> 93
Figura 25 – Capacidade Germicida do líquido Celomático de S. neumayeri94
Figura 26 – Capacidade Germicida do líquido Celomático de <i>L. variegatus.</i> 95
Figura 27 – Capacidade Germicida do líquido Celomático de <i>E. lucunter.</i> 96
Figura 29 – Porcentagem de adesão celular em ouriços-do-mar S. neumayeri.
Figura 29 – Porcentagem de espraiamento celular em ouriços-do-mar S.
neumayeri99
Figura 30 – Tempo inicial de adesão celular em ouriços-do-mar <i>L. variegatus</i>
Figure 21 — Descentegem de edeção colular em ourises de mor / veriegetus
rigura 31 – Porcentagem de adesao celular em ouriços-do-mar L. variegatus
Figura 32 – Tempo inicial de espralamento celular em ouriços-do-mar <i>L</i> .
Variegatus
Figura 33 – Porcentagem de espraiamento celular em ouriços-do-mar <i>L.</i>
Variegatus.
Figura 34 – Porcentagem de adesao celular em ouriços-do-mar <i>E. lucunter</i> .104
Figura 35 – Porcentagem de espraiamento celular em ouriços-do-mar E.
Figura 36 – Eletromicrografia de amebocito fagocitico de ouriço-do-mar 107
Figura 37 – Eletromicrografia de esferulocito incolor de ouriço-do-mar108
Figura 38 – Eletromicrografia de esferulócito vermelho de ouriço-do-mar109
Figura 39 – Velocidade média em µm/h da migração de amebócitos fagocíticos
de ouriços-do-mar <i>L. variegatus</i> 112
Figura 40 – Distância percorrida em µm por amebócitos fagocíticos de ouriços-
do-mar <i>L. variegatus</i> 113
Figura 41 – Direcionalidade de amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar L.
variegatus114
Figura 42 – Velocidade média em µm/h da migração de amebócitos fagocíticos
de ouriços-do-mar <i>E. lucunter</i> 115
Figura 43 – Distância percorrida em µm por amebócitos fagocíticos de ouriços-
do-mar <i>E. lucunter</i> 116

Figura 44 – Direcionalidade de amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar E.
lucunter117
Figura 45 – Migração celular em câmara transwell de AF de ouriços-do-mar <i>L.</i>
variegatus118
Figura 46 – Migração celular em câmara transwell de AF de ouriços-do-mar <i>E.</i>
lucunter119
Figura 47 – Citoesqueleto de actina em ouriços-do-mar tropicais121
Figura 48 – Expressão de integrina em amebócitos fagocíticos de ouriços-do-
mar L. variegatus122
Figura 49 – Média da Intensidade de fluorescência da subunidade de integrina
β1 em ouriços-do-mar tropicais123
Figura 50 – Expressão de RhoA em amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar
tropicais124
Figura 51 – Expressão de Rac1 em amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar
tropicais124
Figura 52 – Produção de ânion superóxido na espécie <i>L. variegatus</i> 125
Figura 49 – Produção de ânion superóxido na espécie <i>E. lucunter</i> 126
Figura 50 – Produção de SOD em <i>L. variegatus</i> 127
Figura 51 – Produção de SOD em <i>E. lucunter</i> 128

LISTA DE TABELAS

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Mudanças Climáticas	27
2.2 Ouriços-do-mar	31
2.3 Imunidade Inata	34
2.3.1 Células Imunes	35
2.3.2 Migração celular	37
2.3.3 Reconhecimento	41
2.3.4 Adesão	43
2.3.5 Fagocitose	44
3 OBJETIVOS	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Coleta dos animais	50
4.2 Transporte dos animais	53
4.3 Manutenção dos animais	53
4.4 Delineamento experimental	54
4.5 Variação térmica da água	52
4.6 Observação dos animais	58
4.7 Coleta do líquido celomático	58
4.8 Classificação dos celomócitos	58
4.9 Contagem relativa de celomócitos	59
4.10 Teste de viabilidade celular	59
4.11 Contagem de leveduras Saccharomyces cerevisiae	60
4.12 Ensaios de fagocitose in vitro	60
4.13 Teste de viabilidade fúngica	61
4.14 Índices fagociticos	61
4.15 Determinação da Capacidade Germicida do líquido celomático	62
4.16 Determinação da capacidade de adesão celular	62
4.17 Determinação da capacidade de espraiamento celular	62
4.18 Análise ultraestrutural dos celomócitos	63
4.19 Avaliação morfométrica dos amebócitos fagocíticos	64
4.20 Ensaio de migração celular – time lapse	64
4.21 Ensaio de migração celular frente a gradiente quimiotático - transwell	65
4.22 Imunocitoquímica para actina	66
4.23 Análise da expressão de integrina β1 por citometria de fluxo	67
4.24 Análise da expressão das GTPases Rho A e Rac 1 por citometria de fluxo	67
4.25 Produção de ânion superóxido	68
4.26 Expressão da enzima Superóxido Dismutase (SOD)	69
5 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	69
6 RESULTADOS	.70
6.1 Observação dos animais	70
6.2 Contagem diferencial de celomócitos	71
6.3 Teste de viabilidade celular	79
6.4 Fagocitose in vitro	79
6.5 Capacidade Germicida do líquido celomático	93

6.6 Capacidade de adesão e espraiamento celular	97
6.7 Análise ultraestrutural dos celomócitos	106
6.8 Avaliação morfométrica dos amebócitos fagocíticos	110
6.9 Ensaio de migração celular – time lapse	
6.10 Ensaio de migração celular frente a gradiente guimiotático – transwell	118
6 11 Imunocitoquímica para actina	120
6 12 Análise da expressão de integrina 81 nor citometria de fluxo	120
6.12 Análise da expressão des CTDasos Pho A o Pac 1 por citomotria do	fluxo
0. 13 Analise da expressão das GTPases Rho A e Rac T por cilometria de	101
611 Dradução do ânian ounarávido	124
0.14 Produção de antion superoxido	
5.15 Produção da enzima Superoxido Dismutase (SOD)	
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	139
REFERENCIAS	140
ANEXO 1 – TRABALHOS PUBLICADOS	154
A Cellular biomarkers to elucidate global warming effects on Antarctic set	ea urchin
Sterechinus neumayeri	
B The impact of rising sea temperature on innate immune parameter	ers in the
tropical subtidal sea urchin Lytechinus variegatus and the intertidal s	sea urchin
Echinometra lucunter	
C New insights into innate immune system of sea urchin: coelome	ocytes as
biosensors for environmental stress	
ANEXO 2 – TRABALHOS PUBLICADOS EM COLABORAÇÃO	189
A Effects of trophic levels (chlorophyll and phosphorous content) in thre	e different
water bodies (urban lake, reservoir and aquaculture facility) on gill more	hology of
Nile tilapia (Oreochromis niloticus)	nelegy er
B Energetic metabolic differences between tropical <i>Lytechinus variegatus</i>	and polar
Sterechinus neumaveri echinoderms	and polar
C Intranuclear crystalloids of Antarctic sea urching as a biomark	er for oil
contamination	
	•••••

1 INTRODUÇÃO

O aumento da temperatura no planeta, em decorrência do aquecimento global, está mais evidente nos últimos anos (Bernstein et al., 2007). Embora receba o nome de aquecimento global, o último relatório do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) demonstra que o aquecimento ocorre de forma desigual como, por exemplo, nas regiões polares (IPCC, 2007) onde o aquecimento é mais intenso.

Embora o número de trabalhos que estudem os efeitos do aquecimento global tenha aumentado nos últimos anos, pouca atenção tem sido dada para os impactos que acometem os oceanos, apesar de ocuparem 71% da superfície do planeta.

Os oceanos são atualmente considerados os grandes responsáveis pela manutenção da temperatura do planeta, já que absorvem aproximadamente um terço de todo gás carbônico produzido (Rahmstorf et al., 2007). Diante disso, impactos oceânicos causados por ações antropogênicas aparentam estar provocando alterações ecológicas irreversíveis nas comunidades marinhas. Dentre as consequências para o ambiente marinho pode-se enfatizar o maior aparecimento de doenças neste ambiente (Hoegh-Guldberg, Bruno, 2010).

Dentre os organismos desta comunidade marinha, os ouriços-do-mar foram escolhidos por serem animais com uma proximidade filogenética evidente aos cordados (Romer, Parsons, 1985), possuindo uma enorme diversidade de genes imunes homólogos aos dos vertebrados (Hibino et al., 2006). Além disso, dada sua limitada capacidade de locomoção, os equinoides são considerados bioindicadores ambientais (Kobayashi, Okamura, 2004).

Considerando que organismos marinhos possam estar mais vulneráveis ao aparecimento de doenças, o estudo da resposta imune frente ao aumento da temperatura se faz necessário com o intuito de avaliar como comunidades marinhas responderiam imunologicamente frente a uma condição abiótica adversa.

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa do organismo e é comum a todos os animais estudados até o momento (Bols et al., 2001). Composta por resposta celular e humoral, a imunidade inata compreende o reconhecimento de substâncias estranhas ao organismo e a elaboração de uma resposta de defesa frente a essas substâncias (Ellis, 2001).

Dentre as respostas do sistema imune, a fagocitose é um processo celular primitivo e conservado na escala filogenética (Greenberg, Grinstein, 2006). São

etapas da fagocitose: 1. Migração das células fagocíticas para o foco inflamatório e/ou infeccioso, 2. Reconhecimento e adesão à partícula estranha, 3. Remodelamento do citoesqueleto para promover a ingestão da partícula, 4.Internalização da partícula em estrutura denominada fagossoma, 5. Fusão do fagossoma com lisossoma para promover a digestão da partícula fagocitada, 6. Exocitose do material não digerido (Flannagan et al., 2012).

Dessa maneira, com o intuito de avaliar a resposta de ouriços-do-mar frente ao estresse térmico em diferentes habitats, nos pareceu oportuno estudar organismos polares da espécie *Sterechinus neumayeri* e tropicais das espécies *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter*. Ambas as espécies tropicais de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* e *Lytechinus variegatus* habitam a costa brasileira, são encontradas em São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo. No entanto, a espécie *L. varigatus* habita regiões menos sujeitas a variações de maré, enquanto que a espécie *E. lucunter* habita regiões próximas ao costão rochoso frequentemente submetidas a variações de maré. Essa variação de habitat faz com que a espécie *E. lucunter* seja encontrada em poças de água durante a baixa maré, consequentemente esses animais são constantemente submetidos a uma oscilação térmica maior que os da espécie *L. variegatus*.

A avaliação da resposta imune inata comparativa de ouriços-do-mar tropicais e antárticos é de grande importância para avaliar a adaptação destas espécies frente ao aumento da temperatura, bem como prever possíveis alterações que tais espécies possam apresentar em decorrência da variação térmica. Conhecer os efeitos do aquecimento global sobre os mecanismos de resistência natural a infecções é fundamental para o estabelecimento de modelos de impacto ambiental que poderão auxiliar a prever a dinâmica populacional das espécies estudadas e suas relações ecológicas com os ecossistemas locais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mudanças climáticas

As alterações climáticas estão se acelerando a um passo nunca antes observado (Steffensen et al., 2008). A temperatura terrestre está mais alta agora que nos últimos 1.200 anos (Esper et al., 2002) e os níveis atmosféricos de CO_2 estão maiores que nos últimos 125.000 anos (Siegenthaler et al., 2005). Embora seja o principal, o CO_2 não é o único gás que contribui para o aquecimento do planeta; também há a participação do metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O), hidrofluorcarboneto (HFC), perfluorcarboneto (PFC) e hexafluoreto de enxofre (SF₆) (Johansson et al., 2006).

O estudo da temperatura iniciou-se com o trabalho de Fourier¹ (1827) apud Fleming (1999) que avaliou pela primeira vez a temperatura terrestre, demonstrando que a atmosfera funciona como os vidros de uma estufa em que há a passagem dos raios solares e o impedimento da saída de calor, retendo-o e contribuindo para a manutenção da temperatura global.

Dando continuidade aos estudos de temperatura terrestre, Arrhenius (1896) foi pioneiro ao demonstrar a contribuição do dióxido de carbono (CO₂) para o aumento da temperatura e foi o primeiro a especular se variações atmosféricas na concentração de dióxido de carbono contribuiriam para variações climáticas a longo prazo. Ademais, seu trabalho foi o primeiro a sugerir que combustíveis fósseis são uma fonte potente de CO₂, o que permite inferir uma possível influência humana sobre as mudanças climáticas.

Os estudos envolvendo a temática do aquecimento global, suas causas e consequências se intensificaram após a criação do IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) em 1988. O IPCC é a mais alta autoridade científica sobre aquecimento global. O painel costuma lançar relatórios a intervalos regulares, que causam grande impacto em todo o mundo. Esses relatórios reportam informações científicas, técnicas e sócio-econômicas a fim de pro¹ver explanações sobre a

¹ Fourier J (1824) Remarques générales sur les temperatures du globe terrestre et des espaces planetaires.

mudança climática induzida pelo ser humano, os consequentes impactos de tais mudanças, além de tópicos para mitigação e adaptação a esses fenômenos. O último relatório publicado data de 2007 e apresenta quatro volumes (Bernstein et al., 2007).

A previsão, de acordo com modelagem matemática, é que a temperatura média global pode aumentar 2°C até o final deste século (Meinshausen et al., 2009). Ainda que o Painel de Convenções de Mudanças Climáticas das Nações Unidas sugira que a temperatura média global não deve exceder 2 °C, Kaplan e New (2006) demonstraram que mesmo esse aumento pode trazer consequências graves para as regiões polares. Os autores demonstram através de modelos matemáticos que esse aumento de temperatura global corresponderia a um aumento na temperatura dos polos da ordem de 3,2 a 6,6 °C e isso contribuiria para a modificação drástica na vegetação local, além de alteração nas correntes oceânicas e diminuição das geleiras. Ainda utilizando modelos matemáticos para predizer as consequências do aumento de temperatura em 2 °C, May (2012) demonstrou que as regiões mais afetadas seriam Alasca e Groelândia, enquanto que a menos afetada seria a América do Sul.

Embora a grande maioria dos trabalhos mostre o aumento da temperatura global em determinados períodos, há relatos de áreas que sofrem um intenso aquecimento regional, que muitas vezes supera o aquecimento global registrado. É o que ocorre com a Península Antártica, em que se registrou um aumento local da temperatura média anual de 1,5 °C em comparação com o aquecimento global de 0,5 °C no mesmo período (Vaughan et al., 2003). Foi demonstrado que a Península Antártica está entre as regiões de aquecimento mais acelerado do planeta (Hansen et al., 1999; Meredith, King, 2005)

Adicionalmente, os oceanos polares parecem ser os mais afetados com as mudanças climáticas; nesses oceanos a temperatura tem sofrido o dobro de alterações quando comparadas com as observadas na média global (Hansen et al., 2006).

Os oceanos cobrem 71% do planeta Terra, foram reponsáveis pela criação da vida em nosso planeta e até hoje representam uma enorme importância por regular o clima do planeta. Há uma clara evidência de que os oceanos estão aquecendo ao longo dos anos (Levitus et al., 2000; Trenberth, 2010). Eles absorvem

aproximadamente um terço do dióxido de carbono produzido pelas atividades humanas. Em decorrência disso, os oceanos sofreram expansão térmica e também receberam um alto influxo de água doce oriunda do derretimento de glaciares e plataformas de gelo; essas alterações somadas contribuíram para o aumento do nível do mar (Rahmstorf et al., 2007).

Embora tenha havido um aumento no número de publicações referentes a temática do aquecimento global, os artigos que se dedicam a demonstrar alterações causadas pelas mudanças climáticas nos ecossistemas marinhos perfazem um total de menos de 5% do total de publicações do tema.

Os ecossistemas marinhos desempenham um papel ecológico central e muito importante para o planeta, porém o conhecimento de como o aquecimento global está os afetando é muito escasso. Os impactos oceânicos causados por ações antropogênicas estão provocando alterações ecológicas irreversíveis. Esses impactos incluem diminuição na produtividade do oceano, alteração nas cadeias alimentares marinhas, redução na abundância de espécies e o maior aparecimento de doenças no ambiente marinho (Hoegh-Guldberg, Bruno, 2010).

Uma das consequências do aquecimento global é o aumento da ocorrência de doenças no ambiente marinho (Harvell et al., 1999; Harvell et al., 2009; Lafferty et al., 2004; Mydlarz et al., 2006). Foi demonstrado que o aquecimento global está relacionado com o surgimento de doenças de forma direta com a elevação da temperatura da água dos oceanos e indireta com a maior incidência dos raios ultravioletas que modifica a salinidade da água e contribui para a proliferação de microrganismos (Harvell et al., 2002). Além disso, a maior ocorrência de doenças está relacionada com o fato de os microrganismos terem maior taxa de crescimento e multiplicação a temperaturas mais elevadas (Brock et al., 1994). Outros fatores incluem expansão da taxa de patógenos em resposta ao aquecimento marinho, aumento da suscetibilidade do hospedeiro como resultado do maior estresse e também a maior expansão dos vetores (Harvell et al., 2009).

Mortalidades em massa resultantes da ação de microrganismos marinhos começaram a ser relatadas desde os anos 70. São conhecidas mortalidades em massa em ouriços-do-mar das espécies *Diadema antillarum* nos mares do caribe e de *Strongylocentrotus droebachiensis* na costa da Nova Escócia entre 1980 e 1983. Foi relatada a ocorrência de doenças inespecíficas em *Paracentrotus lividus,*

Strongylocentrotus franciscanus, e Strongylocentrotus purpuratus. Acredita-se que a diminuição dos predadores de ouriços, pela ação de pescadores, provocou o aumento da densidade populacional dos mesmos, propiciando a ocorrência de surtos epizoóticos (Lafferty et al., 2004).

A mortalidade de ouriços-do-mar tem sido correlacionada ao estresse ambiental decorrente de fatores abióticos, como a variação térmica da água (Ebert et al., 1999; Maes, Jangoux, 1984; Tajima et al., 1999). A espécie *Lytechinus variegatus* pode sobreviver a no máximo 36°C por um período de apenas 30 minutos conforme reportado por Glynn (1968).

Frequentemente, o intervalo de tolerância térmica é diferente para a mesma espécie no verão e no inverno. Na região do canal de São Sebastião (Brasil), durante a primavera e o início do verão (Outubro/Janeiro) foram detectadas águas inferiores com temperaturas que chegaram a 15 °C, muito embora a temperatura de superfície da água tenha chegado a 29 °C. Durante o outono e inverno (Maio/Agosto) a descontinuidade na temperatura é pouco evidente a uma faixa de profundidade de 4 a 5 metros (Giordano, 1986).

Por outro lado, os organismos antárticos são considerados estenotermais devido à estabilidade do ambiente ao longo da evolução (Peck et al., 2004); por essa razão, os invertebrados marinhos polares são particularmente sensíveis a alterações na temperatura da água do mar. Ericson e colaboradores (2012) demonstraram que ouriços-do-mar da espécie *Sterechinus neumayeri* expostos à temperatura de 3°C apresentam uma redução na porcentagem de fertilização em 11% comparados com a temperatura ambiente de 0°C.

Redução na taxa de fertilização em altas temperaturas também foi evidenciada para a espécie de ouriço-do-mar *Heliocidaris erythrogramma* (Newton, 2009). Runcie e colaboradores (2012) demonstraram para a espécie *Strongylocentrotus purpuratus* que o aumento na temperatura causou redução da porcentagem de fertilização além de alterações na morfologia embrionária.

A temperatura desempenha um papel central e vital nos processos biológicos de qualquer organismo vivo. É capaz de determinar a taxa de reações enzimáticas, transporte via membrana celular, difusão de substâncias. O aumento moderado na temperatura é capaz de provocar alterações nas taxas metabólicas que irão determinar diversos processos biológicos fundamentais, entre eles taxa de

crescimento e reprodução. Os organismos são capazes de se adaptarem em determinada faixa de temperatura. Temperaturas diferentes dessa faixa provocam maior risco de morte dos animais com consequente declínio da população, podendo levar a extinção da espécie em questão (Hoegh-Guldberg, Bruno, 2010).

Os ouriços-do-mar possuam um intervalo de tolerância térmica sazonal natural, portanto, modificações bruscas da temperatura podem provocar alterações em seus mecanismos de resistência natural à infecção e consequentemente em seu estado sanitário, o que justifica o estudo do sistema imune frente a estresses ambientais adversos.

2.2 Ouriços-do-mar

Os ouriços-do-mar estão inseridos no Filo Echinodermata, que é um grande grupo de invertebrados, com cerca de 6500 espécies descritas e características peculiares e próprias. A palavra Echinodermata vem do grego *echinos* (espinho) *dermata* (tegumento, pele), ou seja, pele coberta por espinhos. Dentre suas características principais destaca-se o esqueleto de origem mesodérmica, formado por placas porosas de calcita. Quando adultos, possuem simetria radial e pentamérica. Possuem também um sistema vascular aquático composto por estruturas complexas internas que contêm líquido em seu interior. Essas estruturas apresentam extensões que emergem do esqueleto dos animais e atingem o ambiente externo sob a forma de pés ambulacrários, que têm por função auxiliar os animais deste filo na locomoção, trocas gasosas, alimentação e respiração. Outras características desse filo são o sistema circulatório aberto, sistema nervoso simples desprovido de um sistema nervoso centralizado e reprodução sexuada. (Smith, 1981; Hendler et al., 1995).

O Filo Echinodermata está distribuído em cinco classes: Crinoidea (crinóides), Asteroidea (estrelas-do-mar), Ophiuroidea (ofiuróides), Echinoidea (ouriços-do-mar e bolachas-do-mar) e Holothuroidea (pepinos-do-mar).

Sua classificação sofreu diversas alterações ao longo da história e somente com o avanço das técnicas para o estudo da embriogênese em invertebrados é que Huxley (1875) propôs o grupo Deuterostomata (região da boca é formada depois da região anal). Posteriormente, esse grupo passou a englobar quatro Filos: Chaetognatha, Echinodermata, Hemichordata e Chordata (Cuénot, 1948). Esta classificação evidenciou a proximidade filogenética dos equinodermos com os cordados (vertebrados) (Romer, Parsons, 1985) (Figura 1).



Figura 1. Filogenia do ouriço-do-mar. Os ouriços-do-mar pertencem ao grupo Deuterostomia, grupo este que também se encontram os cordados, evidenciando dessa forma a proximidade filogenética entre ambos. Retirado de Sea Urchin Genome Sequencing Consortium 2006.

Os Echinodermatas são exclusivamente marinhos, tipicamente bentônicos, grande maioria dos exemplares é séssil ou possui capacidade de locomoção bastante limitada. Apresentam exemplares carnívoros, herbívoros e detritívoros e sua distribuição geográfica é bem ampla. Diante disso, torna-se indubitável seu papel ecológico (Pearse, 2006). Dadas suas características, os ouriços-do-mar são considerados excelentes bioindicadores (Coteur et al., 2003; Kobayashi, Okamura, 2004).

A proximidade filogenética justifica a ampla quantidade de estudos que modelo utilizam ouriços-do-mar como biológico, fato este que motivou pesquisadores a caracterizar o genoma de uma espécie de ouriços-do-mar (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006). A partir daí diversas famílias de genes com funções imunes foram identificadas (Hibino et al., 2006; Rast et al., 2006). Estudos subsequentes reforçaram a importância do estudo do sistema imune inato peculiar do ouriço-do-mar, demonstrando que seu genoma contém aproximadamente 340 membros da família Toll-Like Receptors (TLR) (Pancer, Cooper, 2006), mais de 200 membros de NOD-like receptors (Buckley, Rast, 2012) e mais de 100 membros de Scavenger Receptors (SRCR) (Materna, Cameron, 2008). Esses dados somados superam em número os receptores encontrados no sistema imune inato de cordados, representando uma expansão de mais de 10 vezes quando comparado aos vertebrados (Buckley, Rast, 2012).

Por volta de novecentas espécies da classe *Echinoidea* foram descritas (Hendler et al., 1995). Dentre estas, 42 (4,67%) são encontradas no Brasil (Tommasi, 1999) e 17 (1,9%) foram registradas no litoral paulista (Hadel et al., 1999).

A espécie *Lytechinus variegatus* apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a Carolina do Norte, Estados Unidos, até o sudeste do Brasil. Quatro subespécies foram descritas *Lytechinus v. pallidus* (espécie endêmica de Cabo Verde), *Lytechinus v. variegatus* (de ampla ocorrência, inclusive na costa brasileira), *Lytechinus v. atlanticus* (espécie endêmica de Bermuda), e *Lytechinus v. carolinus* (encontrada no Atlantico Norte) (Moore et al., 1963). No litoral de São Sebastião encontram-se exemplares de carapaça medindo de 80 a 120 mm de diâmetro (Giordano, 1986). Em algumas regiões, a espécie é encontrada coberta com pequenas rochas, conchas e algas (Beddingfield, McClintock, 2000). A temperatura é o fator limitante mais importante que determina a distribuição geográfica da espécie. A espécie *L. variegatus* suporta uma faixa ampla de temperatura, variando de 11 a 35°C. Temperaturas mais elevadas foram correlacionadas com episódios de mortalidade em massa para a mesma espécie (Watts et al., 2013).

A espécie *Echinometra lucunter*, também chamada de "Pindá", é amplamente distribuída geograficamente, podendo ser encontrada ao longo de toda a costa brasileira, além do sudeste da Flórida, ilhas Bermudas e na costa oeste da África (Mortensen, 1943). Vive em locas e principalmente na região do mesolitoral, dessa forma ficando intensamente exposta as intempéries (Gondim et al., 2008). A carapaça pode medir até 90 mm de diâmetro em exemplares encontrados em Abrolhos; os exemplares encontrados em São Sebastião medem entre 20 e 70 mm de diâmetro (Giordano, 1986). Esta espécie é encontrada mais comumente em regiões entremarés a até 5 metros de profundidade, embora haja relatos de sua ocorrência a 45 metros (Mortensen, 1943). Sua grande abundância pode ser justificada pela alta resistência a alterações na temperatura e salinidade conforme relatado por Hendler et al.(1995).

O equinoide antártico *Sterechinus neumayeri* apresenta um papel trófico central no ambiente marinho antártico, além de ser modelo de estudo devido a sua importância como predador e sua distribuição abundante na região da Península Antártica (Brey et al., 1995; Cowart et al., 2009). É comumente encontrado em águas rasas, sendo a maior profundidade relatada de ocorrência da espécie de 400 metros (Brey, Gutt, 1991; Pawson, 1969). Dentre os predadores dessa espécie estão a estrela do mar *Odontaster validus* e a anêmona *Urticinopsis antarcticus* (Dayton et al., 1970). O desenvolvimento da espécie é consideravelmente lento, o período de gametogênese pode chegar a 2 anos (Pearse et al., 1991). O desenvolvimento embrionário é similar aos demais equinoides, sendo que a metamorfose ocorre em média 4 meses após a fertilização (Bosch et al., 1987).

Os equinoides vêm atraindo recentemente a atenção de pesquisadores que buscam encontrar mecanismos imunológicos primitivos que seriam filogeneticamente ancestrais aos dos vertebrados (Loker et al., 2004; Smith et al., 2006).

2.3 Imunidade Inata

Evolutivamente, o sistema imune surgiu com o aparecimento do filo Protozoa, há aproximadamente 2,5 bilhões de anos (Ellis et al., 2011). O sistema imune se desenvolveu a partir da pressão seletiva exercida pelos microrganismos infecciosos. Como resposta, todos os organismos multicelulares desenvolveram mecanismos adaptativos para lidar com a infecção e proteger seu corpo por meio da destruição dos agentes invasores e da neutralização dos seus fatores de virulência (Medzhitov, Janeway Jr, 1997)

A imunidade inata, também chamada de inespecífica, é comum a todos os organismos multicelulares e representa a primeira linha de defesa. Pode ser definida como o conjunto de mecanismos de defesa que protege o organismo contra infecções sem depender de prévia exposição a determinado microrganismos (Bols et al., 2001).

O sistema imune inato baseia-se em respostas celulares e humorais, sendo que ambas podem ser divididas em duas vias: via aferente, também chamada sensitiva, e via eferente, também chamada de via efetora. A via sensitiva compreende o reconhecimento das substâncias estranhas ao organismo pelas células imunes. Por meio da identificação dessas substâncias, o sistema imune é capaz de elaborar uma resposta por meio da chamada via efetora. Os mecanismos efetores da resposta imune inata compreendem o recrutamento e ativação das células imunes, migração das células para o foco inflamatório e/ou infeccioso, adesão da célula imune à partícula estranha, fagocitose, degradação do corpo estranho por meio da geração de espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos, além da via do sistema complemento (Ellis et al., 2011).

Os invertebrados, que representam 95% das espécies descritas, possuem apenas o sistema imune inato e este deve garantir ao organismo uma defesa efetiva contra patógenos. Para isso, os invertebrados possuem: (a) a presença de grandes famílias de genes responsáveis por codificar uma ampla variedade de isoformas de proteínas, (b) instabilidade genômica dentro de famílias gênicas semelhantes que promovem *crossovers* desiguais, conversão gênica e deleção e/ou duplicação gênica, (c) grande variedade de modificações no RNAm que inclui *splicing* alternativo e (d) grande variedade de modificações proteicas como as póstraducionais

Em equinodermos, postula-se que a resistência natural às infecções ocorra pela associação de mecanismos inespecíficos, celulares (fagocitose, coagulação e reações citotóxicas), humorais (lisinas, aglutininas e fatores antimicrobianos) e a expulsão de microorganismos fagocitados juntamente com seus fagócitos do organismo (Ratcliffe et al., 1985).

2.3.1 Células imunes

As células do sistema imune dos ouriços-do-mar localizam-se no líquido celomático desses animais, que por sua vez está presente na cavidade celômica dos equinoides. As células imunes, também chamadas celomócitos são de quatro tipos distintos: amebócito fagocítico (AF), esferulócito incolor (EI), esferulócito vermelho (EV) e célula vibrátil (CV). Em animais saudáveis, ocorre predomínio de amebócitos fagocíticos (40 – 80%), seguido das células vibráteis (12 – 20%) e em menor proporção os esferulócitos de ambos os tipos (Gross et al., 2000). Embora ocorra variação entre as espécies, nota-se que as proporções se mantêm semelhantes.

Os amebócitos fagocíticos são células agranulares, com capacidade de emitir projeções citoplasmáticas sob a forma de lamelipódios e filopódios. Possuem

capacidade de espraiamento quando em contato com lâmina de vidro ou placa de cultura celular. Essas células estão envolvidas em processos como fagocitose, encapsulamento, rejeição tecidual e coagulação. Já é sabido que, baseado em sua morfologia, os amebócitos podem ser subdivididos em três tipos: célula discoidal, célula poligonal e pequenos amebócitos. Basicamente, a diferença principal entre os dois primeiros tipos é no que tange a organização dos filamentos de actina do citoesqueleto dessas células. Essa diferença no padrão de organização reflete a diferença de capacidade que estas possuem para migrar e realizar suas funções. Além disso, foi observado que a distribuição subcelular de cinesina, miosina II e tubulina também apresentam diferenças de acordo com o subtipo de fagócito, reforçando a função migratória da célula. Os pequenos amebócitos foram o último subtipo a ser descrito e ainda não se tem informação sobre sua função (Smith et al., 2006).

Os esferulócitos vermelhos e incolores são células granulares, apresentam morfologia esférica. Esses grânulos são citoplasmáticos e ambos os tipos apresentam tamanho e morfologia similares, exceto que nos esferulócitos vermelhos os grânulos possuem um pigmento denominado equinocromo A, responsável por conferir coloração avermelhada a essa célula. O equinocromo é uma naftoquinona e possui atividade antimicrobiana. A função dos esferulócitos ainda não está bem esclarecida (Smith et al., 2006).

As células vibráteis são células esféricas, pequenas e possuem um flagelo que lhes confere movimentação. Por essa razão, acredita-se que essa célula possa estar relacionada com a movimentação do líquido celomático. Também há indícios de sua participação na coagulação (Smith et al., 2006).

Existem diversas descrições sobre a importância dos celomócitos no combate a organismos invasores, constituindo parte dos mecanismos de resistência natural à infecção dos ouriços. Esses relatos discutem sobre a importância dos celomócitos para a imunidade, reparo de injúrias, coagulação, e rejeição a enxertos (Coffaro, Hinnegardner, 1977; Silva, Peck, 1999; Silva et al., 2001).
2.3.2 Migração celular

A migração celular é um processo biológico altamente integrado composto por múltiplos passos, importante em todos os organismos multicelulares durante o desenvolvimento embrionário, cicatrização, reparação tecidual e também durante a resposta imune (Ridley et al., 2003).

A migração celular é composta por quatro etapas sequenciais: extensão do lamelipódio, formação de novas adesões ao substrato, contração do corpo celular e desprendimento da cauda (Ridley et al., 2003). Durante todas as etapas ocorre a montagem (*assembly*), desmontagem (*disassembly*) e reorganização do citoesqueleto de actina (Raftopoulou, Hall, 2004).

Uma diversa variedade de moléculas de sinalização intracelulares está implicada na migração celular, dentre elas: MAPK, fosfolipase, serina e tirosina quinases. No entanto, a participação de GTPases é bastante expressiva durante o processo de migração celular (Raftopoulou, Hall, 2004).

A família das GTPases se subdividem em 5 famílias menores: Ras, Rho, Rab, Arf e Ran (Etienne-Manneville, Hall, 2002). Dentre essas, as RhoGTPases são as que mais ativamente participam no processo migratório (Kjoller, Hall, 1999)

Além de estarem envolvidas na migração celular, as RhoGTPases participam de diversas outras atividades que são dependentes do citoesqueleto de actina como por exemplo citocinese (Prokopenko et al., 1999), fagocitose (Cox et al., 1997; Caron, Hall, 1998) e morfogênese (Settleman, 1999).

A familia das RhoGTPases atua na via de transdução de sinal ciclando de um estado inativo – ligado ao GDP – para um estado ativo – ligado ao GTP. Quando ligado ao GTP, interage com efetores *downstream* desenvolvendo diversas respostas celulares (Ridley, Hall, 1992). Esse ciclo de ativação e inativação das GTPases é regulado por três moléculas: GEF – *guanine nucleotide exchange factor* que promove a troca de GDP por GTP para ativação da moléculas; GAP – *GTPase activating protein* responsável por inativar a molécula, promovendo a hidrolise do GTP e GDI – *guanine nucleotide dissociation inhibitors* que bloqueiam o ciclo de GTPase por sequestrar e solubilizar a forma ligada ao GDP e assim inibir a troca de GDP por GTP(Schmidt, Hall, 2002) (Figura 2). GDIs – *guanine disassociation factors* são responsáveis pelo sequestro da proteína em seu estado inativo, além de modular a ciclagem das GTPases da membrana para o citoplasma, contribuindo

assim para a manutenção das GTPases no citoplasma das células (DerMardirossian, Bokoch, 2005).



Figura 2. Mecanismo de funcionamento básico das RhoGTPases. A ativação das RhoGTPases ocorre mediante a troca de GDP por GTP. Para a ativação, há participação de um GEF, enquanto que para sua inativação, há a participação de um GAP hidrolizando o GTP e transformando-o em GDP. Vale ressaltar que esta ativação ocorre quando as proteínas estão ancoradas à membrana plasmática. Por sua vez, o GDI é responsável por inibir a troca de GDP por GTP, mantendo Rho no citoplasma e impedindo que a cascata de sinalização ocorra. Adaptado de Fiorentini et al., 2003.

Existem 3 membros desta família que participam ativamente da migração celular: Rho, Rac e Cdc42. Essas GTPases modulam a montagem e organização do citoesqueleto (Hall, 1998). Rho que regula a montagem (*assembly*) dos filamentos contráteis actina-miosina; Rac que regula polimerização de actina para formar lamelipodio e Cdc42 que também forma outro tipo de protrusão celular, o filopódio (Figura 3). Todas as GTPases mencionadas promovem a montagem de complexos de adesão à matriz mediados por integrinas (Ridley, Hall, 1992; Ridley et al., 1992). Com isso, conclui-se que Rho, Rac e Cdc42 regulam três vias de transdução de sinal associando receptores de membrana com a montagem de estruturas formadas pela reorganização do citoesqueleto de actina (Etienne-Manneville, Hall, 2002).



Figura 3. Processo simplificado de migração celular e o papel das RhoGTPases. Desenho esquemático de uma célula migratória em que se observa a organização do citoesquelo de actina (vermelho) e de microtúbulos (verde). Nota-se que na região do lamelipódio os filamentos de actina são maificados e orientados de forma não uniforme, nesta região há ativação de Rac. Nos filopódios ocorre uma organização mais precisa dos filamentos de actina, nos filopódios ocorre ativação predominate de Cdc42. Na região traseira da célula nota-se a presença de fibras de estresse e há maior tivação de RhoA. Nota-se ainda na figura a formação de complexos de adesão. Lp , lamellipodium ; Fp, filopodium ; Lm , lamela ; SF , fibra de stress; FA , adesão focal; FC , complexo focal. Adaptado de Le Clainche, Carlier 2007.

O lamelipódio consiste em uma rede de filamentos de actina formados a partir de um centro de nucleação de actina mediado pelo complexo Arp2/3 (Pollard et al., 2000). A parte frontal da célula em migração gera uma força de protrusão, geralmente associada com a extensão do lamelipódio na direção da migração. Durante essa protrusão ocorre a formação de novas adesões celulares à matriz extracelular. A protrusão do lamelipódio por si só não é suficiente para que a célula migre, para isso ocorre a contração da parte traseira da célula. Através dessa habilidade de promover protrusão e contração celular, o citoesqueleto de actina gera força para promover a migração celular (Nobes, Hall, 1995).

A extensão do lamelipódio é dependente de Rac que por sua vez é induzida por fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e citocinas (Knight et al., 2000; Nobes, Hall, 1999). Rac é necessária também para a formação dos complexos de adesão à matriz celular. (Nobes, Hall, 1995; Rottner et al., 1999),

A contração do corpo celular é dependente da contratilidade proporcionada por filamentos de acto-miosina (Mitchinson, Cramer, 1996) e essa etapa é regulada por Rho. Rho atua via ROCK (Rho quinase) para afetar a fosforilação da cadeia leve de miosina (Kaibuchi et al., 1999). A regulação do desprendimento da cauda depende do tipo celular envolvido e da força de adesão desta à matriz. Acredita-se que em células que apresentem migração mesenquimal, a inibição de Rho promove a redução na adesão à matriz e na atividade contrátil e promove o desprendimento da cauda (Cox, Hutternlocher, 1998).

A migração celular normalmente é direcionada e controlada por fatores extracelulares. Essa direcionalidade é controlada por Cdc42. Isso foi evidenciado em um trabalho com macrófagos que se moviam a favor de um gradiente de quimiocinas. Quando Cdc42 era inibido, os macrófagos migravam aleatoriamente, ao passo que a inibição de Rac causava o bloqueio do movimento celular como um todo (Allen et al.,1998). Além disso, Rac também desempenha um importante papel ao controlar a polimerização de actina e a montagem de complexos de adesão (Nobes, Hall, 1995).

As funções que as GTPases exercem na remodelação do citoesqueleto de actina são conseguidas graças à ativação de efetores específicos. No caso de Rho, pelo menos dois efetores são requeridos para a formação de fibras de estresse e adesões focais: ROCK (Rho quinase) e mDia. Para Rac foram descritos os efetores POR-1 *(Partner of Rac)*, p140Sra-1 *(Specific Rac 1 associated proteins)* e WAVE para a formação do lamelipódio. Por último, o principal efetor para Cdc42 é WASP na formação do filopódio. Cdc42 também interage com outras moléculas envolvidas na reorganização do citoesqueleto para formação de filopódios: as serina treonina quinases MRCKs alfa e beta e PAK4. Existem ainda alguns efetores que são comuns a Rac e Cdc42 como PAK 1, 2 e 3 (Bishop, Hall, 2000).

Outros fatores além dos já mencionados são igualmente importantes durante a migração celular. É o caso do citoesqueleto de microtúbulos, que apresenta alto grau de polarização durante a migração. Isso se caracteriza pelo aumento do crescimento de microtúbulos na borda anterior da célula e pela reorientação do centro organizador de microtúbulos que contribui para a definição na direcionalidade da migração (Wittmann, Waterman-Storer, 2001). Além disso, os microtúbulos parecem ser necessários durante a retração da cauda (Ballestrem et al., 2000). A polarização celular e a retração da cauda mediada pelos microtúbulos são controlados pelas GTPases Cdc 42 (Nobes, Hall, 1999) e Rho (Pletjushkina et al., 2001) respectivamente.

A remodelação do ambiente extracelular é também importante para a migração celular. A secreção de enzimas proteases que degradam componentes da matriz extracelular é fundamental para a migração tanto bidimensional quanto tridimensional (Murphy, Gavrilovic, 1999).

Beane e colaboradores (2006) identificaram 174 genes da família das GTPases no genoma do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* (única espécie de equinóide com genoma sequenciado). Foi descrita ainda a presença de representantes das principais classes de proteínas do citoesqueleto, tais como: actina, miosina II, tubulina e filamentos intermediários (Morris et al., 2006). O trabalho de Bourex et al. (2007) demonstrou a conservação de proteínas da família Rho ao longo da escala filogenética e concluiu que dentre os celomados inferiores, apenas os ouriços-do-mar apresentam estrutura gênica da família Rho semelhante a dos vertebrados. Na literatura é possível encontrar trabalhos que avaliaram a participação de membros dessa família em embriões de ouriços-do-mar (Beane et al., 2006; Cuellar-Mata et al., 2000; Nishimura et al., 1998). No entanto, ainda não foi descrita sua presença em celomócitos de ouriços-do-mar adultos.

2.3.3 Reconhecimento

A principal característica do sistema imune inato é que este não reconhece cada antígeno especificamente, mas em vez disso reconhece poucas, porém altamente conservadas estruturas que estão presentes nos grupos de microrganismos existentes. A imunidade inata reconhece que tais estruturas são estranhas ao organismo (não próprias ou *non self*) e desencadeia respostas para controlar e eliminar sua presença do organismo, restabelecendo a homeostase.

Essas sequências conservadas presentes nos microrganismos são conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) e os receptores do sistema imune inato são chamados receptores de reconhecimento de padrões (*pattern-recognition receptors* - PRRs). Dentre os PAMPs mais conhecidos estão lipopolisacarídeos (LPS), manose, peptideoglicanos e glucanos (Medzhitov, Janeway, 1997).

Os principais tipos de PRRs no sistema imune inato são: *Toll-like receptors* (TLR), compostos por um domínio extracelular ligante e um domínio intracelular onde se acoplam proteínas adaptadoras responsáveis por desencadear uma cascata de sinalização (Takeda, Akira, 2004); *NOD-like receptors* (NLR) responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs intracelulares (Rosenstiel et al., 2008) e *Scavenger Receptor Cystein-Rich* (SRCR) que são altamente conservados, podendo ser receptores solúveis ou ancorados à membrana plasmática, expressos em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas (Sarrias et al., 2004).

Os Toll-like receptors são receptores transmembranas que consistem de um domínio transmembrana do tipo LRR (*leucine rich repeat*) e um domínio citoplasmático do tipo TIR (Toll/IL1-receptor). O domínio LRR é responsável por reconhecimento do ligante que pode ser proteína (flagelina e porina), açúcar (zimozan), lipídeo (LPS, acido lipoteicoico LTA) ou ácido nucleico (RNA viral, CpG contendo BNA de vírus e bactérias). O domínio TIR apresenta homologia com a região citoplasmática do receptor IL-1. Esse domínio interage com proteínas adaptadoras como, por exemplo, MyD88 (*myeloid differentiation response gene 88*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*). Tal interação promove a ativação da via de sinalização MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e dos fatores de transcrição NF-kB (*nuclear fator kB*) e IRF (*IFN regulatory factors*) que levam à produção de citocinas inflamatórias (Kumar et al., 2009).

Os Nod-like receptors são receptores intracelulares, presentes no citoplasma de células imunes. Receptores dessa família se caracterizam por possuírem um domínio N terminal denominado CARD (*caspase recruitment domain*), um domínio pirin (PYD) ou um domínio do tipo BIR (*Baculovirus inhibitor domain*), um domínio central do tipo NOD (*nucleotide binding oligomerization domain*), que é responsável

pela auto oligomerização dos receptores após sua ativação e o domínio C terminal do tipo LRR rico em leucina que reconhece PAMPs de microrganismos intracelulares. Esse reconhecimento leva a ativação do fator de transcrição NFkB e como consequência ocorre a ativação de caspase-1 e a produção de citocinas inflamatórias como IL1B (Chen et al., 2009).

Os receptores do tipo S*cavenger Receptor Cysteine-rich* (SRCR) possuem de 90 a 110 aminoácidos e são caracterizados por seu elevado e bem definidos teores de cisteína. Essa família de receptores é capaz de reconhecer PAMPs (Martínez et al., 2011).

O trabalho de Messier-Solek e colaboradores (2010) analisou o genoma do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* e constatou a existência de uma grande gama de receptores imunes homólogos aos encontrados em humanos e roedores. Demonstraram ainda que tais receptores são encontrados em maior numero e maior complexidade no ouriço-do-mar. As famílias de genes que codificam os receptores dos tipos TLR e NLR contêm de 10 a 20 vezes mais membros que os presentes em vertebrados e em Drosophila. Além disso, as proteínas produzidas a partir da transcrição desses genes são igualmente diversas e distintas das encontradas em vertebrados.

O mesmo grupo de pesquisa demonstrou ainda que receptores do tipo SRCR estão também presentes em maior quantidade e diversidade em ouriços-do-mar quando comparados com outros modelos invertebrados e vertebrados. O genoma do ouriço-do-mar possui aproximadamente 220 genes envolvidos na transcrição desse tipo de receptor em comparação a apenas 16 genes em humanos. No ouriço-do-mar esses receptores são expressos em fagócitos e podem ser encontrados tanto nas formas transmembrana quanto secretória (Pancer et al., 1999).

2.3.4 Adesão

Após o reconhecimento da particular estranha, os fagócitos devem aderir a tais partículas para que possa haver posterior internalização. Os fagócitos aderem aos corpos estranhos via integrinas (Phillips, Kao, 2005). Esta interação é essencial para a regulação de diversas atividades desempenhadas pelos fagócitos, dentre elas: rearranjo do citoesqueleto, migração celular e transcrição gênica (Xia, Triffitt, 2006).

Integrinas são proteínas transmembranas heterodimericas, compostas por uma subunidade α e uma β , que são expressas na grande maioria dos tipos celulares. Essas proteínas são receptores e atuam na adesão da célula a componentes da matriz extracelular. Há aproximadamente 17 tipos de subunidades α e oito tipos de subunidades β . (Phillips, Kao, 2005).

As adesões celulares que ocorrem com a resposta imune são ditas transientes, já que ocorrem somente quando há a migração da célula imune para o foco inflamatório e /ou infeccioso e é realizada a adesão destas células às partículas estranhas ao organismo. Esses tipos de adesões devem ser meticulosamente regulados a fim de evitar a adesão das células inflamatórias a outros tipos celulares. (Johansson, 1999).

Em ouriços-do-mar foi descrita a existência de quatro subunidades β de integrina ("C,"G, "L e "D). Os dados relacionados com a subunidade α ainda são controversos dada a baixa conservação desta subunidade (Whittaker et al., 2006).

2.3.5 Fagocitose

A fagocitose é um processo pelo qual as células fagocíticas, também denominadas fagócitos, ingerem partículas pequenas, geralmente maiores que 0,5 µm de diâmetro (May, Machesky, 2001). Esse processo conservado filogeneticamente é crítico para a imunidade inata. (Greenberg, Grinstein, 2006). As funções desse processo são diversas: remoção de células em apoptose, remodelamento tecidual e defesa imune com a eliminação de microrganismos e partículas estranhas ao organismo (Yutin et al., 2009). É um processo complexo e dinâmico que pode ser didaticamente dividido em três fases: reconhecimento, captura e degradação da partícula (Flannagan et al., 2012).

Resumidamente, ocorre o reconhecimento de partículas por meio de receptores, que leva a uma reorganização do citoesqueleto de actina fazendo com que a membrana plasmática do fagócito emita protrusões que envolvem a partícula, internalizando-a em uma estrutura envolta por membrana denominada fagossomo. Inicia-se então a fusão de lisossomos a esta estrutura que passa a ser chamada de fagolisossomo. Nesta estrutura acontece a degradação da partícula ingerida (Nordenfelt, Tapper, 2011). Durante essas fases, as células fagocíticas podem

produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que por sua vez orquestram um processo infamatório local ou sistêmico (Underhill, Goodridge, 2012).

No final do século passado, o biólogo russo Élie Metchnikoff (1854-1916), interessado no estudo de alguns aspectos sobre nutrição e embriologia de equinodermos, observou que algumas células presentes na cavidade celomática e tecido mesenquimal tinham a capacidade de se movimentar e de internalizar partículas inertes ou mesmo vivas. Suspeitou que esse fenômeno pudesse estar relacionado com a eliminação de patógenos dos tecidos, e, com um experimento simples, no qual inseriu a ponta de um acúleo de roseira em uma larva de estrela do mar observou, após cerca de 12 horas, que aquelas células migravam e circundavam o corpo estranho como que tentando englobá-lo. Demonstrou assim, o processo de migração de células celomáticas para o foco inflamatório e o significado biológico da fagocitose. Dessa forma, Mtechnikoff mudou o significado e o paradigma da inflamação, que passou a ser descrita como um processo biologicamente ativo. (Tauber, Chernyak, 1997).

Existe uma gama enorme de receptores de membrana envolvidos na fagocitose, que dependem do tipo celular. Dentre eles destaca-se receptor do tipo Fc, manose, CD11, Cd14, CD18, CD35, integrina β1, integrina αvβ3 (Greenberg, Grinstein, 2002). Os receptores do sistema complemento CR1, CR3 e CR4 são expressos em células fagocíticas e estão implicados na fagocitose (Brown, 1991). CR1 está principalmente envolvida na adesão da célula à partícula. CR3 e CR4 são integrinas capazes de se ligarem a diversos ligantes (Diamond et al., 1993). CR3 está associado a fagocitose, espraiamento e quimiotaxia através da interação com moléculas de adesão ICAM (May, Machesky, 2001). A eficiência da interação entre os receptores e seus ligantes depende de sua mútua afinidade e pela sua densidade na superfície dos fagócitos e das partículas (Flannagan et al., 2012).

O contato inicial do microrganismo com a superfície da célula fagocítica desencadeia dois eventos: (1) identificação e reconhecimento dos PAMPs e (2) envolvimento do microrganismo por meio de modificações na membrana plasmática da célula fagocítica. O reconhecimento dos PAMPs faz com que ocorra o recrutamento e a oligomerização dos receptores, desencadeando uma cascata de sinalização, por exemplo, através da ativação do fator NFkB. A via de sinalização culmina na produção de citocinas (Jaumouille, Grinstein, 2010). A ativação dos

receptores TLR podem ativar a GTPases Rap1 que por sua vez provoca modificações conformacionais no domínio extracelular da integrina, aumentando assim sua afinidade pelo ligante (Flannagan et al., 2012).

A polimerização de actina ocorre a partir da transdução de sinal, após o contato da partícula com o fagócito. Os estudos indicam a participação da família Rho no controle da reorganização estrutural dos filamentos de actina do citoesqueleto, durante a captação de partículas por fagócitos ativados (Caron, Hall, 1998).

Fosfatidilinositol 4-5 bifosfato está presente em quantidade expressiva na camada interna da membrana plasmática de fagócitos em repouso. Durante a fagocitose, a concentração de PI(4,5)P2 aumenta transitoriamente nos pseudópodes até que ocorra a internalização da partícula, quando sua concentração decai abruptamente. PI(4,5)P2 é portanto essencial para a internalização da partícula, provavelmente por facilitar o remodelamento das moléculas de actina (Flannagan et al., 2012).

Os fagócitos podem internalizar grandes partículas. Isso requer a internalização de grandes áreas da membrana plasmática. Foi visto que em casos extremos, os macrófagos podem internalizar a sua área total da membrana plasmática em aproximadamente 30 minutos. (Cox et al., 2000). Isto ocorre sem que haja redução da área da membrana, podendo-se inferir que a perda da área de membrana plasmática, internalizada durante a fagocitose, é compensada pela concomitante exocitose de regiões de membrana.

Uma característica marcante da fagocitose é o rápido acumulo de F-actina e proteínas acessórias na região perifagossomal. Esse remodelamento do citoesqueleto é mediado por membros da família Rho GTPase. Diversas GTPases atuam na fagocitose. Cdc42, além de estimular a formação do filopódio, é ativa nas fases iniciais da fagocitose, e sua expressão é encontrada majoritariamente nas bordas dos pseudópodes, durante a fase que antecede a completa internalização da partícula. Quando Cdc42 é inativada ocorre a inibição da fagocitose. Rac 1, responsável por induzir a formação do lamelipódio, também desempenha importante papel na fagocitose. Rac1 é ativado em todo o fagossomo. O papel de RhoA na fagocitose ainda é bastante controverso, mas aparentemente está envolvido na formação do fagossomo (Flannagan et al., 2012). RhoA ativa a polimerização de actina por dois mecanismos distintos. O primeiro ativa Rho quinase que estimula

miosina II através da fosforilação de suas cadeias leves. O segundo mecanismo envolvido ativa mDia1 que promove rearranjo do citoesqueleto e a ingestão da partícula (May, Machesky, 2001). Foi observado que miosina II desempenha papel importante na formação do fagossomo, sugerindo ser importante durante o englobamento da partícula (May, Machesky, 2001).

As partículas internalizadas são degradas em compartimentos subcelulares específicos denominados fagossomos que se caracterizam por alta acidez e presença de enzimas proteolíticas. No fagossomo geralmente ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) via sistema NADPH oxidase que contribuem para a morte e degradação do microrganismo fagocitado.

Espécies reativas de oxigênio são formadas como subprodutos metabólicos da cadeia respiratória mitocondrial. São formadas a partir de reações mitocondriais via cadeia transportadora de elétrons e via NADPH oxidase. Na presença da enzima superóxido dismutase (SOD), o ânion superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio, que se difunde para o citoplasma e sofre ação da enzima catalase que o converte em água e oxigênio. O ânion superóxido pode ainda reagir com óxido nítrico formando peroxinitrito (ONOO) (Vernon, Tang, 2013). A superóxido dismutase (SOD) possui atividade enzimática antioxidante e está presente abundantemente em diversos organismos, de microrganismos a animais e plantas (Noor et al., 2002).

A produção de EROs desempenha um importante papel na fisiologia de células fagocíticas. Foi descrito que o estresse oxidativo pode ativar o fator NFkB (Gloire et al., 2006) e a via MAPK (Hsieh, Papaconstantinou, 2006).

Embora EROs sejam produzidas primariamente pelo complexo NADPH oxidase, o metabolismo oxidativo mitocondrial é uma fonte adicional e importante da produção de EROs, denominado EROm. A produção de EROm também contribui para a resposta imune inata (West et al., 2011).

Uma vez que EROs podem ser extremamente tóxicas para a célula, diversos mecanismos de defesa são ativados com o objetivo de prevenir tais danos, os chamados sistemas antioxidantes. Dentre eles encontram-se as enzimas glutationa peroxidase, superóxido dismutase e catalases e moléculas que reagem diretamente com os radicais produzidos que incluem a glutationa e a vitamina C. Quando ocorre um desbalanço entre as substâncias tóxicas e as antioxidantes produzidas, ocorre uma situação chamada estresse oxidativo (Hultqvist et al., 2009).

A atividade fagocítica de amebócitos tem sido utilizada como um método biológico de avaliação dos mecanismos de resistência natural a infecção dos ouriços-do-mar em função de fatores abióticos. Assim, no ouriço-do-mar temperado *Pseudocentrotus depressus* (16 °C), observou-se que fucoxantina, β -caroteno e β -echinona administrados na dieta aumentam a atividade fagocítica dos amebócitos (Kawakami et al., 1998).

Em linhas gerais, a mensuração da fagocitose investiga: (a) capacidade fagocítica: a proporção de fagócitos que estejam realizando fagocitose dentre de dada população de fagócitos (Gagnaire et al., 2006; Silva, Peck, 1999) e (b) índice fagocítico: numero de partículas fagocitadas por cada fagócito (Duchemin et al., 2007; Silva, Peck, 1999). Para essa análise metodologias distintas são utilizadas, que incluem: métodos convencionais via microscopia de fase (Pipe et al., 1999; Silva, Peck, 1999); análise in vivo via endocitose de ferritina (Faria, Silva, 2008); utilização de microrganismos fluorescentes (Coteur et al., 2003); mensuração da endocitose de zimosan (Parry, Pipe, 2004); mensuração via citometria de fluxo de *beads* fluorescentes (Duchemin et al., 2007).

OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito do aumento da temperatura da água do mar na imunidade inata de ouriços-do-mar antárticos *Sterechinus neumayeri* e tropicais *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* submetidos a três diferentes temperaturas (0,0; 2,0 e 4,0 °C para animais antárticos e 20,0; 25,0 e 30,0 °C para tropicas) por quatro diferentes períodos (agudo de 24 horas e crônicos de 2, 7 e 14 dias).

3.1 Objetivos específicos

Contagem diferencial da população de celomócitos;

Avaliação dos índices de atividade fagocítica e germicida *in vitro*, em ensaios de fagocitose, utilizando-se amebócitos fagocíticos desafiados com leveduras *Saccharomyces cerevisiae*;

Verificação da ação germicida do líquido celomatico perivisceral sem a presença dos celomócitos sob as diferentes temperaturas nos diferentes períodos;

Avaliação da capacidade de adesão e espraiamento dos celomócitos;

Avaliação da viabilidade dos celomócitos por meio da técnica de exclusão do corante vital Azul de Tripan;

Análise ultraestrutural dos celomócitos de ouriços-do-mar por microscopia eletrônica de transmissão

Análise da expressão das GTPases RhoA e Rac1;

Avaliação de alterações no citoesqueleto de actina;

Análise da migração dos celomócitos através de ensaio de microscopia time lapse;

Análise da migração dos celomócitos através de câmara transwell com agente quimiotático levedura;

Análise do estresse oxidativo por meio da quantificação de ânion superóxido (O₂) e Superóxido Dismutase (SOD).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Colheita dos animais

Exemplares do ouriço-do-mar antártico *Sterechinus neumayeri* (n=60) (Figura 4) foram colhidos nas proximidades da EACF – Estação Antártica Comandante Ferraz com redes de arrasto durante o verão de 2009 a uma profundidade de 3 a 6 metros na baía do Almirantado, ilha do Rei George, arquipélago das Shetland do Sul (62°09.568'Sul; 058°26.959' Oeste) (Figura 5).



Figura 4. Exemplares de ouriços-do-mar Sterechinus neumaueri.



Figura 5. Mapa da região de coleta dos animais antárticos. Mapa retirado do site Google Maps.

Exemplares de ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* (n=60) e *Echinometra lucunter* (n=60) (Figura 6) foram colhidos no costão rochoso ao redor da ilha de Tiasussê (23° 52' 20,33" Sul e 45° 28' 18,32"Oeste), em São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo (Figura 7). Os animais foram colhidos manualmente, em mergulho livre, a uma profundidade de 3 a 7 metros.

As espécies de ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* foram escolhidas nesse trabalho por serem espécies tropicais que habitam o litoral do estado de São Paulo, são encontrados em faixa de profundidade similares e por essa razão são submetidas às mesmas variações de clima e de fenômenos oceanográficos. No entanto, existe uma diferença-chave entre esses animais que justificou a escolha dos mesmos nesse trabalho. A espécie *Echinometra lucunter* é mais encontrada aderida ao costão rochoso, em áreas que estão mais sujeitas a variações térmicas, já a espécie *Lytechinus variegatus* habita a mesma faixa de profundidade da espécie anterior, porém não é acometida por variações da maré e, portanto mantida a condições térmicas mais constantes.



Figura 6. Exemplares de ouriços-do-mar tropicais. A. *Lytechinus variegatus* B. *Echinometra lucunter*



Figura 7. Mapa da região de coleta dos animais tropicais. Mapa retirado do site Google Maps.

4.2 Transporte dos animais

O transporte dos animais do ponto de coleta até os tanques de manutenção é um fator importante a ser considerado já que o estresse de captura deveria ser minimizado.

A espécie antártica *Sterechinus neumayeri* foi coletada por rede de arrasto. Após passagem da rede, os animais coletados eram imediatamente transferidos para caixas marifinites que se encontravam no bote de apoio, contendo água marinha coletada igualmente das proximidades do ponto de coleta dos animais. O bote era então conduzido até a praia e os galões imediatamente transportados até os tanques de manutenção que se situavam a aproximadamente 150 metros da praia.

Ambas as espécies tropicais foram coletadas por mergulho livre, os animais eram então colocados em bolsas de nylon medindo 35 por 25 cm e com orifícios de 0,5 por 0,5 cm. Os animais foram trazidos à praia sem que se retirassem da água e imediatamente transferidos para galões com água também coletada das proximidades do ponto de coleta e então levados até o tanque de manutenção que situava-se a aproximadamente 50 metros da praia.

4.3 Manutenção dos animais

Após coleta, os ouriços-do-mar foram transferidos para caixas d'água de fibra de vidro (500 litros). Os animais antárticos permaneceram em tanques com água do mar corrente bombeada diariamente das proximidades da Estação Antártica Comandante Ferraz. Os animais tropicais permaneceram em tanque com água marinha corrente nos laboratórios do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, Brasil. Nesses tanques, o arejamento era realizado mediante a disposição de três bombas submersas de 500L/hora, além de dois arejadores ligados à pedra porosa.

Os animais foram aclimatados por pelo menos uma semana antes do início dos experimentos. Nesse período, a alimentação foi provida mediante coleta de algas da mesma região em que se encontravam os ouriços.

Temperatura e salinidade foram monitoradas diariamente mantendo como controle 0,0±0,1 °C e 34±1‰ e 20,0±0,2 °C e 35±1‰ respectivamente para a

espécie antártica e para as espécies tropicais. A leitura da temperatura foi realizada por meio de um termômetro de máxima e mínima, e para evitar a oscilação térmica, utilizou-se o termostato Full Gauge TIC 17 RGTi® com variação máxima de ±0,2 °C. A temperatura dos biotérios foi mantida com o sistema de ar condicionado, com temperaturas inferiores àquelas utilizadas como média de manutenção dos animais, sendo -1 °C para experimentos na Antartica e 18 °C para os experimentos com ouriços-do-mar tropicais, de modo a garantir que a água não sofresse alterações térmicas expressivas. Foram ainda realizados, semanalmente, testes de pH, nitrito e nitrato (TetraTest®), mantidos respectivamente em 8.0; <0,3 mg/l e 5 mg/l para todas as espécies.

Decorrido o período de aclimatação, os animais foram transferidos para tanques experimentais de 35 litros, com um volume de 7 litros por animal. Os ouriços-do-mar permaneceram nesses tanques durante todo o período experimental. A água era trocada diariamente e era previamente aquecida na mesma temperatura em que os animais se encontravam. Os tanques foram mantidos com bomba submersa Better Sarlo S90 (90L/hora) Moto Bomba® e arejadores ligados a pedra porosa.

4.4 Delineamento Experimental

Do total de 60 animais coletados para cada espécie, grupos de 20 animais foram designados para o estudo de cada temperatura (0,0; 2,0 e 4,0 °C para ouriços-do-mar antárticos e 20,0; 25,0 e 30,0 °C para ouriços-do-mar tropicais). Deste total de 20 animais, foram utilizados 5 animais de cada espécie para cada período de exposição analisado (24 horas, 2, 7 e 14 dias). (Figura 8). As temperaturas controle foram estabelecidas em 0,0 °C para animais antárticos e 20,0 °C para animais tropicais.

Todos os experimentos foram realizados mediante aprovação no Comitê de Ética e Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e aprovados pelo IBAMA (Licença nº Sisbio 27922-1).



Figura 8. Delineamento Experimental. Foram utilizados 5 animais de cada espécie para cada temperatura analisada (uma controle e duas experimentais) e para cada período de exposição (agudo - 24 horas e crônicos – 2, 7 e 14 dias), totalizando 60 animais de cada espécie.

Os experimentos envolvendo a avaliação da resposta fagocítica, bem como a avaliação da proporção dos tipos celulares, avaliação ultraestrutural dos celomócitos e análise da capacidade de adesão e espraiamento foram realizados em todas as espécies estudadas, tanto na espécie antártica quanto nas duas espécies tropicais.

Os resultados obtidos para as espécies tropicais nos levaram a novos questionamentos e com isso à realização de outros experimentos como a avaliação da migração celular, da quimiotaxia, avaliação do citoesqueleto, expressão de GTPases e moléculas de adesão, além da avaliação do estresse oxidativo. Deve-se ressaltar que esses experimentos foram realizados exclusivamente nas espécies tropicais e somente no período agudo de exposição (24 horas), com exceção dos experimentos de avaliação do estresse oxidativo que foram realizados em todos os períodos de exposição.

4.5 Variação térmica da água

Foi estabelecida a temperatura de 0,0 °C como média de manutenção para todos os ouriços-do-mar antárticos e 20,0 °C para os tropicais. Essas temperaturas foram escolhidas por serem as mesmas observadas nos pontos de coleta.

As temperaturas experimentais foram estabelecidas como 2,0 e 4,0 °C para a espécie antártica e 25,0 e 30,0 °C para as tropicais.

No caso de ouriços-do-mar tropicais, isso se deve a dois fatores: o primeiro deles é pelo fato de que a temperatura intermediária de 25,0 °C se aproxima da máxima registrada na região (23 °C) (dados não publicados) (Figura 9) e a temperatura mais alta foi escolhida por representar situações extremas, supondo um aquecimento intenso da água do mar; o segundo fator pelo qual optamos por essas temperaturas é que, em experimentos pilotos prévios, observamos que essas temperaturas eram capazes de promover alterações nos parâmetros fisiológicos e celulares de ambas as espécies, sem, no entanto, causar a morte dos animais.

A mesma justificativa se aplica para animais antárticos, uma vez que não existe registro das temperaturas da água do mar ao longo do ano da região de coleta, optamos por estudar as temperaturas de 2,0 e 4,0 °C por serem temperaturas que promovem alterações celulares e fisiológicas sem ocasionar a morte dos organismos.



Figura 9. Registros de temperaturas da água do mar no ano de 2009 nas proximidades do ponto de coleta em São Sebastião, SP. Os registros de temperatura foram anotados diariamente utilizando um termômetro de máxima e mínima. A profundidade a qual foi aferida a temperatura é similar à profundidade utilizada para a coleta dos animais tropicais *L. variegatus* e *E. lucunter*. Observou-se temperatura máxima de 26 °C no mês de fevereiro. A partir dos dados observados é que foi possível delinear as temperaturas utilizadas nos experimentos desta tese.

A variação térmica crônica foi realizada aumentando em 1 grau por dia a temperatura de manutenção (0,0 °C e 20,0 °C antárticos e tropicais respectivamente) dos animais até atingir a temperatura desejada (2,0 e 4,0 °C para espécie antártica e 25,0 e 30,0 °C para espécies tropicais), na qual os animais permaneceram por mais 2, 7 e 14 dias para posteriores análises.

A variação térmica aguda foi realizada aumentando abruptamente a temperatura controle até as temperaturas desejadas, nas quais os animais permaneceram por 24 horas para posteriores análises.

A temperatura da água foi mantida com precisão de 0,2 °C pelo termostato Full Gauge TIC 17 RGTi[®] e pelo aquecedor 300 W, e a temperatura do ar foi mantida pelo sistema de ar condicionado do biotério.

O sistema utilizado no presente estudo foi um sistema semi-estático, no qual, a troca de água era realizada diariamente, sendo que a água era previamente aquecida em outro recipiente na temperatura experimental em que se encontravam os ouriços a fim de evitar um choque térmico. O volume de água substituído diariamente equivalia a aproximadamente 65% do total (equivalente a 2/3).

4.6 Observação dos animais

Durante todo o período experimental, animais de todas as espécies e expostos a diferentes temperaturas por diferentes períodos de tempo foram diariamente observados e os seguintes parâmetros registrados: queda de espinhos, reflexo de virar, reflexo da lanterna de Aristóteles, habilidade de se fixarem na lateral dos tanques, liberação de gametas na água, lesão da carapaça e morte do indivíduo.

4.7 Coleta do líquido celomático

O líquido celomático foi coletado com agulha 13 x 4,5 mm em seringa de 1 ml. A agulha era introduzida obliquamente na cavidade celomática via membrana peristomial, transversalmente à lanterna de Aristóteles, de modo a não perfurar gônada e intestino.

Não se utilizou anticoagulante para esse procedimento, uma vez que a grande maioria dos anticoagulantes possui como mecanismo de ação o sequestro de cálcio, que interfere em processos como fagocitose e adesão celular. Desse modo, a fim de evitar a coagulação, o líquido celomático era imediatamente disposto nas lâminas de vidro, conforme explicitado a seguir.

Do total de 1 ml coletado de líquido celomático, foram utilizados 100 µl para o ensaio fagocítico, 100 µl para o ensaio de adesão celular, 100 µl para o ensaio de espraiamento celular e 20 µl para a contagem diferencial de celomócitos. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Para os demais ensaios foi utilizado volume de líquido celomático equivalente à quantidade de células que se preconizava para cada experimento (descrito nas seções seguintes). Para a avaliação da ultra estrutura dos celomócitos foram retirados aproximadamente 15 ml de líquido celomático de 3 indivíduos de cada grupo experimental.

4.8 Classificação dos celomócitos

A classificação dos celomócitos foi realizada em lâminas de vidro cobertas com lamínulas observadas sob fotomicroscópio de contraste de fase (Zeiss Standard 25, Carl Zeiss, German).

A classificação dos celomócitos foi realizada mediante características peculiares de cada tipo celular com auxílio de literatura existente (Borges et al.,

2002; Smith et al., 2006). Desse modo, as células foram classificadas da seguinte forma:

Amebócitos Fagocíticos: células com propriedades adesivas e de espraiamento, apresentam projeções citoplasmáticas como filopódios e ao aderirem é possível notar ainda a presença de lamelipódios.

Esferulócitos incolores: células esféricas com presença de grânulos citoplasmáticos incolores.

Esferulócitos vermelhos: células esféricas com presença de grânulos citoplasmáticos vermelhos.

Células Vibráteis: células esféricas, pequenas, com um único flagelo, dotadas de movimentos circulares.

4.9 Contagem relativa de celomócitos

Para a contagem relativa dos celomócitos foram contadas 100 células de campos aleatórios e obteve-se a porcentagem de cada tipo celular.

4.10 Teste de viabilidade celular

A viabilidade foi determinada pela técnica de exclusão do Azul de Tripan (0,4%) de acordo com protocolo de Freshney (1987). O Azul de Tripan é um corante vital, e sua interação com a célula é inexistente a menos que haja lesão na membrana que altere sua integridade. Desse modo, todas as células que apresentaram exclusão pelo corante foram consideradas viáveis.

Essa técnica consistiu em diluir uma alíquota de líquido celomático sem prévia diluição com o mesmo volume da solução de azul de tripan a 0,4%. Decorridos 5 minutos essa solução foi colocada em câmara de Neubauer e realizada a contagem das células viáveis nos quatro quadrantes externos. Em seguida obteve-se a porcentagem das células viáveis.

Esse ensaio foi realizado a fim de avaliar se o estresse térmico era capaz de promover a morte dos celomócitos.

4.11 Contagem de leveduras Saccharomyces cerevisiae

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizadas nos ensaios de fagocitose por serem microrganismos indutores da resposta imune por ativarem receptores de manose, além de serem de fácil obtenção e manipulação. Outro fato que levou a sua escolha foi por serem organismos não patogênicos, o que garante maior segurança para quem está manipulando a solução e por não gerar resíduos contaminantes. Por fim, experimentos com leveduras têm sido conduzidos por nossa equipe de pesquisa para organismos invertebrados e têm demonstrado boa aceitação na literatura (Borges et al., 2002; Mangiaterra, Silva, 2001; Silva, Peck, 1999; Silva, 2000; Silva et al., 2001).

As leveduras utilizadas foram obtidas comercialmente como fermento biológico fresco Fleischmann[®]. Utilizou-se uma alíquota de aproximadamente 200µg que foi diluída em 10 ml de água do mar, homogeneizada e contadas em câmara de Neubauer, nos quatro quadrantes externos.

A proporção de leveduras para cada amebócito fagocítico foi obtida na razão de 10:1, conforme estabelecido por Silva e Peck (1999).

4.12 Ensaios de fagocitose in vitro

Após coleta do líquido celomático como previamente descrito, colocou-se uma alíquota de 100 µl em lâminas de vidro durante uma hora a fim de que as células aderissem à lâmina e espraiassem. Decorrido este período, foi adicionada à lâmina uma solução de leveduras *S.cerevisiae* na proporção de 10 leveduras para cada amebócito fagocítico.

As leveduras permaneceram em contato com as células por 1 hora. Após este período, as células foram fixadas em solução de McDowell modificado (Paraformaldeído 4% e Glutaraldeído 2% diluídos em água marinha) e em seguida observadas em microscopia de fase para a avaliação dos índices fagocíticos.

Todo o ensaio de fagocitose foi realizado em câmara úmida e essa câmara foi disposta em tanques contendo água na temperatura a ser estudada, desse modo garantindo que o ensaio fosse realizado na temperatura experimental.

4.13 Teste de viabilidade fúngica

Utilizaram-se leveduras comerciais vivas (Fleishmann®) com viabilidade superior a 95%. O teste de viabilidade celular e a taxa de crescimento das leveduras foram realizados em diferentes temperaturas (0,0; 2,0 e 4,0 °C; 20,0; 25,0 e 30,0 °C) em líquido celomático (com e sem celomócitos) e em água do mar após 1 hora de incubação.

Uma solução de diacetato de fluoresceína (Sigma), diluída em acetona (5mg/ml) e brometo de etídeo (Sigma) em água do mar (50µg/ml) foi utilizada para identificar as leveduras vivas e mortas (Calich et al., 1978). As leveduras vivas emitem fluorescência verde devido à penetração do diacetato de fluoresceína, as leveduras mortas emitem fluorescência vermelha devido à penetração do brometo de etídeo. Os fluorocromos (λ 380-420nm) foram observados sob microscopia de fluorescência (Zeiss Standard 25 – com fonte de fluorescência alógena e filtro U-MWU).

4.14 Índices fagocíticos

Para o cálculo dos índices fagocíticos utilizou-se uma associação de duas técnicas: contraste de fase (visualização das leveduras internalizadas pelos amebócitos) e epifluorescência (permite identificar se as leveduras estão vivas ou mortas).

Capacidade Fagocítica: $CF = n^{\circ} de amebócitos fagocitando n^{\circ} de amebócitos total$

Índice Fagocítico: IF = n° total de leveduras fagocitadas n° de amebócitos fagocitando

Capacidade Germicida: CG = <u>número de leveduras mortas</u> 25 leveduras fagocitadas

4.15 Determinação da Capacidade Germicida do líquido celomático

Com a finalidade de verificar se a fração acelular do líquido celomático era capaz de induzir a morte de leveduras em diferentes temperaturas realizou-se a avaliação da capacidade germicida do líquido celomático.

O líquido celomático (1 ml) foi coletado conforme descrito anteriormente, colocado em eppendorff e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante era retirado, transferido para outro eppendorff e incubado com solução de leveduras *S. cerevisiae* na proporção de 1 x 10⁶ leveduras por ml de sobrenadante do líquido celomático por um período de 1 hora na mesma temperatura experimental.

Após o período de incubação, foi realizada a técnica de incorporação de solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo e a observação das lâminas em microscópio de fluorescência.

Foi avaliada a porcentagem de leveduras mortas no total de 100 leveduras observadas.

4.16 Determinação da capacidade de adesão celular

Uma alíquota (100 µl) do líquido celomático foi colocada sobre lamínulas de vidro e mantida à temperatura experimental por diferentes períodos de 2, 5, 10, 15 e 30 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas em água do mar e fixadas em solução de McDowell modificado (Paraformaldeído 4% e Glutaraldeído 2% diluídos em água marinha).

A contagem das células aderidas foi realizada em 10 campos aleatórios e estabeleceu-se uma porcentagem de células aderidas determinada pela concentração de células coletadas nos mesmos 100 µl.

Foram consideradas células aderidas aquelas em formato circular e que não se desprenderam do vidro após lavagem com água do mar.

4.17 Determinação da capacidade de espraiamento celular

Uma alíquota (100 µl) do líquido celomático foi colocada sobre lamínulas de vidro e mantida a temperatura experimental por diferentes períodos 15, 20, 30 e 60 minutos. Em seguida, as lamínulas foram lavadas em água do mar e fixadas em solução de McDowell modificado (Paraformaldeído 4% e Glutaraldeído 2% diluídos em água marinha).

A contagem de células espraiadas foi realizada em 10 campos aleatórios e estabeleceu-se uma porcentagem de células espraiadas determinada pela concentração inicial de células em 1 ml, e também excetuando a quantidade de células que nos períodos analisados encontravam-se somente aderidas.

Foram consideradas células espraiadas aquelas que apresentavam emissão de filopódios e/ou lamelipódios.

4.18 Análise ultraestrutural dos celomócitos

Para o estudo ultraestrutural dos celomócitos, a fixação foi feita em solução gelada de glutaraldeído a 2,5% em água do mar a 0°C (Hayat, 1984) por um período de 48 horas. Posteriormente ao período de fixação, o material foi lavado com água do mar por três vezes consecutivas de cinco minutos cada, de modo a retirar o excesso de fixador.

A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,2M com sacarose por 2 horas a 4 °C. Em seguida, os fragmentos foram colocados por 24 horas em solução de acetato de uranila a 0,5% em água destilada com sacarose a 1%, a 4 °C. Após essa etapa, o material foi novamente lavado em água marinha conforme citado anteriormente.

Em seguida, foi realizado o processo de desidratação em soluções alcoólicas crescentes de 70% a 100%, sendo dois banhos de 20 minutos cada um em etanol 70%, dois banhos de 20 minutos em etanol 95%, quatro banhos de 15 minutos em etanol 100%. Entre cada banho, as células foram centrifugadas a rotação de 1000 G por 10 minutos para a formação do pellet de células a fim de facilitar a retirada do álcool e também para evitar que material fosse perdido durante o processo.

Após a desidratação alcoólica, foram realizadas duas passagens pelo óxido de propileno puro durante 20 minutos cada. A infiltração foi realizada com óxido de propileno mais resina básica (Araldite) em partes iguais, durando 12 horas, com agitação em temperatura ambiente. Na seqüência os pellets foram colocados em resina pura a 37°C, depositados em moldes e levados à estufa a 70 °C, durante 3 dias.

Os blocos obtidos foram então trimados com auxílio de uma lâmina metálica e sob microscópio estereoscópio do ultramicrótomo LKB Porter Blum MT-1. Esse

procedimento foi realizado para que se retirasse o excesso de resina em torno do material incluído.

Para a microtomia de corte semifino, da ordem de 0,5µm de espessura, utilizou-se o ultramicrótomo LKB Porter Blum MT-1; esses cortes foram corados com solução de azul de toluidina por 2 minutos a fim de evidenciar um plano de corte favorável a observações posteriores em microscópio eletrônico de transmissão.

Para cortes ultrafinos de aproximadamente 70nm utilizou-se o ultramicrótomo LKB Porter Blum MT 2, cujos cortes foram coletados em telas de cobre de 300 mesh, corados com acetato de uranila a 2% em água destilada durante 1 hora e lavados em água destilada durante 30 minutos. Para as análises das telas e obtenção de micrografias eletrônicas, empregamos o microscópio eletrônico do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP (JEOL-JEM-100 CX-II).

4.19 Avaliação morfométrica dos amebócitos fagocíticos

Os celomócitos foram coletados, conforme previamente descrito e dispostos em lâmina de vidro por período de uma hora a fim de garantir o espraiamento celular. Esse procedimento foi realizado em câmara úmida e à temperatura experimental a ser estudada (20,0; 25,0 e 30,0 °C).

Para avaliação morfométrica dos amebócitos fagocíticos, foram obtidas imagens suficientes para visualização de pelo menos 100 amebócitos fagocíticos. As imagens foram adquiridas com objetiva de 40 X no microsópio de contraste de fase Standard 25 S, Carl Zeiss, German.

Em seguida, as imagens foram submetidas a análises morfométricas no programa Image J (NIH), em que foram avaliadas as seguintes medidas: área de espraiamento, perímetro, diâmetro de Feret e circunferência celular.

4.20 Ensaio de migração celular – time lapse

Para avaliar a migração dos celomócitos sem a presença de agente quimiotático, utilizou-se ensaio em vídeo microscopia por *time lapse*.

Os celomócitos foram plaqueados (2 x 10³ por ml) em placas de cultura de 35 mm de diâmetro. Foi adicionado à placa meio de cultura MEM marinho – *Minimal Essential Medium* suplementado com 10% de SFB, 2% de NEAA e 1% de antibiótico (Lin et al., 2001). O ensaio foi realizado em aumento de 200x no microscópio Axiovert 135 (Carl Zeiss, Alemanha), equipado com contraste de fase e camera digital Infinity II, Lumenera conectada a um computador com software de aquisição de imagens. As imagens foram capturadas em intervalos de 10 minutos em um tempo total de 12 horas.

Todo o ensaio foi realizado nas temperaturas de 20,0; 25,0 e 30,0°C. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Para análise das imagens obtidas foi gerado um *stack* com auxilio do software Image J (NIH). Foram analisados os seguintes parâmetros: velocidade (µm/h), distância percorrida (µm) e direcionalidade. Essas análises foram realizadas com auxilio do *plug in* Track do software Image J que permite o desenho manual do trajeto percorrido pelas células para posterior obtenção dos parâmetros anteriormente mencionados.

4.21 Ensaio de migração celular frente a gradiente quimiotático – transwell

Para avaliar a migração dos celomócitos frente a um gradiente quimiotático, utilizou-se ensaios de migração em câmaras bipartes transwell em placas de cultura de 12 poços. A câmara biparte é composta por dois compartimentos distintos, separados por uma membrana de policarbonato com poros de 5 µm de diâmetro (Corning). Na parte superior da câmara colocam-se as células que pretende-se analisar juntamente com meio de cultura, e na parte inferior coloca-se o meio de cultura acrescido de substâncias controle (que sabidamente não induzam a migração) e substâncias quimiotáticas (nesse experimento utilizou-se soro fetal bovino 20% como controle positivo). Esse sistema faz com que ocorra a migração unidirecional das células em favor ao agente quimiotático.

Os celomócitos (2 x 10⁵) foram colocados na porção superior da câmara transwell e deixados por 2 horas para garantir a adesão. Após esse período foi adicionado meio de cultura MEM marinho – *Minimal Essential Medium* suplementado com 2% de SFB, 2% de NEAA e 1% de antibiótico (Lin et al., 2001). O período de 2 horas de adesão não é prejudicial as células, uma vez que em ensaios pilotos observou-se que essas são capazes de sobreviver sem adição de meio de cultura por até 4 horas. Na porção inferior da câmara foram adicionados dois controles negativos, sendo água do mar filtrada e meio de cultura MEM marinho com a mesma

suplementação previamente descrita e como agente quimiotático, suspensão de leveduras *S. cerevisiae* (a mesma utilizada em ensaios de fagocitose) na concentração de 1 x 10⁶ diluída em água do mar artificial.

O período de migração foi estabelecido em 12 horas após adesão. Todo o ensaio foi realizado em câmara úmida e em estufa de cultura celular com temperatura ajustada para 20,0; 25,0 e 30,0°C.

Decorrido o período de migração, as células foram fixadas com vapor de formol por 20 minutos. Em seguida a membrana foi lavada com PBS em três banhos de 5 minutos cada. A coloração da membrana foi realizada com cristal de violeta 0,05% diluído em etanol 70% por 20 minutos e a membrana foi novamente lavada em PBS em três banhos de 5 minutos cada. A porção superior da membrana foi limpa com auxílio de uma haste flexível com algodão para garantir que as células que não migraram fossem removidas e não interferissem na análise dos dados.

A membrana foi então transferida para uma lâmina de vidro, onde foi colocada uma lamínula e foram analisados 10 campos aleatórios com aumento de 400X em microscópio Standard 25 ICS, Carl Zeiss. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.22 Imunocitoquímica para actina

Aproximadamente 2 x 10⁵/ml de celomócitos de animais previamente expostos a temperaturas ambientais foram dispostos em lamínulas circulares de 13 mm em placas de 12 poços. As células espraiaram por 1 hora em câmara úmida na mesma temperatura experimental.

As lamínulas contendo células foram fixadas em solução de paraformaldeído marinho 4% em solução de bloqueio (NGS 3%, BSA 1% e PBST 0,3%) por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS (3x) e então foi adicionado o tampão de bloqueio (soro albumina bovina 1% em PBS/Triton X-100 0,3%), durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Após este período, as lamínulas foram incubadas com faloidina conjugada à Rodamina (Molecular Probes, diluído 1:100 em PBS), por um período de 1 hora. As lamínulas foram lavadas (3 x) com tampão PBS, por um período de 5 min por lavagem. Após as lavagens, as lamínulas foram montadas em lâminas contendo 1 gota de Vectashield conjugado com DAPI para visualização do núcleo. Após a secagem das lamínulas, estas foram mantidas protegidas da luz e analisadas no Microscópio de Fluorescência Carl Zeiss.

4.23 Análise da expressão de integrina β1 por citometria de fluxo

Os celomócitos foram coletados conforme explanado anteriormente, foram plaqueados na quantidade de 2 x 10⁶ em placas de cultura de células de 35 mm de diâmetro a 20°C em câmara úmida. Após 1 hora (tempo necessário de espraiamento), o sobrenadante foi retirado e descartado. Essa última etapa foi realizada uma vez que a única célula que possui capacidade de adesão é o amebócito fagocítico, célula esta em que necessitamos avaliar a expressão de integrina. Os demais tipos celulares não possuem moléculas de adesão e por essa razão são encontradas no sobrenadante. Após a retirada do sobrenadante, as células foram fixadas com solução de McDowell salino por 1 hora. Para a remoção das células aderidas, a placa de cultura foi disposta em isopor com gelo por aproximadamente 15 minutos e então as células eram soltas com auxílio de um scrap. Foram realizadas 3 lavagens com PBS de 5 minutos cada e adicionado 1 ml de tampão para citometria (PBS e azida a 0,02%). No intervalo de cada lavagem com PBS e antes de adicionar o tampão para citometria, foram realizadas centrifugações a 1500 x g por 10 minutos e descarte do sobrenadante. A incubação foram realizadas novas lavagens com PBS e a incubação do anticorpo secundário conjugado a FITC foi realizada no escuro por 45 minutos. Em seguida, novas lavagens com PBS foram realizadas e após a última, foi adicionado 1 ml de tampão para citometria. Foram analisados 10000 eventos em citômetro BD Facs Canto do Depto de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas e a análise dos resultados obtidos foi realizada através do programa FlowJo.

4.24 Análise da expressão das GTPases Rho A e Rac 1 por citometria de fluxo

Os celomócitos foram coletados conforme explanado anteriormente, plaqueados na quantidade de 2 x 10⁶ em placas de cultura de células de 35 mm de diâmetro a 20 °C em câmara úmida. Após 1 hora (tempo necessário de espraiamento), o sobrenadante foi retirado e descartado. Essa última etapa foi realizada uma vez que a única célula que possui capacidade de adesão é o amebócito fagocítico, célula esta em que será analisada a expressão das GTPases. Os demais tipos celulares não possuem moléculas de adesão e por essa razão são encontradas no sobrenadante. Após retirada do sobrenadante, as células foram

fixadas com solução de McDowell salino por 1 hora. Para a remoção das células aderidas, a placa de cultura foi disposta em isopor com gelo por aproximadamente 15 minutos e então as células eram soltas com auxílio de um scrap. Foram realizadas 3 lavagens com PBS de 5 minutos cada e adicionado o fixador CytoFix por 20 minutos a 4 °C e as amostras foram lavadas brevemente com Cytoperm (BD). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos anti Rho A e anti Rac 1 (Santa Cruz, diluição 1:50) por 2 horas a 4 °C. As células foram novamente lavadas com cytoperm (BD) e foram incubadas com anticorpo secundário (Jackson Immunoresearch, 1:100[™]). As células foram novamente lavadas com cytoperm (BD) por duas vezes, centrigugadas e ressuspendidas em 250 µl de tampão FACS (0,02% azida sódica e 2% SFB em PBS) por 30 minutos no gelo. No intervalo de cada lavagem com PBS e antes de adicionar o tampão para citometria, foram realizadas centrifugações a 1500 x g por 10 minutos e descarte do sobrenadante. Foram analisados 10000 eventos em citômetro BD Facs Canto do Depto de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas e a análise dos resultados obtidos foi realizada através do programa FlowJo.

4.25 Produção de ânion superóxido

A Produção de ânion superóxido foi avaliada através da redução da substância "*nitroblue tetrazolium*" (NBT).

Para promover a adesão das células, 100µl de liquido celomático (aproximadamente 2 x 10⁶) e 100µl de meio de cultura foram colocados em uma placa de 96 poços de fundo chato e incubados por 30 minutos à temperatura experimental de 20,0; 25,0 e 30,0 °C. Em seguida foi adicionada solução de 100µl de NBT 0,3% por 2 horas e incubadas a 37 °C. Decorrido o período de 2 horas foi adicionado 100µl de metanol 100% em cada poço para interromper a reação. Em seguida foi realizada lavagem com metanol 70% e secagem ao ar.

Para a leitura foram adicionados 120 µl de KOH 2M e 140µl de dimetil sulfoxido (DMSO), a placa foi lida em um leitor de ELISA no comprimento de onda de 630 nm.

4.26 Expressão da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada através de sua habilidade de inibir as reações dependentes do radical superóxido. Foi utilizado o kit Ransod (Randox, Crumlin, UK). Foi realizada uma mistura de volume total de 1,7ml contendo xantina 0,05mM e 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazolio (INT, 0,025 mM) dissolvido em 50 mM CAPS (pH 10,2) e 0,94 mM EDTA. Na presença de xantina oxidase (80U ⁻¹/250ml), ocorre a produção de superóxido e xantina. O radical superóxido reage com a substância INT para produzir o formozan. A densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 505 nm na temperatura utilizada para os testes (20,0; 25,0 e 30,0 °C). Uma solução padrão de SOD, fornecida no kit Ransod foi utilizada. Uma unidade de SOD foi definida com a quantidade necessária para inibir a taxa de xantina em 50%. A atividade de SOD foi expressa como U.ml⁻¹.

5 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Todos os experimentos acima explicitados foram realizados em triplicata.

Os dados obtidos foram analisados por one-way ANOVA usando os pressupostos do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e do teste de Bartlett para avaliação da homogeneidade de variâncias. As médias foram comparadas pelo pós-teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significantes quando o P<0,05.

6 RESULTADOS

6.1 Observação dos animais

Os animais de todas as espécies foram observados diariamente durante o período experimental para avaliar possíveis alterações comportamentais em decorrência do aumento de temperatura.

Foi possível observar que ouriços-do-mar da espécie *Sterechinus neumayeri* expostos à temperatura de 4,0 °C por 7 dias apresentaram diminuição do reflexo de virar, bem como da movimentação de seus espinhos. Animais expostos a 4,0 °C por 14 dias igualmente apresentaram diminuição do reflexo de virar e queda dos espinhos. Além disso, 60% dos ouriços-do-mar apresentaram, do 10° ao 14° dia de experimento, liberação dos gametas na água. Apesar das alterações observadas, nenhum ouriço veio a óbito durante o período experimental.

Na espécie Lytechinus variegatus observou-se redução do reflexo de virar e diminuição da movimentação dos espinhos em animais expostos à temperatura de 25,0 °C por 14 dias. Já os animais expostos a 30,0 °C apresentaram em sua totalidade (100%) alterações comportamentais que independiam do tempo em que foram expostos. A liberação de gametas na água ocorreu em todos os grupos amostrais, sendo mais intensa em animais expostos a 30,0 °C por 14 dias, em que 100% dos animais apresentaram essa alteração. Nenhum animal se aderiu às laterais dos tanques durante todo o período experimental avaliado. O reflexo de virar também esteve presente em todos os grupos analisados, porém os animais encontravam-se mais severamente afetados à temperatura de 30,0 °C por 14 dias, sendo que a partir do 8º dia os animais já estavam severamente debilitados e 4 animais do total de 5 apresentaram grave diminuição do reflexo de virar. No 12° dia experimental observou-se sua total ausência em 3 do total de 5 animais (60%). Além disso, 100% dos animais analisados à temperatura de 30,0 °C apresentaram ausência do reflexo da lanterna de Aristóteles. Apesar das alterações observadas, nenhum ouriço veio a óbito durante o período experimental.

Na espécie *Echinometra lucunter* não foi observada nenhuma alteração comportamental independente do período e temperatura de exposição. Os ouriços permaneceram com reflexo de virar presente, a movimentação dos espinhos era semelhante aos animais do grupo controle. Não se observou liberação dos gametas mesmo à temperatura mais extrema e nos períodos mais longos de exposição.

O reflexo da lanterna de Aristóteles estava presente em 100% dos animais. Também não se observou óbito de nenhum animal nestes períodos.

6.2 Contagem diferencial de celomócitos

Em todas as espécies analisadas, foi possível observar que o amebócito fagocitico foi o tipo celular predominante (Figura 10).

Na espécie *Sterechinus neumayeri* observou-se aumento significativo de esferulócitos vermelhos no período agudo para a temperatura de 2,0 °C quando comparado com o grupo controle (P<0,05). Observou-se ainda esse mesmo fenômeno nos períodos crônicos de 7 dias e 14 dias (P<0,05). Os esferulócitos vermelhos foram as únicas células que apresentaram diferença significativa nessa espécie (Tabela 1 e Figura 11).

Na espécie *Lytechinus variegatus* observou-se aumento significativo (P<0,05) de esferulócitos incolores (EI) em animais expostos às temperaturas de 25,0 e 30,0 °C por 2 dias quando comparados o mesmo período à temperatura de 20,0 °C; o mesmo fenômeno foi observado com o período de exposição de 7 dias para as temperaturas de 25,0 e 30,0 °C. Ainda nessa espécie, detectou-se aumento de esferulócitos vermelhos no período crônico de exposição, sendo que em 2 dias de exposição houve aumento significativo a 25,0 °C (P<0,01) e 30,0 °C (P<0,05) quando comparado com o grupo controle; em 7 e 14 dias foi possível observar aumento deste tipo celular às temperaturas de 25,0 e 30,0 °C comparado com a temperatura controle (P<0,05). (Tabela 2 e Figura 12).

Para a espécie *Echinometra lucunter* observou-se aumento significativo da proporção de El no período de exposição de 2 e 7 dias somente à temperatura de 25,0 °C. Observou-se ainda aumento na porcentagem de EV em animais expostos aos períodos agudo (24 horas) e crônicos de 2 e 7 dias a 30,0 °C. No período de exposição agudo observou-se aumento desse tipo celular somente à temperatura de 30,0 °C, já nos períodos crônicos de exposição, as temperaturas de 25,0 e 30,0 °C foram capazes de induzir aumento dos EV (P<0,05) (Tabela 3 e Figura 13).



Figura 10. Celomócitos do celoma perivisceral de ouriços-do-mar a fresco sob microscopia de fase. É possível observar amebócitos fagocíticos da espécie *S. neumayeri* predominantemente na forma filopodial (seta preta) e esferulócitos vermelhos (setas brancas).
Período/ Tipo	AF	El	EV	CV
Celular				
Agudo 0,0 °C	65,7±1,99	21,6±3,85	5,2±1,92 ^a	7,5±2,91
Agudo 2,0 °C	50,0±3,31	24,2±1,92	18,6±4,72 ^b	6,6±1,52
Agudo 4,0 °C	49,0±7,97	28,2±6,42	13,0±4,85 ^{ab}	9,8±2,39
Crônico 2d 0,0 °C	61,71±7,87	17,57±2,94	11,28±7,36	9,28±5,02
Crônico 2d 2,0 °C	54,81±4,96	25,0±4,24	12,38±5,52	7,81±3,02
Crônico 2d 4,0 °C	58,62±9,13	18,69±3,59	15,31±7,67	7,46±3,10
Crônico 7d 0,0 °C	65,71±6,21	20,29±3,86	8,29±4,68 ^a	6,00±2,24
Crônico 7d 2,0 °C	55,31±9,87	19,77±7,94	21,31±8,84 ^b	5,15±1,95
Crônico 7d 4,0 °C	58,95±8,12	20,58±8,35	5,98±2,69 ^a	14,30±9,12
Crônico 14d 0,0 °C	69,25±10,08	20,00±7,26	4,00±3,37ª	5,50±2,52
Crônico 14d 2,0 °C	60,88±6,45	18,00±4,90	15,25±10,87 ^b	5,75±2,76
Crônico 14d 4,0 °C	57,63±5,50	20,03±5,15	5,88±2,10 ^a	9,50±3,50

Tabela 1. Média e desvio padrão em porcentagem de cada tipo celular de celomócitos de ouriços-do-mar *S. neumayeri* expostos a diferentes temperaturas por diferentes períodos.

AF Amebócito Fagocítico. El Esferulócito Incolor. EV Esferulócito Vermelho. CV Célula Vibrátil. D dias. As indicações "a" e "b" referem-se a diferenças significativas observadas entre os grupos. P<0,05.

Período/ Tipo Celular	AF	El	EV	CV
Agudo 20,0 °C	53,67±1,53	11,67±1,53	19,67±1,15	15,00±3,46
Agudo 25,0 °C	47,40±5,59	17,40±4,16	20,00±5,15	15,20±3,42
Agudo 30,0 °C	49,40±4,28	21,00±4,06	13,80±5,02	15,80±3,03
Crônico 2d 20,0 °C	67,60±3,36	6,20±2,77 ^a	4,20±1,79 ^a	22,00±5,61
Crônico 2d 25,0 °C	42,20±3,77	19,80±5,54 ^b	24,00±2,64 ^b	15,80±3,42
Crônico 2d 30,0 °C	60,80±8,40	16,60±3,78 ^b	12,20±7,53 ^b	10,20±2,68
Crônico 7d 20,0 °C	65,30±3,36	7,80±2,77 ^a	5,00±1,79 ^a	21,90±5,61
Crônico 7d 25,0 °C	55,20±3,11	17,20±4,21 ^b	12,20±3,11 ^b	15,40±1,52
Crônico 7d 30,0 °C	55,00±18,23	10,25±7,97 ^{ab}	18,00±6,97 ^b	16,50±5,19
Crônico 14d 20,0 °C	64,90±3,36	12,10±2,77	6,90±1,78 ^a	16,10±5,61
Crônico 14d 25,0 °C	66,40±4,77	9,60±4,92	11,80±1,30 ^b	12,20±0,83
Crônico 14d 30,0 °C	63,33±3,78	9,33±2,51	19,66±1,53 ^b	7,67±3,51

Tabela 2. Média e desvio padrão em porcentagem de cada tipo celular de celomócitos de ouriços-do-mar *L. variegatus* expostos a diferentes temperaturas por diferentes períodos.

AF Amebócito Fagocítico. El Esferulócito Incolor. EV Esferulócito Vermelho. CV Célula Vibrátil. D dias. As indicações "a" e "b" referem-se a diferenças significativas observadas entre os grupos. P<0,05.

Período/ Tipo	AF	El	EV	CV
Celular				
Agudo 20,0 °C	71,40±2,07	3,20±0,83	2,60±1,1,4 ^a	23,20±1,78
Agudo 25,0 °C	60,20±3,83	5,20±1,64	6,20±2,58 ^a	28,40±2,60
Agudo 30,0 °C	63,00±1,41	4,60±1,51	11,00±2,73 ^b	21,40±2,96
Crônico 2d 20,0 °C	69,60±2,65	2,70±0,85 ^a	2,50±0,98ª	24,90±2.45
Crônico 2d 25,0 °C	55,00±3,31	10,00±3,67 ^b	12,60±3,50 ^b	22,60±3,43
Crônico 2d 30,0 °C	62,50±2,15	4,50±1,85ª	10,00±2,,24 ^b	23,00±3,23
Crônico 7d 20,0 °C	70,80±1,75	3,00±0,75 ^a	3,00±1,10 ^a	23,20±2,34
Crônico 7d 25,0 °C	49,60±2,70	11,60±3,84 ^b	17,80±4,20 ^b	21,00±6,96
Crônico 7d 30,0 °C	58,00±1,90	4,60±2,10 ^a	17,50±1,90 ^b	19,90±2,70
Crônico 14d 20,0 °C	71,00±2,35	2,90±0,81	2,80±1,20	23,30±2,10
Crônico 14d 25,0 °C	75,20±2,94	2,00±0,70	2,40±0,54	20,40±3,20
Crônico 14d 30,0 °C	63,00±1,80	4,80±1,20	9,50±2,54	22,70±3,10

Tabela 3. Média e desvio padrão em porcentagem de cada tipo celular de celomócitos de ouriços-do-mar *E. lucunter* expostos a diferentes temperaturas por diferentes períodos.

AF Amebócito Fagocítico. El Esferulócito Incolor. EV Esferulócito Vermelho. CV Célula Vibrátil. D dias . As indicações "a" e "b" referem-se a diferenças significativas observadas entre os grupos. P<0,05.



Figura 11. Proporção dos tipos celulares em ouriços-do-mar antárticos *Sterechinus neumayeri.* Os animais foram expostos a diferentes temperaturas 0,0 °C (controle), 2,0 °C e 4,0 °C por diferentes períodos de exposição. A. Exposição aguda – 24 horas. B. Exposição por 2 dias. C. Exposição por 7 dias . D. Exposição por 14 dias.



Figura 12 . Proporção dos tipos celulares em ouriços-do-mar tropicais *Lytechinus variegatus.* Os animais foram expostos a diferentes temperaturas 20,0 °C (controle), 25,0 °C e 30,0 °C por diferentes períodos de exposição. A. Exposição aguda – 24 horas. B. Exposição por 2 dias. C. Exposição por 7 dias . D. Exposição por 14 dias.



Figura 13. Proporção dos tipos celulares em ouriços-do-mar antárticos *Echinometra lucunter.* Os animais foram expostos a diferentes temperaturas 20,0 °C (controle), 25,0 °C e 30,0 °C por diferentes períodos de exposição. A. Exposição aguda – 24 horas. B. Exposição por 2 dias. C. Exposição por 7 dias . D. Exposição por 14 dias.

6.3 Viabilidade Celular

A viabilidade celular dos celomócitos de ouriços-do-mar foi avaliada em todas as espécies e em todos os períodos experimentais. Observou-se, para todos os períodos analisados, que a viabilidade se manteve acima de 97% e diferenças significativas não foram observadas entre os grupos experimentais para nenhuma espécie.

6.4 Fagocitose in vitro

A fagocitose *in vitro* confirmou que o amebócito fagocítico é a única célula capaz de realizar fagocitose independente do tratamento utilizado (Figura 14).

Para a espécie Antártica *Sterechinus neumayeri,* a análise dos índices fagocíticos mostrou que apenas no período agudo foi possível observar diferença significativa, sendo que a Capacidade Fagocítica (CF) foi maior a 2,0 °C quando comparado ao controle (P<0,05). A Capacidade Germicida (CG) também foi maior a 2,0 °C (P<0,01). Nos demais períodos analisados não houve diferenças significativas (Tabela 4 e Figuras 15 a 17).

Observou-se para a espécie antártica uma correlação positiva entre a porcentagem de esferulócitos vermelhos e o aumento da capacidade fagocítica no período agudo conforme Figura (Figura 18).

Observações para a espécie tropical *Lytechinus variegatus* revelaram que a Capacidade Fagocítica (CF) diminuiu significativamente em animais expostos a 25,0 e 30,0 °C durante a exposição aguda (P<0,05) e também houve diminuição significativa para a temperatura de 30,0 °C quando comparados com o grupo controle (20,0 °C) nos seguintes períodos: 2 e 7 dias (P<0,01). No período de 14 dias a análise revelou diminuição significativa (P<0,01) entre o grupo controle e as duas temperaturas experimentais (25,0 e 30,0 °C). O índice fagocítico (IF) foi menor (P<0,05) a 30,0 °C nos períodos de 2 e 7 dias quando comparados ao grupo controle. A Capacidade Germicida (CG) mostrou um aumento significativo (P<0,05) a 25,0 °C seguido de uma diminuição (P<0,05) a 30,0 °C durante o período agudo de exposição. (Tabela 5 e Figuras 19 a 21).

A espécie *Echinometra lucunter* não apresentou diferença significativa em nenhum índice fagocítico analisado, independente da temperatura e do tempo de exposição empregados. No entanto, observou-se uma leve tendência a diminuição na CF em animais expostos a temperaturas experimentais de 25,0 e 30,0 °C quando comparadas com o grupo controle, ainda assim não se notou que essa tendência fosse proporcional ao período de exposição. (Tabela 6 e Figuras 22 a 24).



Figura 14. Fagocitose *in vitro* de Amebócito Fagocitico (AF) de ouriços-domar. Observa-se AF espraiados do celoma perivisceral de ouriços-do-mar da espécie *S. neumayeri*, com evidente visualização de lamelipódios (seta preta), notase ainda a fagocitose de três leveduras (seta branca)

Período/	Тіро	CF	IF	CG	CGLC
Celular					
Agudo 0,0 °C		14,36±9,45 ^a	2,11±0,20	2,66±1,53 ^a	6,42±3,56
Agudo 2,0 °C		43,15±16,71 ^b	2,11±0,25	14,80±2,17 ^b	5,36±3,88
Agudo 4,0 °C		24,64±8,46 ^a	1,74±0,34	3,85±3,03 ^a	4,14±3,94
Crônico 2d 0,0 °	С	28,16±5,94	1,89±0,20	4,39±1,98	8,58±6,99
Crônico 2d 2,0 º	С	27,83±16,12	1,89±0,42	2,15±3,03	2,77±2,83
Crônico 2d 4,0 °	С	27,78±17,45	2,04±0,59	2,82±2,35	2,91±1,25
Crônico 7d 0,0 º	С	23,28±12,77	1,74±0,28	5,71±5,36	1,69±0,66
Crônico 7d 2,0 º	С	15,29±6,59	1,80±0,34	1,79±0,48	1,80±0,34
Crônico 7d 4,0 º	С	26,87±1,02	2,09±0,38	1,72±0,32	2,09±0,38
Crônico 14d 0,0	٥C	13,28±5,97	2,11±0,55	2,47±1,17	2,11±0,55
Crônico 14d 2,0	٥C	17,10±10,47	2,06±0,22	1,48±0,38	2,06±0,22
Crônico 14d 4,0	٥C	13,29±6,36	2,03±0,68	1,88±0,33	2,03±0,68

Tabela 4. Média e desvio padrão dos Índices Fagocíticos de ouriços-do-mar *S. neumayeri* expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos.

CF Capacidade Fagocítica. IF Índice Fagocítico. CG Capacidade Germicida CGLC Capacidade Germicida do líquido celomático sem a fração celular . As indicações "a" e "b" referem-se a diferenças significativas observadas entre os grupos. P<0,05.



Figura 15. Capacidade Fagocítica (CF) de S. *neumayeri.* Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos. Observou-se aumento significativo neste parâmetro em 2,0 °C no período agudo (24 horas) de exposição.



Figura 16. Índice Fagocítico (IF) de *S. neumayeri.* Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos. Não foi observada diferença significativa em nenhum período analisado.



Figura 17. Capacidade Germicida (CG) de S. *neumayeri.* Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos. Observou-se aumento significativo neste parâmetro em 2,0 °C no período agudo (24 horas) de exposição.



Figura 18. Correlação entre Capacidade Fagocítica e porcentagem de Esferulócitos Vermelhos em ouriço-do-mar *S. neumayeri.* Observa-se uma correlação positiva entre a porcentagem de esferulócitos vermelhos e a capacidade fagocítica.

Período/ Tipo Celular	CF	IF	CG	CGLC
Agudo 20,0 °C	60,66±1,93 ^a	1,59±0,13	10,10±1,24 ^a	7,08±1,20
Agudo 25,0 °C	41,61±4,52 ^b	1,73±0,06	26,00±2,35 ^b	8,09±2,13
Agudo 30,0 °C	32,80±3,89 ^b	1,32±0,05	9,87±1,13 ^a	7,88±0,98
Crônico 2d 20,0 °C	75,46±4,89 ^a	1,95±0,13 ^a	12,09±2,08	6,98±2,14
Crônico 2d 25,0 °C	64,60±2,79 ^a	1,72±0,12 ^a	11,78±1,07	8,08±2,08
Crônico 2d 30,0 °C	22,80±5,63 ^b	1,39±0,24 ^b	10,89±1,65	7,65±1,25
Crônico 7d 20,0 °C	75,00±3,46 ^a	1,91±0,06 ^a	9,86±0,98	8,02±1,22
Crônico 7d 25,0 °C	63,00±5,38 ^a	1,65±0,08ª	11,32±1,27	7,86±3,00
Crônico 7d 30,0 °C	27,00±1,41 ^b	1,52±0,09 ^b	12,98±3,01	10,01±3,12
Crônico 14d 20,0 °C	74,30±2,87 ^a	1,89±0,15	11,09±1,60	8,17±2,87
Crônico 14d 25,0 °C	29,84±3,90 ^b	1,55±0,08	9,95±1,32	9,80±2,30
Crônico 14d 30,0 °C	12,40±4,20 ^b	1,42±0,15	10,12±2,90	8,10±1,20

Tabela 5. Média e desvio padrão dos Índices Fagocíticos de ouriços-do-mar *L. variegatus* expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos.

CF Capacidade Fagocítica. IF Índice Fagocítico. CG Capacidade Germicida CGLC Capacidade Germicida do líquido celomático sem a fração celular. As indicações "a" e "b" referem-se a diferenças significativas observadas entre os grupos. P<0,05.



Figura 19. Capacidade Fagocítica (CF) de *L. variegatus*. Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos. As indicações com asteriscos (*) indicam diferença estatística em comparação com o grupo controle (20,0 °C). Nota-se diminuição significativa na temperatura de 30,0 °C em todos os períodos analisados. P<0,05.



Figura 20. Índice Fagocítico (IF) de *L. variegatus*. Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos. Observou-se diminuição significativa na temperatura de 30,0 °C nos períodos de 2 e 7 dias quando comparados com o grupo controle. P<0,05.



Figura 21. Capacidade germicida de *L. variegatus*. Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos. Foi observado aumento significativo em 25,0 °C somente no período agudo indicado pelo asterisco. P<0,05.

Período/ Tipo	CF	IF	CG	CGLC
Celular				
Agudo 20,0 °C	67,42±1,37	1,61±0,22	10,00±1,50	6,50±2,40
Agudo 25,0 °C	53,50±4,43	1,54±0,16	13,00±2,20	7,50±3,00
Agudo 30,0 °C	51,77±5,73	1,52±0,15	10,25±2,50	6,70±3,50
Crônico 2d 20,0 °C	65,35±1,50	1,65±0,25	12,00±2,00	7,00±4,30
Crônico 2d 25,0 °C	57,12±2,65	1,58±0,06	10,50±2,90	6,00±2,50
Crônico 2d 30,0 °C	52,65±4,85	1,45±0,60	11,40±3,00	7,00±0,90
Crônico 7d 20,0 °C	67,00±1,75	1,63±0,32	13,50±1,89	7,00±2,40
Crônico 7d 25,0 °C	61,61±2,66	1,73±0,20	16,00±3,50	7,00±1,90
Crônico 7d 30,0 °C	55,00±4,35	1,60±0,10	12,00±2,50	8,00±1,20
Crônico 14d 20,0 °C	66,98±1,85	1,70±0,27	11,00±2,20	5,00±3,50
Crônico 14d 25,0 °C	46,22±1,48	1,63±0,28	9,75±4,20	5,50±1,80
Crônico 14d 30,0 °C	52,00±3,35	1,50±0,12	13,30±4,30	8,50±2,80

Tabela 6. Média e desvio padrão dos Índices Fagocíticos de ouriços-do-mar *E. Lucunter* expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos.

CF Capacidade Fagocítica. IF Índice Fagocítico. CG Capacidade Germicida CGLC Capacidade Germicida do líquido celomático sem a fração celular



Figura 22. Capacidade Fagocítica (CF) de *E.lucunter*. Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos. Não foi observada diferença significativa em nenhum período e temperatura.



Figura 23. Índice Fagocítico (IF) de *E.lucunter*. Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos. Não foi observada diferença significativa em nenhum período e temperatura.



Figura 24. Capacidade germicida de *E. lucunter*. Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos. Não foi observada diferença significativa em nenhum período e temperatura.

6.5 Capacidade germicida da fração acelular do líquido celomático

A capacidade germicida do líquido celomático excluída a fração celular revelou índice inferior a 10% em todos os períodos analisados e demonstrou também que não houve diferença significativa entre as temperaturas e períodos analisados. Também não foi possível observar diferenças entre as espécies analisadas (Figuras 25 a 27 e Tabelas 4 a 6).



Figura 25. Capacidade Germicida do líquido Celomático de *S. neumayeri*. . Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos. Não foi observada diferença significativa em nenhum período e temperatura.



Figura 26. Capacidade Germicida do líquido Celomático de *L. variegatus.* Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos. Não foi observada diferença significativa em nenhum período e temperatura.



Figura 27. Capacidade Germicida do líquido Celomático de *E. lucunter*. Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por diferentes períodos. Não foi observada diferença significativa em nenhum período e temperatura.

6.6 Capacidade de adesão e espraiamento celular

Foi possível observar que celomócitos de ouriços-do-mar *Sterechinus neumayeri* do grupo controle (0,0 °C) iniciaram a adesão ao vidro em 5 minutos e a taxa máxima de adesão nesse grupo foi de 15 minutos. Celomócitos de animais expostos a temperaturas mais altas apresentaram um retardo neste parâmetro: à temperatura de 2,0 °C a adesão iniciou em 10 minutos, alcançando um pico em 20 minutos; a 4,0 °C a adesão teve início aos 20 minutos, porém com reduzido número de células aderidas (30%) (Figura 28).

No grupo controle, o espraiamento iniciou em 15 minutos e a taxa máxima de espraiamento ocorreu aos 60 minutos. Na temperatura de 2,0 °C, o espraiamento começou aos 30 minutos e a 4,0 °C esse parâmetro foi severamente afetado. (Figura 29)

Os dados de adesão e espraiamento para a espécie antártica foram avaliados somente durante o período agudo de exposição.

Em Lytechinus variegatus o grupo controle (20,0 °C) apresentou início de adesão em 5 minutos em todos os períodos analisados. À temperatura de 25,0 °C o tempo inicial de adesão foi de 10 minutos em todos os períodos analisados. Foi possível ainda observar retardo na adesão celular à temperatura de 30,0 °C, sendo que o início da adesão foi de 15 minutos para AF de animais expostos por 24 horas, 2 e 7 dias. A exposição crônica de 14 dias culminou em um retardo ainda maior do inicio de adesão celular que iniciou aos 30 minutos, sendo que no período 14 dias a 30,0 °C a taxa de adesão foi de 26%. (Figuras 30 e 31)

Para a mesma espécie, o espraiamento apresentou alteração somente à temperatura de 30,0 °C, em que o espraiamento foi iniciado aos 30 minutos, aos 14 dias de exposição o espraiamento também teve início aos 30 minutos porém com apenas 20% de espraiamento. (Figuras 32 e 33).

Para *Echinometra lucunter* expostos à temperatura controle os tempos iniciais de adesão e espraiamento foram similares ao controle da espécie *L. varigatus*, no entanto não foi demonstrada nenhuma alteração nesses parâmetros independente da temperatura e dos períodos de exposição (Figuras 34 e 35).



Figura 28. Porcentagem de adesão celular em ouriços-do-mar *S. neumayeri.* Os animais foram expostos à diferentes temperaturas por período agudo (24 horas). Observa-se que na temperatura mais elevada ocorre um retardo importante no início da adesão e também uma significativa redução da mesma quando comparado com os demais grupos.



Figura 29. Porcentagem de espraiamento celular em ouriços-do-mar *S. neumayeri.* Os animais foram expostos a diferentes temperaturas por período agudo (24 horas). Observa-se que a temperatura mais elevada foi a que mais apresentou alterações importantes.



Figura 30. Tempo inicial de adesão celular em ouriços-do-mar *L. variegatus.* Os animais foram expostos a diferentes temperaturas por período agudo (24 horas). Observa-se que na temperatura mais elevada ocorre um retardo importante no início da adesão e também uma visível redução da mesma quando comparado com os demais grupos.



Figura 31. Porcentagem de adesão celular em ouriços-do-mar *L. variegatus.* Observou-se uma diminuição na porcentagem de adesão celular nas temperaturas experimentais (25,0 e 30,0 °C) em todos os períodos analisados.



Figura 32. Tempo inicial de espraiamento celular em ouriços-do-mar *L. variegatus.* Os animais foram expostos a diferentes temperaturas por período agudo (24 horas). Observa-se que as temperaturas 20,0 e 25,0 °C apresentam tempo inicial de espraiamento em 15 minutos. Diferentemente, a temperatura de 30,0 °C retardou o tempo inicial de espraiamento para 30 minutos.



Figura 33. . Porcentagem de espraiamento celular em ouriços-do-mar *L. variegatus.* Observou-se uma diminuição na porcentagem de espraiamento celular na temperatura de 30,0 °C em todos os períodos analisados.



Figura 34 . **Porcentagem de adesão celular em ouriços-do-mar** *E. lucunter.* Não foi observada diferença significativa em nenhum período e temperatura analizada.



Figura 35. Porcentagem de espraiamento celular em ouriços-do-mar *E. lucunter.* Não foi observada diferença significativa em nenhum período e temperatura analizada.

6.7 Análise ultraestrutural dos celomócitos

Dos quatro tipos celulares presentes no celoma perivisceral de ouriços-domar, apenas três células foram observadas na MET. O Amebócito Fagocítico apresentou núcleo grande, central, com cromatina frouxa, nucléolo evidente, citoplasma apresentando abundante retículo endoplasmático granular em região perinuclear, mitocôndrias em sua maioria globosas e escassos vacúolos (Figura 36). O Esferulócito Incolor (EI) apresenta núcleo pequeno, periférico com cromatina densa e no citoplasma presença de vesículas elétron lucentes com um centro mais elétron denso (Figura 37). O Esferulócito Vermelho (EV) apresenta características semelhantes ao EI, sendo seu núcleo em posição periférica, cromatina densa e citoplasma contendo abundante vesículas, porém com conteúdo heterogêneo, variando de mais elétron lucente até elétron denso, e contendo centros elétron densos. Essa heterogeneidade do conteúdo da vesícula pode ser decorrente de diferentes graus de maturação dos grânulos (Figura 38).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos amostrais analisados, sendo que a descrição dos tipos celulares obedece ao mesmo padrão encontrado para animais do grupo controle em todos os espécimes analisados, independente da espécie, temperatura e período de exposição.



File Name = 03 -af 10000.tif

Figura 36. Eletromicrografia de amebócito fagocítico de ouriço-do-mar do grupo controle. Observa-se núcleo com cromatina frouxa, central e extensa rede de retículo endoplasmático rugoso. Aumento de 10000x.



File Name = 01 esf degra bra 5000.tif

Figura 37. Eletromicrografia de esferulócito incolor de ouriço-do-mar do grupo controle. Observa-se núcleo periférico com cromatina densa e abundante quantidade de vesículas eletronlucentes no citoplasma. Aumento de 5000x.


File Name = 04- esf 7500.tif

Figura 38. Eletromicrografia de esferulócito vermelho de ouriço-do-mar do grupo controle. Observa-se núcleo periférico com cromatina densa e abundante quantidade de vesículas heterogênas variando de eletronlucentes a eletrondensas no citoplasma. Aumento de 7500x.

6.8 Avaliação morfométrica dos amebócitos fagocíticos

A análise morfométrica dos amebócitos fagocíticos de *Lytechinus variegatus* revelou uma tendência de diminuição da área dos amebócitos com o estresse térmico, porém não significativa. No entanto, houve um aumento significativo (P<0,05) da circunferência celular a 25,0 °C quando comparado com o grupo controle. Também se observou diminuição do diâmetro de Feret para essa mesma temperatura. (Tabela 7)

Tabela 7. Parâmetros morfométricos de amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* submetidos a diferentes temperaturas por período agudo (24 horas)

	20,0 °C	25,0 °C	30,0 °C
Área (µm ²)	286.55±171.16	131±22.31	174.49±61.19
Cincunferência	0.33±0.14	0.84±0.06*	0.64±0.27
Perímetro (µm)	94.59±31.79	44.27±4.4*	58.99±9.4
Feret (µm)	39.20±7.87	15.55±1.40*	22.80±6.59
Feret min (µm)	18.94±5.28	12.02±1.30	12.35±4.20
Feret X (µm)	331.32±144.58	157.98±107.64	224.99±59.08
Feret Y (µm)	259.09±92.22	123.33±59.08	186.30±106.92

Com relação à análise morfométrica para células da espécie *Echinometra lucunter* não foi observada diferença significativa em nenhum parâmetro analisado independente da temperatura e período de exposição (Tabela 8).

	20,0 °C	25,0 °C	30,0 °C
Área (µm ²)	175,60±70,80	145,09±55,08	165,00±63,50
Cincunferência	0,32±0,08	0,45±0,12	0,42±0,20
Perímetro (µm)	58,40±8,90	62,09±9,02	58,65±10,05
Feret (µm)	23,40±7,28	28,09±8,20	22,76±9,10
Feret min (µm)	12,45±5,00	12,67±7,2	13,05±4,59
Feret X (µm)	215,00±67,09	222,30±60,06	198,09±58,50
Feret Y (µm)	185,00±82,50	148,90±70,00	178,00±56,00

Tabela 8. Parâmetros morfométricos de amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* submetidos a diferentes temperaturas por período agudo (24 horas)

6.9 Migração celular por video microscopia - time lapse

A migração celular analisada por vídeomicroscopia sem adição de substância quimiotática na placa de cultura de amebócitos fagocíticos de *Lytechinus variegatus* revelou que a distância percorrida (µm) pelos AF apresentou um aumento de 33% em 25,0 °C em comparação ao grupo controle (P<0,05). Foi observado ainda que houve aumento de 167% na velocidade de migração (µm/h) a 25,0 °C quando comparado com a temperatura controle (P<0,05), no entanto o aumento da velocidade não foi acompanhado por uma direcionalidade definida, já que observou-se diminuição de 66% na direcionalidade neste período (P<0,05) (Figuras 39 a 41).



Figura 39. Velocidade média em µm/h da migração de amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar *L. variegatus* em diferentes temperaturas expostos por 24 horas. Observou-se aumento significativo da velocidade de migração a 25,0 °C em comparação com o grupo controle (20°C). P<0,05



Figura 40 Distância percorrida em µm por amebócitos fagocíticos de ouriçosdo-mar *L. variegatus* em diferentes temperaturas expostos por 24 horas. Observouse aumento significativo da velocidade de migração a 25,0 °C em comparação com o grupo controle (20,0 °C). P<0,05



Figura 41 Direcionalidade de amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar *L. variegatus* em diferentes temperaturas expostos por 24 horas. Observou-se diminuição significativa da velocidade de migração a 25,0 °C em comparação com o grupo controle (20,0 °C). P<0,05 Para a espécie *E. lucunter* não foi observada diferença significativa em nenhum parâmetro da migração celular por *time lapse* sem adição de susbstância quimiotática.



Figura 42. Velocidade média em µm/h da migração de amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar *E. lucunter* a diferentes temperaturas expostos por 24 horas. Não houve diferença significativa entre os grupos amostrais.



Figura 43 Distância percorrida em µm por amebócitos fagocíticos de ouriçosdo-mar *E. lucunter* a diferentes temperaturas expostos por 24 horas. Não houve diferença significativa entre os grupos amostrais.



Figura 44. Direcionalidade de amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar *E. lucunter* a diferentes temperaturas expostos por 24 horas. Não houve diferença significativa entre os grupos amostrais

6.10 Migração celular frente a gradiente quimiotático – transwell

Em ambas as espécies observou-se um aumento na taxa de migração de AF frente às duas substâncias quimiotáticas (soro fetal bovino e levedura *S. cerevisiae*) em comparação ao controle negativo.

Para a espécie *L. variegatus* observou-se que os AF estimulados por SFB e leveduras sofreram diminuição na taxa de migração a temperaturas elevadas (25,0 e 30,0 °C) em comparação à temperatura de 20,0 °C. (Figura 45)

Para a espécie *E. lucunter* observou-se que os AF estimulados por SFB e leveduras não apresentaram diferença estatística entre as temperaturas analisadas (Figura 46).



Figura 45 Migração celular em câmara transwell de AF de ouriços-do-mar *L. variegatus* As células foram estimuladas por Soro Fetal Bovino SFB e levedura *S. cerevisiae* em diferentes temperaturas por 24 horas de exposição. Observou-se diminuição na taxa de migração nas temperaturas mais elevadas quando

comparadas com a temperatura controle em ambos agentes quimiotáticos analisados. P<0,05.



Figura 46 Migração celular em câmara transwell de AF de ouriços-do-mar *E. lucunter* estimulados por Soro Fetal Bovino SFB e levedura *S. cerevisiae* em diferentes temperaturas por 24 horas de exposição. Não observou-se diferença significativa na taxa de migração frente a nenhum agente quimiotático analisado.

6.11 Análise do citoesquelto de actina

Para a espécie *Lytechinus variegatus* os amebócitos fagocíticos a 20,0 °C apresentam morfologia alongada, com notável característica de célula espraiada, lamelipódio facilmente observado além de alguns filopódios. A 25,0 °C houve uma aparente redução do corpo celular, com predomínio de células com morfologia arredondada, ausência de filopódios e aparente ausência de polaridade celular. Já a 30,0 °C as células apresentaram morfologia semelhante à observada a 20,0 °C, com manutenção da polaridade celular e observação de projeções celulares, no entanto houve uma aparente diminuição nas fibras de estresse e aparente aumento no tamanho do lamelipódio (Figura 47).

Para *Echinometra lucunter* os amebócitos fagocíticos permaneceram similares à morfologia encontrada no grupo controle em que se observou célula caracteristicamente espraiada, com observação de prolongamentos celulares, lamelipódio evidente e polaridade definida (Figura 47).



Figura 47. Citoesqueleto de actina em ouriços-do-mar tropicais.

6.12 Expressão de integrina β1

O aumento da temperatura promoveu uma tendência a diminuição, porém não significativa, da expressão de integrina às temperaturas de 25,0 e 30,0 °C em ouriços-do-mar *L. variegatus* (Figura 48).



Figura 48. Expressão de integrina em amebócitos fagocíticos de ouriços-domar *L. variegatus.* Os animais foram expostos a 20,0 (controle), 25,0 e 30,0 °C por 24 horas. O controle negativo foi realizado utilizando-se somente células e anticorpo secundário.

Quando é feita a avaliação da expressão de integrina β1 pela média da intensidade de fluorescência, observa-se que a temperatura não influencia na expressão desta subunidade em nenhuma espécie avaliada (Figura 49).



Figura 49. Média da Intensidade de fluorescência da subunidade de integrina β1 em ouriços-do-mar tropicais. Não foi observada diferença significativa em nenhuma espécie e temperatura analisadas

6.13 Análise expressão GTPases

Para ambas as espécies analisadas, não se observou diferença na expressão das GTPases Rho A e Rac 1.



Figura 50 Expressão de RhoA em amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar tropicais.



Figura 51. Expressão de Rac1 em amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar tropicais.

6.14 Produção de ânion superóxido

Para a espécie *Lytechinus variegatus* houve diminuição significativa da produção de ânion superóxido no período agudo proporcional ao aumento da temperatura a 25,0 °C (P<0,05) e a 30,0 °C (P<0,01). (Figura 52). A espécie *Echinometra lucunter* não apresentou diferença significativa da produção de ânion superóxido com as temperaturas analisadas (Figura 53).



Figura 52. Produção de ânion superóxido na espécie *L. variegatus* Os animais foram expostos a diferentes temperaturas por período de 24 horas. Observou-se diminuição significativa às temperaturas de 25,0 e 30,0 °C em comparação ao grupo controle (20,0 °C). P<0,05.



Figura 53 Produção de ânion superóxido na espécie *E. lucunter* Os animais foram expostos a diferentes temperaturas por período de 24 horas. Não observou-se alteração significativa em nenhuma temperatura analisada.

Os resultados obtidos parecem ser correlacionados com os encontrados para a Capacidade Fagocítica, em que se observa também uma diminuição dependente do estresse térmico.

6.15 Produção da enzima superóxido dismutase (SOD)

Observou-se uma diminuição significativa da atividade de SOD (P<0,05) diretamente proporcional ao aumento da temperatura, no entanto não houve variação entre o tempo de exposição em *L. variegatus* (Figura 54). Para a espécie *E. lucunter* nenhuma variação na produção desta enzima foi detectada, independente da temperatura e do tempo de exposição (Figura 55).



Figura 54. Produção de SOD em *L. variegatus.* Os animais foram expostos a diferentes temperaturas por período de 24 horas. Observou-se diminuição significativa às temperaturas de 25,0 e 30,0 °C em comparação ao grupo controle (20°C). P<0,05.



Figura 55. Produção de SOD em *E. lucunter.* Os animais foram expostos a diferentes temperaturas por período de 24 horas. Não observou-se alteração significativa em nenhuma temperatura analisada.

7 DISCUSSÃO

O aumento da temperatura, provocado pelo aquecimento global, promove alterações importantes na distribuição das espécies (Gienapp et al., 2008), além de promover alterações fisiológicas e de desenvolvimento. Os organismos possuem diversos mecanismos adaptativos para mitigar os efeitos deletérios provocados pelo estresse térmico (Somero, 2010). Dentre as respostas adaptativas destacam-se a resposta ao estresse térmico (Lindquist, 1986) e a acomodação comportamental (Huey, 1974).

A resposta ao estresse desempenha um papel fundamental especialmente no que tange à distribuição de determinada espécie frente a alterações climáticas e a forma com que dada espécie lida com tais alterações, conferindo à esta robustez na resposta adaptativa (Runcie et al., 2012).

Os mecanismos e a evolução das respostas ao estresse podem estar diretamente relacionadas com a forma com que dada espécie determina a tolerância térmica imediata e a longo prazo (Runcie et al., 2012). Os autores afirmam que essa variação de resposta ao estresse agudo e crônico está relacionada com alterações na expressão gênica e nas vias de sinalização, alterando a homeostase do organismo e levando a ativação de mecanismos adaptativos. Esses dados elucidam os resultados obtidos neste trabalho, em que se constatou repostas distintas em ouriços-do-mar antárticos e tropicais. A espécie antártica *S neumayeri* apresentou alterações significativas somente no período agudo de exposição enquanto que na espécie tropical *L. variegatus* as alterações mais importantes foram detectadas tanto no período agudo quanto nos crônicos. Por outro lado, a espécie tropical *E. lucunter* apresentou alteração somente na proporção de esferulócitos vermelhos no período crônico.

No que concerne às respostas comportamentais, a espécie mais afetada foi a espécie tropical *Lytechinus variegatus*. A diminuição ou ausência do reflexo da lanterna de Aristóteles apresentada em animais desta espécie expostos a 30,0 °C pode ser explicada pelo fato de que em situações de estresse intenso, o metabolismo energético é desviado para suprir as funções vitais. Além disso, animais expostos a temperaturas de 20,0 e 25,0 °C não apresentaram essa característica, comprovando que a temperatura de 30,0 °C é um potente fator estressor. Cobb (1970) demonstrou que o controle da lanterna de Aristóteles é

mediado pela inervação hiponeural, inervação que controla também a movimentação dos espinhos, além de desempenhar o controle no movimento das pedicelárias, o que justifica a diminuição ou ausência de aderência dos animais aos tanques.

O fenômeno da desova, observado somente em animais *L. varigatus* submetidos a 30,0 °C e *S neumayeri* submetidos a 4,0 °C por longos períodos de exposição, confirma a hipótese do papel estressor que elevadas temperaturas exercem no organismo. Esse fenômeno pode ser uma tentativa de perpetuação da espécie em situações estressantes, em que a morte é um risco iminente.

O reflexo de virar também é um fenômeno claramente descrito na literatura que quando diminuído ou ausente reporta o estresse do animal, alterações nesse reflexo decorrentes do estresse também foram descritas em outros equinodermos (Lawrence, Cowell, 1996). Foi demonstrado também que o reflexo de virar em equinodermos diminui progressivamente com o aumento da temperatura, o que corrobora com os nossos resultados (Ubaldo et al., 2007).

O trabalho de Hernandez et al. (2004) demonstrou que ouriços-do-mar expostos a diferentes temperaturas apresentaram alterações comportamentais importantes, tais como: perda da movimentação dos espinhos e perda da movimentação no tanque. Os autores correlacionaram que tais alterações são compatíveis com o limite superior que é tolerável pelo animal. Tais dados corroboram com os obtidos no presente trabalho, em que foram observadas alterações mais severas em animais, da espécie *L. varigatus,* expostos a temperaturas elevadas por período crônico de exposição.

Com relação à análise da contagem diferencial dos celomócitos, foi mantida a mesma proporção dos tipos celulares em todos os grupos experimentais, sendo o grupo celular predominante o dos amebócitos fagocíticos em todas as espécies estudadas. Os dados obtidos corroboram com as proporções encontradas pelos autores Bertheussen, Seljelid (1978); Borges (2000); Isaeva, Korembaum (1990); Johnson (1969).

Os resultados obtidos com relação ao aumento de esferulócitos vermelhos em todas as espécies estudadas nos permite inferir que os esferulócitos vermelhos desempenham importante papel na resposta imune de ouriços-do-mar, aumentando em casos de estresse tanto agudo quanto crônico dependendo da espécie em questão. O aumento deste tipo celular na espécie antártica foi observado somente no período agudo de exposição, o que pode ser decorrência de que no habitat polar a variação térmica natural é bem menos evidente quando comparado com habitats tropicais (Peck et al., 2004). Por outro lado, na espécie tropical *L. variegatus* seu aumento foi evidenciado em todos os períodos de exposição enquanto que na espécie *E. lucunter* houve aumento deste tipo celular no período crônico de exposição.

Foi documentado em diversos trabalhos o aumento da quantidade de esferulócitos vermelhos frente a diferentes tipos de estresse: lesões no esqueleto calcário e na derme (D'Andrea-Winslow, Novitski, 2008); contaminação do meio por metais tais como ferro, cobre e zinco (Pinsino et al., 2008); contaminação do meio por fração solúvel de petróleo (Borges et al., 2010); contaminação do meio por resíduos industriais (Matranga et al., 2000). Desse modo, pode-se afirmar que o estresse térmico também provoca a maior concentração dessas células no líquido celomático.

A coloração dos esferulócitos vermelhos é devido a presença de grânulos em seu interior de mesma coloração, grânulos estes que possuem uma substância denominada equinocromo A (Smith et al., 2006). Equinocromo, ou 6-etil-2,3,5,7,8-penta-1 ,4-naftoquinona tem sido associado com a eliminação de radicais peróxidos em liposomas, aprisionamento de radicais superóxido e de ligação de ions ferrosos para complexos inativos na fase aquosa (Lebedev et al., 2001). O equinocromo é conhecido por suas propriedades antioxidantes e bactericidas (Artyukov et al., 2013).

O aumento dessa população em casos de estresse pode ser decorrente de um mecanismo protetor do organismo. Devido ao estresse crônico, o organismo torna-se mais vulnerável a ação de patógenos oportunistas, sendo assim, uma maior concentração de células que degranulem substâncias bactericidas seria de grande importância como mecanismo de resistência natural à infecção.

O aumento dos esferulócitos incolores (EI) no período crônico para a espécie tropical *Lytechinus variegatus* pode ser explicado pelo fato de que este tipo celular é considerado um estágio de maturação do esferulócito vermelho conforme sugerem Matranga et al. (2000). Dessa forma, o aumento dos EI pode ser também em decorrência do estresse celular. Possivelmente, esse fenômeno só foi observado em *L. variegatus* por ser uma espécie com metabolismo mais rápido que espécies polares conforme afirma Borges et al. (2012). Outra razão que suporta as

explicações anteriores é quanto à análise ultraestrutural de celomócitos, em que a única diferença entre os dois esferulócitos é com relação a eletron densidade dos seus grânulos, o que sugere diferentes estágios de maturação destes.

A fagocitose faz parte da imunidade inespecífica, é uma resposta celular pela qual os fagócitos internalizam partículas maiores que 0,5 µm (Rabinovitch, 1995), sendo que o tamanho do fagossomo é determinado em função do tamanho da partícula fagocitada (Secombes, 1992). No presente trabalho, esta foi realizada unicamente por amebócitos fagocíticos, os demais tipos celulares não participaram efetivamente deste processo, concordando com a literatura existente para equinodermos (Bertheussen, Seijelid, 1978; Johnson, 1969; Smith et al., 2006).

Como foi utilizada a mesma metodologia para avaliação da resposta fagocítica em três espécies diferentes, nosso estudo estabelece um protocolo para melhor comparação da resposta imune nas referidas espécies, de modo a comparálas mais efetivamente. Os estudos realizados até o momento utilizaram-se de metodologias diferentes como, por exemplo: análise *in vivo* via endocitose de ferritina (Faria, Silva, 2008); utilização de microrganismos fluorescentes (Coteur et al., 2003); mensuração da endocitose de zimosan (Parry, Pipe, 2004); mensuração via citometria de fluxo de *beads* fluorescentes (Duchemin et al., 2007), tornando a comparação dos dados em diferentes espécies mais dificultosa.

Os valores da CF encontrados no grupo controle do presente trabalho são similares àqueles observados em ouriços-do-mar antárticos *Sterechinus neumayeri,* por Borges et al. (2002) onde a média de CF foi de 22,9, com relação ao IF observase que o grupo controle para a referida espécie apresenta valores superiores àqueles encontrados pelo mesmo autor.

A espécie antártica apresentou diferenças significativas de CF e CG somente no período agudo, esse fenômeno pode ser decorrente das pequenas variações climáticas no ambiente polar.

Com relação a CF observou-se aumento deste índice à temperatura intermediária (2,0 °C) somente no período de exposição agudo. Este resultado discorda de Jiravanichpaisal et al. (2004) que reportaram uma diminuição da capacidade imunológica com o aumento da temperatura em camarões expostos ao estresse térmico agudo. Este fenômeno pode ser consequência de oscilações climáticas em ambiente polar que sofreu um aumento da temperatura do mar de 1

°C ao longo dos últimos 50 anos (Meredith e King 2005). Os ouriços-do-mar são naturalmente expostos a oscilação térmica durante as estações do ano, ao contrário de camarões que são cultivados em uma temperatura constante e, consequentemente, não estão expostos às oscilações de temperatura ao longo do ano.

A Capacidade Germicida (GC) para a espécie antártica seguiu o mesmo padrão como indicado anteriormente. Uma diferença significativa foi observada apenas no período agudo e apenas quando a temperatura foi aumentada para 2,0 °C. O efeito da temperatura ambiental foi simulado em bioensaios *in vitro* com amebócitos de ouriços-do-mar polar *Strongylocentrotus droebachiensis* submetidos a diferentes temperaturas (1, 10 e 23 °C), observou-se neste estudo que a atividade bacteriana de amebócitos foi diretamente estimulada pelo aumento da temperatura (Plytycz, Seljelid, 1993). Estes resultados parcialmente discordam dos obtidos no presente estudo, em que apenas a 2,0 °C observou-se um aumento na CG.

Análises dos dados obtidos para a espécie tropical *Lytechinus variegatus* demonstram que são semelhantes aos dados encontrados por Borges et al. (2005) com CF de 60,85 e IF de 1,83, o que nos permite afirmar que a resposta imune de equinoides tropicais é mais rápida que dos antárticos.

Na espécie tropical *Lytechinus variegatus* observou-se que a CF foi significativamente reduzida em experimentos crônicos às temperaturas de 25,0 e 30,0 °C, da mesma forma que o IF. Diferentemente, a espécie tropical *Echinometra lucunter* não apresentou nenhuma variação destes parâmetros independente da temperatura e período de exposição ao estresse térmico.

Uma das principais diferenças que pode explicar a variabilidade de resposta entre espécies pode ser relacionada com as propriedades de organização do citoesqueleto e suas proteínas acessórias. O citoesqueleto medeia uma grande variedade de funções biológicas essenciais em todas as células eucarióticas. Além de proporcionar a morfologia celular definida e determinar a polaridade celular, também proporciona força motriz suficiente para que as células migrem (Hall, 1998). Qualquer desorganização no remodelamento do citoesqueleto pode levar a respostas celulares prejudiciais. No presente estudo foi observado um padrão distinto do citoesqueleto de actina nas duas espécies corroborando para o fato de que a diminuição na fagocitose pode ser decorrente de alterações no citoesqueleto. Neste processo, a polimerização de actina ocorre a partir da transdução de sinal, após o contato da partícula com o fagócito. A ligação aos receptores e a ativação da cascata de sinalização intracelular não estão totalmente compreendidas, porém é evidente a participação da família Rho no controle da reorganização estrutural dos filamentos de actina do citoesqueleto, durante a captação de partículas por fagócitos profissionais (Caron, Hall, 1998). A família das proteínas Rho é parte da superfamília da Ras das pequenas GTPases. As proteínas Rho estimulam a contratilidade da membrana, em processos dependentes de actina-miosina (Ridley, 2001). Existem aproximadamente 20 genes codificados para a família das Rho, incluindo Rho A, B e C, Rac (1,2 e 3), Cdc42, entre outras, sendo que Rac 1 e Cdc 42 ainda possuem variantes.

Um estudo conduzido por Dalle-Donne e colaboradores (2001) revelou que o citoesqueleto é um dos alvos mais sensíveis de estresse, reforçando a importância de um estudo com o objetivo de descrever as diferenças moleculares e mecânicas do citoesqueleto de ouriços-do-mar tropicais. Este mesmo estudo indicou que as proteínas de choque térmico podem também interagir com o citoesqueleto, a fim de montar uma resposta termoprotetora. Liang e MacRae (1997) demonstraram que o complexo polipeptídeo T-1 (TCP-1), que atua como chaperonina auxiliando no dobramento de proteínas do citoesqueleto tais como $\alpha / \beta / \gamma$ -tubulina, actina e centractina. Além disso, o complexo de TCP-1 é um componente centrossomal, aparentemente envolvido na nucleação de microtúbulos. O mesmo grupo ainda demonstrou que pequenas proteínas de choque térmico podem interagir com o intuito de protegê-los do choque térmico, enfatizando a importância de chaperonas moleculares nas funções do citoesqueleto.

As alterações de retardo de espraiamento celulares observadas em ambas as espécies também podem ser em decorrência de alterações nos arranjos da polimerização do citoesqueleto de actina, possivelmente alterando a formação de filopódios e lamelipódios, ambas as estruturas de fundamental importância nas fases iniciais da fagocitose (Lambrechts et al., 2004). Considerando ainda que o teste de viabilidade celular revelou uma taxa de viabilidade superior a 97%, reforça-se a hipótese de que a diminuição da CF a temperaturas mais elevadas seja de fato decorrente de alterações do citoesqueleto.

Além disso, quando se consideram os dados relativos a adesão e espraiamento dos celomócitos, pode-se considerar que a diminuição da CG a 4,0 °C na espécie antártica, pode ser resultado da diminuição na capacidade de espraiamento que, por sua vez, leva a um retardo na fagocitose e consequentemente à redução da atividade das enzimas responsáveis por degradação de corpo estranho.

O mesmo se aplica para a espécie tropical *L. variegatus* em que se observou diminuição na adesão celular a temperaturas elevadas. Embora não tenha sido observada alteração significativa na expressão da integrina β1, o estudo envolvendo outras moléculas de adesão e até mesmo envolvendo TLR6 (resposável por reconhecer PAMPs associados a leveduras) não deve ser descartado.

Foi observado também alteração no comportamento migratório dos fagócitos em ambas as espécies, isso pode estar associado a uma diferença na ativação das GTPases Cdc42, Rac 1 e RhoA, atuando respectivamente na polaridade celular, formação de lamelipódio e formação de fibras de estresse (Hall, 1998). Embora dados do presente estudo não tenham demonstrado alteração no padrão de expressão de Rho A e Rac1, deve-se considerar que essas GTPases são ativadas mediante modificações pós-traducionais. Portanto, novos estudos devem ser conduzidos avaliando a ativação destas GTPases e também os possíveis efetores das vias nas diferentes espécies.

No que diz respeito à fagocitose, saba-se que a ativação dos efetores da GTPase Rac1, PAK e WAVE, promove diminuição na resposta fagocítica; PAK por regular a reorganização do citoequeleto de actina e migração celular (Vidal et al., 2002) e WAVE por promover a nucleação de actina mediante ativação do complexo Arp2/3 (Lebensohn, Kirschner, 2009).

A avaliação conjunta desses fatores em estudos futuros ampliaria os conhecimentos da fagocitose em ouriços-do-mar e elucidariam quais mecanismos seriam mais afetados frente ao estresse térmico nas diferentes espécies.

O Consórcio de Sequenciamento do Genoma do Ouriço-do-Mar (2006) reportaram o sequenciamento e análise de 814 megabase do genoma do ouriço-domar *Strongylocentotus purpuratus*. Nesse trabalho foi documentada a presença das proteínas mais representativas do citoesqueleto, tais como: actina, miosina II, tubulina e filamentos intermediários (Morris et al., 2006). Boureux et al. (2007) demonstraram a conservação das proteínas da família Rho no contexto filogenético e concluíram que dentre os celomados inferiores, apenas os ouriços-do-mar possuem estrutura gênica da família das Rho GTPases semelhante aos vertebrados. A literatura também dispõe de diversos estudos mostrando o papel dessa família em embriões de ouriços-do-mar (Beane et al., 2006; Cuellar-Mata et al., 2000; Nishimura et al., 1998), mas o papel das GTPases em celomócitos de ouriços-domar adultos não foi descrito até o momento.

Além disso, o estudo da termotolerância a curto e longo prazo nas duas espécies deve ser considerado. O fator mais limitante para a tolerância térmica é a taxa de oxigênio, uma vez que o estresse térmico provoca a hipóxia (Pörtner, 2001). No entanto, o presente estudo utilizou tanques experimentais com bombas de ar adicionais de modo a manter o nível de oxigénio dissolvido saturado mesmo em temperaturas mais altas.

Outro mecanismo importante associado com a tolerância térmica e que pode explicar as respostas imunes distintas entre *L. variegatus* e *E. lucunter* é a resposta ao choque térmico, que envolve um aumento da síntese de proteínas de choque térmico (HSP), um grupo de proteínas altamente conservadas, presentes em todos os organismos até agora estudados. Algumas HSPs desempenham um papel crucial durante o dobramento / desdobramento de proteínas, montagem de complexos multiprotéicos, transporte / endereçamento de proteínas para compartimentos subcelulares, controle do ciclo celular e sinalização e proteção das células contra o estresse / apoptose (Li, Srivastava, 2004). Além disso, foi demonstrada a importância da elevada expressão de HSPs na ativação da resposta imune (Wallin et al., 2002). Baseado nisso, pode-se inferir que a diferença na resposta imune nas diferentes espécies estudadas, se deva ao diferente padrão na expressão de HSPs.

A HSP 70 é a chaperona mais estudada (Bakau, Horwich, 1998). Foi primeiramente descrita por Ritossa (1962) em *Drosophila melanogaster* após choque térmico, por essa razão recebe o nome de proteína do choque térmico. Foi demonstrado que a expressão de proteínas do choque térmico em celomócitos de ouriços-do-mar está aumentada na presença de diferentes fatores estressores tais como: temperatura, poluição e injúrias (Matranga et al., 2000; Matranga, Bonaventura, 2002; Osovitz, Hofmann, 2005). Baseados nesses resultados,

Matranga et al. (2000) sugeriram a utilização da Hsp70 expressa por celomócitos como biomarcador para estresse ambiental químico e físico. Um estudo descrevendo a espressão de Hsp70 em ambas as espécies tropicais seria de extrema relevância para elucidar os mecanismos de termotolerância nestas espécies.

Outro gene, que também foi relatado como resposta à tolerância térmica é o HMGB1 (*High-mobility group box 1 protein*). HMGB1 são proteínas de ligação ao DNA que exercem ampla gama de efeitos sobre a atividade transcricional, agindo como ativadores de transcrição. Um estudo no peixe *Austrofundulus limnaeus* exposto a estresse térmico revelou que o aumento da concentração de HMGB1 favoreceu a transcrição de vários genes (Somero, 2005). HMGB1 em ouriços-do-mar foi isolado pela primeira vez no ouriço-do-mar temperado *Strongylocentrotus purpuratus* (Niemeyer et al., 2005). No entanto, desde então, nenhum estudo avaliando a expressão de HMGB1 em estresse por calor em ouriços-do-mar foi conduzido. Um estudo com o tema deve ser considerado a fim de compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na resposta à tolerância térmica em ouriços-do-mar.

Runcie et al. (2012) demonstraram que o estresse térmico provocou alterações importantes no padrão de expressão gênica em embriões de ouriços-domar, alterando principalmente genes relacionados ao desenvolvimento, processamento de RNA e enovelamento protéico, reforçando assim, a importância das HSPs frente ao estresse térmico.

A análise ultraestrtural dos celomócitos nos grupos controles revela muitas similaridades com os resultados obtidos por outros autores tanto em ouriços-do-mar como em outros equinodermos (Eliseikina, Magarlamov, 2002; Xing et al., 2008). Essa coincidência de resultados revela que o grupo controle do presente projeto estava saudável e os resultados obtidos são confiáveis para estabelecer comparações com os grupos experimentais. Os resultados obtidos para os grupos experimentais demonstraram que não houve alterações ultraestruturais em nenhuma espécie independente do período e temperatura a que foram expostos.

Os resultados obtidos para a capacidade germicida do líquido celomático sugerem que a fração acelular do líquido celomático não apresenta papel fundamental no combate a infecção desses animais frente ao estresse térmico, podendo desempenhar, nesse caso, apenas um papel coadjuvante na resposta imune inata.

O estresse oxidativo, caracterizado pela produção e acúmulo nas células de radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, pode provocar danos a proteínas, lipídeos e DNA. A produção de espécies reativas de oxigênio é conhecida no ambiente marinho. O estresse oxidativo é um importante componente da resposta ao estresse em organismos marinhos que são frequentemente expostos a uma ampla variedade de agentes estressores, que por sua vez podem estar relacionados às alterações ambientais; tais como estresse térmico, exposição a radiação ultravioleta e poluição (Lesser, 2006).

Neste trabalho, o estresse oxidativo foi avaliado levando em consideração os parâmetros: ânion superóxido e a enzima superóxido dismutase. Ambos sofreram diminuição com o aumento da temperatura para a espécie *L. variegatus*. Ainda nestes mesmos parâmetros não se observou alteração em decorrência do tempo de exposição. Considerando que a atividade de SOD é responsável pela conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, pode-se inferir que o aumento da temperatura diminui a produção de ânion superóxido e consequentemente ocorre uma diminuição na atividade de SOD indicando que a atividade de NADPH oxidase está reduzida frente ao estresse térmico.

Du et al. (2013) sugeriram que a espécie *L. variegatus* é mais sensível ao estresse oxidativo quando comparado à espécie *Strongylocentrotus purpuratus*. Os autores mostraram que para a espécie *L. variegatus* ocorre um acúmulo de danos celulares em decorrência do estresse oxidativo. Acredita-se que a heterogeneidade de resposta se deva ao ciclo de vida de cada espécie.

Considerando que a temperatura é o principal fator que influencia a fisiologia e distribuição de invertebrados marinhos (Gienapp, 2008), mais estudos devem enfatizar a resposta termoprotetora em diferentes espécies de ouriços-domar, a fim de compreender e até mesmo, mitigar os efeitos deletérios causados pelo aquecimento da água do mar (Brown et al., 2004; Hoegh-Guldberg, Pearse,1995; O'Connor et al., 2007; Somero, 2002). O presente trabalho contribui ainda para embasar novos estudos que avaliem como a resposta imune pode contribuir, a longo prazo, para a distribuição das espécies estudadas.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho estudou pela primeira vez a correlação entre aumento da temperatura da água do mar e resposta imune inata em ouriços-do-mar de diferentes habitats.

A resposta imune de ouriços-do-mar apresentou diferenças importantes entre as espécies estudadas, sendo que na espécie antártica houve um aumento da capacidade fagocítica no período agudo enquanto que nas espécies tropicais observou-se uma redução significativa em todos os períodos analisados para *L. variegatus* e nenhuma alteração para a espécie *E. lucunter*.

O aumento da temperatura também modulou a capacidade de adesão e espraiamento dos celomócitos. Além disso, os esferulócitos vermelhos foram considerados biomarcadores celulares para todas as espécies estudadas.

Pela primeira vez, três espécies puderam ser comparadas, já que foi utilizada a mesma metodologia para a avaliação da fagocitose.

Para as espécies tropicais foi observado um distinto padrão na resposta imune nas espécies estudadas, embora ambas as espécies habitem o litoral paulista e foram coletadas na mesma faixa de profundidade, a espécie que habita região entremarés *E. lucunter* apresentou maior termoresistência que a espécie *L. variegatus* que por sua vez apresentou alterações na migração celular, quimiotaxia, padrão do citoesqueleto de actina e produção de espécies reativas de oxigênio.

REFERÊNCIAS²

Allen WE, Zicha D, Ridley AJ, Jones GE. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. J Cell Biol. 1998; 141: 1147-57.

Arrhenius S. On the influence of carbonic acid in the air upon the temperature o the ground. Philosof Mag J Sci. 1896; 41(5):237-76.

Artyukov AA, Popov AM, Tsybulsky AV, Krivoshapko ON, Polyakova NV. Pharmacological activity of echinochrome a alone and in the biologically active additive Timarin. Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2013; 7(3): 237-42.

Bakau B, Horwich AL. The Hsp 70 and Hsp 60 chaparone machines. Cell. 1998;92:351-66.

Ballestrem CB, Wehrle-Haller BH, Imhof BA. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. Mol Biol Cell. 2000; 11:2999–3012.

Beane WS, Voronina E, Wessel GM, McClay DR. Lineage specific expansions provide genomic complexity among sea urchin GTPases. Dev Biol 2006; 300:165–79.

Beddingfield SD, McClintock JB. Demographic Characteristics of *Lytechinus variegatus* (Echinoidea: Echinodermata) from three habitats in North Florida Bay, Gulf of Mexico. Mar Ecol 2000; 21: 17-40

Bernstein L, Bosch P, Canziani O, Chen, Z, Christ R, Davidson O et al.,. Climate Change 2007: Synthesis Report, 2007.

Bertheussen K, Seljelid R. Echinoid phagocytes in vitro. Exp Cell Res. 1978; 111:401-12.

Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. Biochem J. 2000; 2:241-55.

Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LEJ. Ecotoxicity and innate immunity in fish. Dev Comp Immuno. 2001; 25: 853-73.

Borges JCS, Porto-Neto LR, Mangiaterra MBCD, Jensch-Junior BE, Silva JRMC. Phagocytosis in vivo and in vitro in the Antarctic Sea Urchin *Sterechinus neumayeri* at 0oC, Polar Biol. 2002; 25:891-97.

Borges JCS, Jensch – Jr BE, Mangiaterra MBBCD, Garrido PAG, Silva JRMC. Phagocytic amoebocyte sub populations in the perivisceral coelom of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816).J Exp Zool 2005; 303(3): 241-8.

² International Comitee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org.

Borges JCS. Análise quantitativa e qualitativa da população de celomócitos do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Lamark, 1816). 2000. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo.

Borges JCS, Branco PC, Pressinotti LN, Severino D, Silva JRMC. Intranuclear crystalloids of Antarctic sea urchins as a biomarker for oil contamination. Polar Biol. 2010; 33(6) 843-9.

Borges JCS, Silva JRMC, Rocha AJS, Jensch-Jr BE, Pressinotti LN, Passos MJACR, Comes V, Branco PC, Van Ngan P. Metabolic differences between tropical (*Lytechinus variegatus*)and polar (*Sterechinus neumayeri*) echinoderms. Pesquisa Antártica Brasileira. 2012; 5:71-9.

Bosch I, Beauchamp A, Steele ME, Pearse JS. Development, metamorphosis, and seasonal abundance of embryos and larvae of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. Biol Bull 1987; 173:126-35.

Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P. Evolution of the Rho Family of Ras-Like GTPases in Eukaryotes. Mol Biol Evol 2007; 24(1):203–16.

Brey T, Gutt J. The genus *Sterechinus* (Echinodermata: Echinoidea) on the Weddell Sea shelf and slope (Antarctica): distribution, abundance and biomass. Polar Biol. 1991; 11: 227–32.

Brey T, Pearse J, Basch L, McClintock MS, Slattery M. Growth and production of *Sterechinus neumayeri* (Echinoidea:Echinodermata) in McMurdo Sound, Antarctica. Mar Biol.1995; 124:279–92

Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Biology of Microorganism .Prentice-Hall, Inc, 1994

Brown EJ. Complement receptors and phagocytosis. Curr Opin Immunol. 1991; 3: 76-82.

Brown S, Nicholls RJ, Lowe J, Brown, JH. Four degrees and beyond. International climate conference, Oxford, UK.. 2004.

Buckley KM, Rast JP. Dynamic evolution of toll-like receptor multigene families in echinoderms. Front Immunol. 2012; 5(3):136.

Calich VLG, Purchio A, Paula CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. Mycopathol. 1978; 66(3):175-7.

Caron E, Hall A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. Science. 1998; 282:1717-21.

Chen G, Shaw MH, Kim Y, Nuñes, G. NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2009; 4: 365-98. Cobb JLS. The significance of the radial nerve cords in Asteroids and Echinoids. Z Zellforsch. 1970;108: 457–74

Coffaro CF, Hinegardner RT. Immune response in the sea urchin *Lytechinus pictus*. Science. 1997; 197(4311): 1389 – 90.

Coteur G, Gosselin P, Wantier P, Chambost-Manciet Y, Danis B, Pernet PH et al.,. Echinoderms as Bioindicators, Bioassays, and Impact Assessment Tools of Sediment-Associated Metals and PCBs in the North Sea. Arch Environ Cont Toxicol. 2003; 45 (2): 190-202.

Cowart DA, Ulrich PN, Miller DC, Marsh AG. Salinity sensitivity of early embryos of the Antarctic sea urchin, *Sterechinus neumayeri*, Polar Biol. 2009; 32: 435–41.

Cox D, Berg JS, Dale BM, Cheney RE, Greenberg S. A role for myosin-X in phagocytosis and pseudopod extension. Mol Biol Cell. 2000; 11:375.

Cox D, Chang P, Zhang Q, Reddy PG, Bokoch GM, Greenberg S. Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. J Exp Med. 1997; 186:1487-94.

Cox EA, Huttenlocher A. Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. Microsc Res Tech. 1998; 43: 412-9.

Cuellar-Mata P, Martinez-Cadena G, Lopez-Godinez J, Obregon A, Garcia-Soto J. The GTP-binding protein RhoA localizes to the cortical granules of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin egg in secreted during fertilization. Eur J Cell Biol. 2000; 79(2):81–91.

Cuénot L. Anatomie éthologie, et systématique, des Échinodermes. In: Grassé, P. ed: Traité de zoologie. v.2, Échinodermes, stomocordes, procordes. Paris: Masson; 1948; p.1-363.8

D'Andrea-Winslow L, Novitski AK. Active bleb formation in abated *Lytechinus variegatus* red spherule cells after disruption of acto-myosin crontractility. Integ Zool. 2008; 3(2): 115-122.

Dalle-Donne I, Rossi R, Milzani A, Di Simplicio P, Colombo R. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. Free Radic. Biol Med. 2001;31:1624–32.

Dayton PK, Robillard GA, Paine RT. Benthic faunal zonation as a result of anchor ice at McMurdo Sound, Antarctica. In: Holdgate MW (ed) Antarctic ecology. 1970; Vol. 1. Academic Press, New York

DerMardirossian C, Bokoch GM. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. Trends Cell Biol. 2005; 15(7):356-63.

Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. J Cell Biol. 1993;120: 1031-43.

Du C, Anderson A, Lortie M, Parsons R, Bodnar A. Oxidative damage and cellular defense mechanisms in sea urchin models of aging. Free Radic Biol Med. 2013;63:254-63.

Duchemin M, Fournier M, Auffret M. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, Crassostrea gigas (Thunberg). Aquaculture 2007; 264: 73-81.

Ebert TA, Dixon JD, Schroeter SC, Kalvass PE, Richmond NT Bradbury WA, Woodby DA. Growth and mortality of red sea urchins Strongylocentrotus franciscanus across a latitudinal gradient. Mar Ecol Prog Ser., 1999; 190:189:209.

Eliseikina MG, Magarlamov TY. Coelomocyte Morphology in the Holothurians Apostichopus japonicus (Aspidochirota: Stichopodidae) and Cucumariajaponica (Dendrochirota: Cucumariidae). Russian J Mar Biol. 2002; 28 (3) 197-202.

Ellis AE. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. Devel Com Immunol 2001; 25: 827–39.

Ellis RP, Parry H, Spicer JI, Hutchinson TH, Pipe RK, Widdicombe S. Immunological function In marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. Fish Shellfish Immunol. 2011; 30: 1209-22.

Ericson JA, Ho MA, Miskelly A, King CK, Virtue P, Tilbrook B, Byrne M. Combined effects of two ocean change stressors, warming and acidification, on fertilization and early development of the Antarctic echinoid *Sterechinus neumayeri*. Polar Biol 2012; 35(7): 1027-34.

Esper J, Cook ER, Scheweingruber FH. Low-frequency signals in long tree-ring chronologies for reconstructing past temperature variability. Science 2002; 295:2250–53.

Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. Nature 2002; 420(6916):629-35

Faria MT, da Silva JR. Innate immune response in the *sea urchin* Echinometra lucunter (Echinodermata). J Invertebr Pathol. 2008; 98(1):58-62.

Flannagan RS, Jaumouilli V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. Annual review of pathology: mechanisms of disease 2012; 7:61-98.

Fleming JR. Joseph Fourier, the greenhouse effect and the quest for a universal theory of terrestrial temperatures. Endeavour 1999; 23(2): 72-5.

Freshney R. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique,1987; p.117, Alan R. Liss, Inc., New York

Gagnaire BA, Thomas-Guyon H, Burgeot T, Renault T. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. Cell Biol Toxicol 2006; 22 (1):1-14.

Gienapp P, Teplitsky C, Alho J.S, Mills J.A, Merilä J. Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. Mol Ecol. 2008;17:167–78.

Giordano F. Ouriços do sub litoral rochoso da região de São Sebastião.1986 Dissertação (Mestrado), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

Gloire G, LEGRAND-POELS S, PIETTE J. NF-kB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. Biochem Pharmacol 2006; 72: 1493-1505.

Gondim AI, Lacouth P, Alonso C, Manso CLC. Echinodermata da Praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil. Biota Neotrop. 2008; 8(2): 151-9.

Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. Curr Opin Immunol. 2006; 14:136–45.

Gross PS, Clow LA, Smith LC SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes. Immunogenetics 2000; 51: 1034–44.

Hadel VF, Monteiro AMG, Ditadi ASF, Tiago CG, Tommasi LR. Filo Echinodermata. In Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil - Invertebrados Marinhos (A.E. Migotto & C.G. Tiago, eds.). FAPESP, São Paulo, 1999; v.3, p.259-71.

Hall A, Nobes CD. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2000; 29:965–70.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science 1998; 279 (5350): 509–14.

Hansen J, Sato M, Ruedy R, Lo K, Lea DW, Medina-Elizade. Global temperature change PNAS. 2006;103 (39): 14288-93.

Hansen J, Ruedy R, Glascoe J, Sato MK, GISS analysis of surface temperature change. J Geophys Res. 1999; 104: 30997-1022.

Harvell CD, Kim K, Burkholder JM, Colwell RR, Epsterin PR, Grimes DJ et al.,. Emerging Marine Diseases – Climate Links and Anthropogenic Factors. Science. 1999; 285:505-10.
Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS et al.,. Climate Warming and Disease Risk for Terrestrial and Marine Biota. Science. 2002; 296:2158-62.

Harvell CD, Altizer S, Cattadori IM, Harrington L, Weil E. Climate change and wildlife diseases: When does the host matter the most? Ecology. 2009; 90:912–20.

Hayat MA. Fixation for electron microscopy. Academic Press, New York 1981

Hendler G, Kier PM, Miller JE, Pawson DLSea Stars, Sea Urchins, and Allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean. Washington: Smithsonian Institution Press; 1995. 390p.

Hernández M, Buckle F, Guisado C, Barón B, Estavillo N. Critical thermal maximum and osmotic pressure of the red sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus* acclimated at different temperatures. J Therm Biol. 2004; 29:231-36.

Hibino T, Loza Coll M, Messier C, Majeske A, Cohen A, Terwilliger D et al.,. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. Dev Biol. 2006; 300:349–65.

Hoegh-Guldberg O, Bruno JF. The impact of climate change on the world's marine ecosystem. Science. 2010; 328:1523.

Hsieh CC, Papaconstantinou J. Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived Snell dwarf mice. FASEB J. 2006; 20:259–68.

Huey RB. Behavioral thermoregulation in lizards: importance of associated costs. Science. 1974;184: 1001–3.

Hultqvist M, Olofsson P, Holmberg J, Bäckström B.T, Tordsson J, Holmdahl R. Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the Ncf1 gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 12646–51.

Huxley TH. On the classification of animal Kingdom – The journal of Linnaeu Society Zoology. 1875; 12(59): 199 – 226.

IPCC. 2007. Climate Change 2007: The Physical Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva: IPCC Secr.

Isaeva VV, Korenbaum ES. Defense functions of coelomocytes and immunity of echinoderms. Sov J Mar Biol. 1990; 15:353–63.

Jaumouille V, Grinstein S. Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. Curr Opin Cell Biol. 2010; 23: 22-9.

Jiravanichpaisal P, So[°]derha[°]II K, So[°]derha[°]II I. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. Fish Shell Immunol. 2004; 17:265–75.

Johansson DJA, Persson UM, Azar C. The cost of using global warming potentials: analyzing the trade off between CO2,CH4and N2O. Clim Change. 2006; 77:291–309.

Johansson MV. Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. Dev Comp Immunol. 1999;23(4-5):303-15.

Johnson PT. The coelomic elements of sea urchins (Strongylocentrotus). I. The normal coelomocytes, their morphology and dynamics in hanging drop. J Invertebr Pathol. 1969; 13:25–41.

Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. Annu Rev Biochem. 1999; 68:459–86.

Kaplan JO, New M. Arctic climate change with a 2 C global warming: Timing, climate patterns and vegetation change. - Climatic Change. 2006; 79: 213-41.

Kawakami T, Tsushima M, Katabami Y, Mine M, Ishida A, Matsuno T. Effect of beta, beta-carotene, beta-echinone, astaxanthin, fucosanthin, viatimin A and vitamin E on the biological defense of the sea urchin *Pdseudocentrotus depressus*. J Exp Mar Biol Ecol. 1998; 226(2):165-74.

Kjøller L, Hall A. Signaling to Rho GTPases. Exp Cell Res. 1999; 253:166-79.

Knight B, Laukaitis C, Akhtar N, Hotchin NA, Edlund M, Horwitz AR. Visualizing muscle cell migration *in situ*. Curr Biol. 2000; 10: 576-85.

Kobayashi N, Okamura H. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1.Tracing the cause by the effects. Chemosphere. 2004; 55:1403–12.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 388:621-5.

Lafferty KD, Porter JD, Ford SE. Are diseases increasing in the ocean? ; Annual review of ecology, evolution and systematics. 2004; 35: 31-54.

Lambrechts A, Van Troys M, Ampe C. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2004; 36: 1890–909.

Lawrence JM, Cowell BC. The righting response as an indication of stress in *Sichaster striatus* (Echinodermata, asteroidea). Mar Fresh Behav Physiol. 1996; 27:(24) 239-48.

Lebedev AV, Levitskaya EL, Tikhonova EV Inavova MV. Antioxidant properties, autooxidation, and mutagenic activity of echinochrome a compared with its etherified derivative. Biochemistry Mosc. 2001;66 (8): 885-93.

Lebensohn AM, Kirschner MW. Activation of the WAVE complex by coincident ignals controls actin assembly. Mol Cell. 2009; 36:512–24.

Lesser MP. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. Ann Rev Phisiol. 2006; 68:253-78.

Li Z, Srivastava P. Heat shock proteins. Curr Protoc Immunol. 200; Appendix 1T. doi: 10.1002/0471142735.ima01ts58.

Levitus S, Antonov J, Boyer TP, Stephens C. Warming of the world ocean. Science. 2000; 287: 2225–9.

Liang P, MacRae TH. Molecular chaperones and the cytoskeleton. J Cell Sci. 1997;110:1431–40.

Lindquist S. The heat-shock response. Annu Rev Biochem. 1986;55:1151–91

Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Kepler TB. Invetebrate immune System – not homogeneous, not simple, not well understood. Immunological Reviews. 2004;198:10-24.

Maes P, Jangoux M. The bald-sea-urchin disease: A biopathological approach. Helgoländer Meeresunters. 1984; 37: 217-24.

Mangiaterra MBBCD, Silva JRMC. Induced inflammatory process in the sea urchin (*Lytechinus variegatus*) J Inv Biol. 2001;120(2):178-84.

Martínez VG, Moestrup SK, Holmskov U, Mollenhauer J, Lozano F. The Conserved Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily in Therapy and Diagnosis. Pharmacol Ver. 2011;63(4):967-1000.

Materna SC, Cameron RA. The sea urchin genome as a window on function. Biol Bull.2008;214(3):266-73.

Matranga V, Toia G, Bonaventura R, Muller WEG. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. Cell Stress e Chaperones. 2000; 5(2):113-20.

Matranga V, Bonaventura R, Di Bella G. Hsp70 as a stress marker of sea urchin coelomocytes in short term cultures. Cell Mol Biol. 2002;48:345–59.

May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. J Cell Sci. 2001;114(6):1061-77.

May W. Assessing the strength of regional changes in near-surface climate associated with a global warming of 2°C. Climate change. 2012; 110(3-4): 619-44.

Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. Cell. 1997; 91: 295–8.

Meinshausen M, Meinshausen N, Hare W, Raper SCB, Frieler K, Knutti R et al.,. Greenhouse-gas emission targets for limiting global warming to 2 °C. Nature Letters. 2009; 458(7242): 1158.

Meredith MP, King JC. Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. Geophys Res Let. 2005; 32(19):5.

Messier-Solek C, Buckley KM, Rast JP. Highly diversified innate receptor systems and new forms of animal immunity. Semin Immunol. 2010;22: 39–47.

Moore HB, Jutare T, Baue JC, Jones JA. The biology of *Lytechinus variegatus*. Bull Marine Sci Gulf Carib. 1963; 13:23-53.

Morris RL, Hoffman MP, Obar RA, McCafferty SS, Gibbons IR, Leone AD, Cool J, Allgood EL, Musante AM, Judkins KM, Rossetti BJ, Rawson AP, Burgess DR. Analysis of cytoskeletal and motility proteins in the sea urchin genome assembly. Dev Biol. 2006; 300(1):219–37.

Mortensen T. A Monograph of the Echinoidea. Volume III. (3). Camarodonta. I. Orthopsidae, Glyphocyphidae, Temnopleuridae and Toxopneustidae. CA Reitzel, Copenhagen. 1943; vii 553 pp. 56 pls.

Murphy G, Gavrilovic J. Proteolysis and cell migration: creating a path? Curr Opin Cell Biol. 1999;11(5):614-21.

Mydlarz LD, Jones LE, Harvell CD. Innate immunity, environmental drivers and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. Ann Rev Ecol Evol Syst. 2006;37:251–88.

Newton A. Urchins in peril. Nature Reports Climate Change Published online: 5 March 2009 | doi:10.1038/climate.2009.23

Niemeyer CC, Foerster-Ziober A, Flytzanis N. Purification of a highmobilitygroup 1 sea-urchin protein and cloning of cDNAs. Gene 1995;164: 211-218.

Nishimura Y, Nakano K, Mabuchi. Localization of Rho GTPase in sea urchin eggs. FEBS Let. 1998; 441:121–6.

Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. J Cell Biol. 1999;144(6): 1235-44.

Nobes CD, Hall A. Rho, Rac and Cdc42 regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. Cell. 1995; 81:53–62.

Noor R, Mittal S, Iqbal J. Superoxide dismutase-applications and relevance to human diseases. Med Sci Monit. 2002;8:210-5.

Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. J Leukoc Biol. 2011;90(2):271-84.

Osovitz CJ, Hofmann GE. Thermal history-dependent expression of thehsp70 gene in purple sea urchins: biogeographic patterns and the effect of temperature acclimation. J Exp Mar Biol Ecol 2005;327: 134–43.

Pancer Z, Cooper MD. The evolution of adaptive immunity. Annu Rev Immunol. 2006;24: 497-518.

Pancer Z, Rast JP, Davidson EH. Origins of immunity: Transcription factors and homologues of effector genes of the vertebrate immune system expressed in sea urchin coelomocytes. Immunogenetics. 1999;49: 773-86.

Parry HE, Pipe RK. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (Mytilus edulis). Aquat Toxicol. 2004;69:311–25.

Pawson DL. Echinoidea Antarctic Map. Folio Series: American Geological Society. 1969;11:38–41.

Pearse JS. The ecological role of purple sea urchins. Science. 2006; 314: 940-1.

Pearse JS, McClintock JB, Bosch I. Reproduction of Antarctic benthic marine invertebrates: tempos, modes, and timing. American Zoologist. 1991;31:65–80.

Peck LS. Webb KE, Bail DM. Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species. Functional Ecol. 2004;18(5):625-30.

Phillips JM, Kao WJ. Macrophage adhesion on gelatin-based interpenetrating networks grafted with PEGylated RGD. Tissue Eng, 2005;11:964-73.

Pinsino A, Della Torre C, Sammarini V, Bonaventura R, Amato E, Matranga V. Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Southern Adriatic Sea, Italy.Cell Biol Toxicol. 2008;24:541-2. Pipe PK, Coles JA, Carissan FMM, Ramanathan K. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. Aquat Toxicol. 1999;46:43-54.

Pletjushkina OJ, Rajfur Z, Pomorski P, Oliver TN, Vasiliev JM, Jacobson KA. Induction of cortical oscillations in spreading cells by depolymerization of microtubules. Cell Motil. Cytoskeleton 2001;48:235–44.

Plytycz B, Seljelid R. Bacterial clearance by the sea urchin Strongylocentrotus droebachiensis, Dev Comp Immunol. 1993;17:283-9.

Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2009;29: 545-76.

Pörtner H. Climate change and temperature dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. Naturwissenschaften. 2001;88:, 137–46.

Prokopenko SN, Brumby A, O'Keefe L, Prior L, He Y, Saint R et al., A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in Drosophila. Genes Dev. 1999;13:2301-14.

Rabinovitch M. Phagocytosis. Trends Cell Biol. 1995;5:85-8.

Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. Dev Biol. 2004;265(1):23-32.

Rahmstorf S, Cazenave A, Church JA, Hansen JE, Keeling RF, Parker DE et al.,. Recent climate observations compared to projections. Science. 2007;316(5825):709.

Ramirez-Gomez F, Garcia-Arrarás JE. Echinoderm immunity. Invertebrate Surviv J. 2010; 7: 211-20.

Rast JP, Smith LC, Litman G, Coll ML. Genomic insights into the immune system of the sea urchin. Science. 2006;314:952–6.

Ratcliffe NA, Rowley AF, Fitzgerald SW, Advances CP. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. Intern Review Cytol. 1985;97:183-350.

Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTPbinding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. Cell. 1992;70(3):401-10.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G et al.,. Cell migration: integrating signals from front to back. Science. 2003;302:1704-9.

Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. J Cell Sci. 2001;114:2713-2722.

Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell. 1992;70:389-9.

Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperatures shock and DNP in Drosophila. Experientia. 1962;18: 571-3

Romer AS, Parsons TS. Anatomia comparada dos vertebrados. São Paulo, Atheneu. 1985; 558p.

Rosenstiel P, Jacobs G, Till A, Schreiber S. NOD-like receptors: ancient sentinels of the innate immune system. Cell Mol Life Sci. 2008;65:1361-77.

Rottner K, Hall A, Small JV. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. Curr Biol. 1999;9(12):640 -8.

Runcie DE, Garfield DA, Babbitt CC, Wygoda JA, Mukherjee S, et al., Genetics of gene expression responses to temperature stress in a sea urchin gene network. Mol Ecol 2012; 21(18): 4547–62.

Sarrias MR, Gronlund J, Padilla O, Madsen J, Holmskov U, Lozano F. The scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain: An ancient and highly conserved protein module of the innate immune system. Crit Rev Immunol. 2004;24:1-37.

Schmidt A, Hall A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch Genes & Dev. 2002;16:1587-609.

Sea Urchin Genome Sequencing Consortium. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Science. 2006;314:941-52.

Secombes CJ, Fletcher TC. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. Annual Review of Fish Disease. 1992;2:53-71.

Settleman J. Rho GTPases in development. Prog Mol Subcell Biol. 1999;22:201-29.

Siegenthaler U, Stocker TF, Monnin E, Luthi D, Schwander J, et al.,. Stable carbon cycle-climate relationship during the late Pleistocene. Science. 2005;310:1313–7.

Silva JRMC, Peck L. Induced in vitro phagocytosis of the Antarctic starfish Odontaster validus (Koehler, 1906) at 0oC. Polar Biol. 1999;23(4):225-30.

Silva JRMC. The onset of phagocytosis and identity in the embryo of *Lytechinus variegatus*. J Dev Comp Immunol. 2000;24:733-9.

Silva JRMC, Hernandez-Blazquez FJ, Porto-Neto LR, Borges JCS. Comparative study of *in vivo* and *in vitro* phagocytosis including germicidal

capacity in on *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 00C. J Invert Pathol. 2001;77:180-5.

Smith VJ. The echinoderms," in Invertebrate Blood Cells, eds Ratcliffe N. A., Rowley A. F., editors. (New York, NY: Academic Press;), 1981;513–62.

Smith LC, Rast JP, Brocton V, Terwilleger DP, Nair SV, Buckley KM et al.,. The sea urchin immune system. ISJ. 2006;3:25-9.

Somero GN. Linking biogeography to physiology: evolutionary and acclimatory adjustments of thermal limits. Front Zool. 2005; 2:1.

Somero GN. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine "winners" and "losers." J Exp Biol 2010; 213: 912-20.

Steffensen JP, Andersen KK, Bigler M, Clausen HB, Dahl-Jensen D, et al.,. High-resolution Greenland ice core data show abrupt climate change happens in few years. Science. 2008; 321(5889):680-4.

Tajima K, Takeuchi K, Takahata M, Hasegawa M, Watanabe S, Iqbal MM et al.,. Seasonal occurrence of the pathogenic *Vibrio sp.* of the disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* occurring of low water temperature and the preservation methods of the disease. Grad Sch Fisheries Sci. 1999;66(5):799-804.

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. Seminars in Immunol. 2004;16:3–9.

Tauber AI, Chernyak L. Metchnikoff and the origins of immunology, from metaphor to theory, Oxford University Press, New York, 247p., 1997.

Tommasi LR. 1999. Echinodermata recentes e fósseis do Brasil. Disponível em: http://www.bdt.org.br/zoologia/echinodermata

Trenberth KE. The ocean is warming, isn't? Nature. 2010;465:304.

Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. Nat Rev Immunol. 2012;12(7):492-502.

Vaughan DG, Marshall GJ, Connolley WM, Parkinson C, Mulvaney R, Hodgson DA et al., Recent Rapid Regional Climate Warming on the Antarctic Peninsula. Climatic Change. 2003;60(3):243-74.

Vernon PJ, Tang D. Eat-me: autophagy, phagocytosis, and reactive oxygen species signaling. Antioxid Redox Signal. 2013;18: 677-91.

Vidal C, Geny B, Melle J, Jandrot-Perrus M, Fontenay-Roupie M. Cdc42/Rac1dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin.

Blood. 2002; 100:4462–9.

WallinRPA, Lundqvist A, Moré SH, vonBonin A, Kiessling R, Ljunggren HS .Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. Trends Immunol.2002;23:130–5.

Watts AS, McClintock JB, Lawrence JM. *Lytechinus*. In. Lawrence JM, (Ed), Sea Urchins.: Biology and ecology. 3rd Ed. 2013, Academic Press, San Diego, CA. 475-490.

West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P et al.,. TLR signaling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. Nature. 2011;472(7344):476-80.

Whittaker CA, Bergeron KF, Whittle J, Brandhorst BP, Burke RD, Hynes RO. The echinoderm adhesome. Dev. Biol. 2006;300:252–66.

Wittmann T, Waterman-Storer CM. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? J. Cell Sci. 2001;114:3795–803.

Xia Z, Triffitt JT. A review on macrophage responses to biomaterials. Biomed Mater 2006;1(1):1-9.

Xing K, Yang HS, Chen MY. Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicas*. Aquatic Biol. 2008;2: 85–92.

Yutin N, Wolf MY, Wolf YI, Koonin EV. The origins of phagocytosis and
eukaryogenesis.BiolDirect.2009;4:9

Artigo : Cellular biomarkers to elucidate global warming effects on Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri.* Publicado em Polar Biology. 2012; 35:221-9.

ORIGINAL PAPER

Cellular biomarkers to elucidate global warming effects on Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*

Paola Cristina Branco · Leandro Nogueira Pressinotti · João Carlos Shimada Borges · Renata Stecca Iunes · José Roberto Kfoury Jr · Marcos Oliveira da Silva · Marcelo Gonzalez · Marinilce Fagundes dos Santos · Lloyd Samuel Peck · Edwin L. Cooper · José Roberto Machado Cunha da Silva

Received: 18 March 2011/Revised: 28 June 2011/Accepted: 30 June 2011/Published online: 20 July 2011 © Springer-Verlag 2011

Abstract Global warming is a reality and its effects have been widely studied. However, the consequences for marine invertebrates remain poorly understood. Thus, the present study proposed to evaluate the effect of elevated temperature on the innate immune system of Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. Sea urchins were collected nearby Brazilian Antarctic Station "Comandante Ferraz" and exposed to 0 (control), 2 and 4°C for periods of 48 h, 2, 7 and 14 days. After the experimental periods, coelomic

P. C. Branco (⊠) · L. N. Pressinotti · R. S. Iunes · M. F. dos Santos · J. R. M. C. da Silva Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Science, University of Sao Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, CEP 05508-900, Sao Paulo, SP, Brazil e-mail: pbranco@usp.br

J. C. S. Borges · M. O. da Silva Metropolitan United Faculties, School of Veterinary Medicine, Rua Ministro Nelson Hungria, 541, Sao Paulo, SP, Brazil

J. R. Kfoury Jr

Sector of Anatomy, Department of Surgery, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of Sao Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270, Sao Paulo, SP, Brazil

M. Gonzalez

Antarctic Bio-resources Laboratory, Chilean Antarctic Institute, Plaza Muñoz Gamero, 1055 Punta Arenas, Chile

L. S. Peck

Ecosystems Programme, British Antarctic Survey, High Cross, Madingley Road, Cambridge CB3 0ET, UK

E. L. Cooper

Laboratory of Comparative Neuroimmunology, Department of Neurobiology, David Geffen Scholl of Medicine at UCLA, University of California, Los Angeles, CA 190095-4763, USA fluid was collected in order to perform the following analyses: coelomocytes differential counting, phagocytic response, adhesion and spreading coelomocytes assay, intranuclear iron crystalloid and ultra structural analysis of coelomocytes. The red sphere cell was considered a biomarker for heat stress, as they increased in acute stress. Besides that, a significant increase in phagocytic indexes was observed at 2°C coinciding with a significant increase of intranuclear iron crystalloid at the same temperature and same time period. Furthermore, significant alterations in cell adhesion and spreading were observed in elevated temperatures. The ultra structural analysis of coelomocytes showed no significant difference across treatments. This was the first time that innate immune response alterations were observed in response to elevated temperature in a Polar echinoid.

Keywords Temperature rising · Global warming · Coelomocytes · Innate immune response · S. neumayeri

Introduction

According to the last report published by IPCC (*Inter-governmental Panel on Climate Change*), global warming is accelerating. The planet is becoming warmer especially in areas near the poles (Bernstein et al. 2007). Average global temperature increased 0.7° C between 1901 and 2005, and the temperature of the oceanic layers between the surface and 700 meters depth increased on average by 0.1° C (an energy input of $8.11 \pm 0.74 \times 10^{22}$ J) between 1961 and 2003 (Bindoff et al. 2007). Assessments of Antarctic temperature change have emphasized the strong warming of the Antarctic Peninsula in recent decades, with reports showing that warming has exceeded 0.1° C per

Springer

decade over the past 50 years (Steig et al. 2009). Owing in large part to increasing greenhouse gas concentrations, sea surface temperature has risen in the past century by 0.4–0.8°C. These warming trends are expected to accelerate in the current century, with implications for several additional abiotic variables. For example, as a result of warming seawater, the world oceans are expanding. Coupled with freshwater input from ice-melt, thermal expansion of the oceans is causing sea level to rise (Harley et al. 2006).

Many authors mention as a consequence of global warming an increased occurrence of diseases in the marine environment (Harvell et al. 1999; McCallum et al. 2003; Lafferty et al. 2004; Mydlarz et al. 2006). Harvell et al. (2002) demonstrated that global warming is related to the onset of diseases both directly via the increase of ocean water temperature and indirectly due to a greater incidence of UV rays that modifies the water salinity and contribute to the microorganisms' proliferation. Brock et al. (1994) affirmed that increased disease occurrence is related to a faster rate of microorganisms' proliferation at higher temperatures.

Sea urchin mortality has been correlated with environmental stress as a consequence of changes in environmental factors. A wide range of factors have been identified as causes of such mortality. These include overfishing (Jackson et al. 2001), ocean acidification (Kurihara and Shirayama 2004; Shirayama and Thornton 2005), extreme weather events (Scheibling et al. 2010) and water thermal variation (Maes and Jangoux 1984; Jones et al. 1985; Ebert et al. 1999; Tajima et al. 2000). For this reason, a study concerning sea urchins natural resistance mechanism to infection would be extremely valuable in order to correlate it with the increase in sea water temperature.

For echinoids, literature describes four types of coelomocytes: phagocytic amebocyte, vibratile cell, red sphere cell and white sphere cell (Johnson 1971; Bertheussen and Seljelid 1978; Mangiaterra and Silva 2001). Phagocytic amebocytes (PA) are used as a tool to evaluate the innate immune response in sea urchins exposed to biotic and abiotic factors (Silva et al. 2007). They can be classified into two types based on their morphology: petaloid amebocytes and fillopodial amebocytes. It has been suggested that the first type is involved in migration toward the sites of injury whereas the second one might be involved in clotting (Matranga et al. 2005). Smith et al. (2006) reported their role in graft rejection, chemotaxis, phagocytosis, encapsulation, immune gene expression and agglutination. Red and white sphere cells are identical in size and are both ameboid (Matranga et al. 2006). Red sphere cells contain in their cytoplasm granules of echinocrome A, an antimicrobial substance that might play a role in innate immune

Springer

defense (Smith et al. 2006). According to the same authors, the roles of white sphere and vibratile cells remain obscure. Some authors reported that there are immune genes homologous to vertebrate ones expressed in sea urchin coelomocytes, such as profilin (Smith et al. 1992), *NFKB* homolog (*SpNFKB*), a GATA-2/3 homolog (*SpGATAc*; Pancer et al. 1999).

Phagocytosis has been recognized as a mechanism of innate immune defense since the late nineteenth century when Elie Metchnikov first proposed that mobile phagocytic cells survey tissues for foreign particles and engage in pitched battles with potential pathogens (Tauber and Chernyak 1997). Phagocytic activity of amebocytes has also been used as a biological method for the evaluation of natural resistance mechanisms to infection in sea urchin exposed to adverse abiotic factors (Kawakami et al. 1998; Tajima et al. 2007).

The aim of this study was to evaluate the effect of an increase in sea water temperature on the innate immune system of the Antarctic sea urchin, as well as to determine possible cellular biomarkers for heat stress.

Materials and methods

Sea urchin collection and maintenance

Antarctic sea urchins *Sterechinus neumayeri* (n = 60), males and females, were collected from sites near the Brazilian Antarctic Station "Comandante Ferraz", King George Island, South Shetland (S 62°09.568'; W 058°26.959') with a drag net during the summer of 2009/2010 from depths of 3–6 m. The mean weights and volumes of the animals were 58.05 ± 5.27 g and 50.45 ± 7.95 ml.

Sea urchins were kept in glass fiber tanks (500 liters) with 50% of the sea water renewed daily in the bioterium of the Brazilian Antarctic Station. They were acclimated for 1 week before experiments. Temperature and salinity were monitored and maintained at 0°C and 34‰ respectively. After 7 days of acclimation period, sea urchins were transferred to experimental tanks (35 liters, 7 liters per animal), where they remained during the entire experimental period. The water was replaced daily after being previously warmed to the relevant experimental temperature. Tanks were equipped with Better Sarlo S90® (90 liters per hour) submersible aquarium pumps and aerators in order to maintain the level of dissolved oxygen unaltered. Besides that, weekly tests of pH, nitrite and nitrate were performed and maintained at 8.0; <0.3 mg/l and 5 mg/l respectively in all groups analyzed, without oscillation despite the temperature rise.

Sea water temperature in the holding system was kept at 0 ± 0.1 °C on average. Chronic thermal variation was

Polar Biol (2012) 35:221-229

performed increasing 1°C per day until the experimental temperature was reached (2 or 4°C) where sea urchins remained for additional 2, 7 or 14 days prior to later analysis. Acute thermal variation was performed increasing abruptly the temperature to the experimental temperatures, where animals were maintained for 24 h prior to analysis. These temperatures were chosen due to their capacity to promote cellular and physiological alterations but without causing sea urchins' death.

Sea water temperature was maintained with precision of 0.1°C with thermostat Full Gauge TIC 17 RGTi[®] and a 300 W aquarium heater, and air temperature was maintained with conditioned air.

Perivisceral coelomic fluid collection

Coelomic fluid was collected via the peristomial membrane with a needle 12.7×0.33 mm and a syringe of 1 ml. The needle was obliquely introduced in order to avoid puncturing intestines and gonads. Differential counting of coelomocytes was performed in a glass slide in 100 cells to obtain a percentage of each cell type.

Cell viability assay

Cell viability was determined by Trypan Blue (0.4%) exclusion technique according to Freshney's protocol (1987). Trypan blue is a vital dye and its interaction with the cell is absent unless a membrane lesion is present. Thus, all cells which presented exclusion to the dye were considered viable.

Phagocytosis assay

Approximately 100 μ g of yeast were diluted in sea water. Yeasts were counted in a Neubauer chamber. A proportion of 10 yeasts per phagocytic amebocyte were obtained.

The phagocytosis assay was performed using 100 μ l of coelomic fluid for 1 h for the cell spreading. After this period, a suspension of yeasts in sea water was added in the proportion previously explained (Borges et al. 2002). Coelomocytes were exposed to the yeasts for 1 h and, after such period, cells were observed by phase microscopy for the evaluation of phagocytic indexes. During the entire incubation period with yeasts, the glass slides were maintained at the same experimental temperature that animals had been exposed (2 and 4°C). For germicide capacity, two staining techniques were used to determine yeast viability: ethidium bromide and fluorescein diacetate (Calich et al. 1978).

Phagocytic indexes were used according to Silva and Peck (2000) and were calculated based on the following: Phagocytic capacity: PC

_	io. of phagocytic amoebocyte phagocytosing	3
_	total number of phagocytic amoebocyte	

Phagocytic index: PI $= \frac{\text{total number of phagocytosed yeast}}{\text{no. of phagocytic amoebocyte phagocytosing}}$ Germicide capacity: GC = $\frac{\text{number of dead yeasts}}{25 \text{ phagocytosed yeasts}}$

Germicide capacity of coelomic fluid

After coelomic fluid collection, 1 ml was placed in an eppendorff tube and centrifuged for 5 min at 1000G. The pellet was removed, and the supernatant liquid was used to perform this test. The supernatant (100 μ l) was placed on a glass slide for 2 h and the ethidium bromide and fluorescein diacetate were used as previously described. The germicide capacity of coelomic fluid was determined for 100 yeasts.

Adhesion cell capacity determination

An amount of 100 μ l of coelomic fluid was placed on glass slides and kept at the relevant experimental temperature for different periods (2, 5, 10, 15 and 30 min). After this time, glass slides were washed in sea water and cells that had adhered to the slide fixed in modified McDowell solution (4% paraphormaldehyde and 2% glutaraldehyde diluted in sea water; Mcdowell and Trump 1976). The percentage of adhered cells was determined establishing a correlation between the quantities of cells obtained in 100 μ l of coelomic fluid observed in Neubauer chamber before and after the different periods of adherence.

Spreading capacity determination

An amount of 100 μ l of coelomic fluid was placed on glass slides and kept at room temperature for different periods (15, 20, 30 and 60 min). After this, the slides were washed in sea water and fixed in modified McDowell solution (4% paraphormaldehyde and 2% glutaraldehyde diluted in sea water; Mcdowell and Trump 1976). The percentage of spread cells was determined from counts of 100 cells. Cells were considered spread when they presented lamelipodia and were in an elongated shape.

Coelomocytes ultra structural analysis

For ultra structural analysis, coelomocytes were fixed in a cold 2.5% glutaraldehyde solution (Hayat 1981). Cells were post-fixed in 1% osmium tetroxyde in a phosphate

🖉 Springer

223

buffer with sucrose for 2 h at 4°C. After that, cell pellets were placed in 0.5% uranile acetate in distilled water with sucrose 1% at 4°C for 24 h. After dehydration in a series of alcoholic solutions from 70 to 100%, two immersions in propylene oxide were conducted for 20 min each, followed by propylene oxide and Araldite infiltration for 12 h, at room temperature on a shaking platform. Cell pellets were then placed in SpurrTM resin, placed in molds and put into oven at 70°C for 5 days for polymerization. For semi-thin microtome sections, (0.5 µm thick) an LKB Porter Blum MT1 ultramicrotome was used; for ultrathin sections (approximately 70 nm), an LKB Porter Blum MT2 ultramicrotome was used. Sections were floated onto copper grids then stained using 2% uranile acetate in distilled water for 1 h and washed in distilled water for 30 min (Reynolds 1963). Observation was performed using a JEOL-JEM-100 CXII Transmission Electron Microscopy (TEM).

Iron crystalloid counting

For the iron crystalloid counting, sample of 100 μl of perivisceral coelomic fluid was obtained and after 1 h spreading on glass slides, coelomic fluid was fixed in modified McDowell solution. Slides were then placed in Perls staining solution with 1% potassium ferrocyanide solution added for 1 h. After this, glass slides were washed and samples counter stained with 2% safranin O for 3 min.

Statistical analysis

Statistical analysis was executed using ANOVA and Tukey's test (GraphPad Software Inc.). Statistical difference was considered significant when P < 0.05.

Results

There was only one coelomocyte type that changed significantly when exposed to elevated temperatures in the differential cell counts, and this was only in one of the acute heating treatments (2°C) after 24 h. Red sphere cells increased from 5.20% (SD = 1.92) in 0°C controls to 18.60 (SD = 4.72; Table 1). There were no changes at any of the other time periods (2, 7 or 14 days).

A similar result was obtained for phagocytic indexes where the only significant difference was an increase in Phagocytic capacity (PC) to 43.16% (SD = 16.7) which was significantly higher than the control group value of 14.36% (SD = 9.44). Likewise, germicide capacity (GC) was also higher at 2°C after 24-h exposure (P < 0.01), and not at the other temperature or time periods (Table 1).

Springer

Polar Biol	(2012) 35:221-229

Period 24 h n (animals) 5					2				4			
		2d 5	7d 5	14d 5	24 h 5	2d 5	7d 5	14d 5	24 h 5	2d 5	7d 5	14d 5
Percentage of PA 65.70	0 ± 1.98	61.71 ± 7.87	65.71 ± 6.21	69.25 ± 10.08	50.00 ± 3.31	54.81 ± 4.96	55.31 ± 9.87	60.88 ± 6.45	49.00 ± 7.96	58.62 ± 9.13	58.95 ± 8.12	57.63 ± 5.5
Percentage of CSC 21.6(0 ± 3.84	17.57 ± 2.94	20.29 ± 3.86	20.00 ± 7.26	24.20 ± 1.92	25.00 ± 4.24	19.77 ± 7.94	18.00 ± 4.90	28.20 ± 6.42	18.69 ± 3.59	20.58 ± 8.35	26.63 ± 5.1
Percentage of RSC 5.20	$P \pm 1.92$	11.28 ± 7.36	8.29 ± 4.68	4.00 ± 0.58	$18.60^b\pm4.72$	$12.3 \ 8 \pm 5.52$	21.31 ± 8.84	15.25 ± 3.41	$13.00^{ab}\pm4.85$	15.31 ± 7.67	5.98 ± 2.69	5.88 ± 2.1
Percentage of VC 7.5(0 ± 2.91	9.28 ± 5.02	6.00 ± 2.24	5.50 ± 2.52	6.60 ± 1.52	7.81 ± 3.02	5.15 ± 1.95	5.75 ± 2.76	9.80 ± 2.38	7.46 ± 3.10	14.30 ± 9.12	9.50 ± 3.3
Phagocytic capacity 14.36	S ^a ± 9.44	28.62 ± 5.94	23.28 ± 12.77	35.41 ± 11.06	$43.16^{b} \pm 16.70$	27.83 ± 16.12	20.37 ± 9.43	32.60 ± 10.47	$24.63^{ab} \pm 8.46$	31.42 ± 15.20	32.16 ± 6.48	22.89 ± 9.2
Phagocytic index 2.11	1 ± 0.20	1.89 ± 0.20	1.74 ± 0.28	2.11 ± 0.55	2.10 ± 0.25	1.89 ± 0.42	1.80 ± 0.34	2.06 ± 0.22	1.74 ± 0.34	2.04 ± 0.59	2.09 ± 0.38	2.03 ± 0.6
Germicide capacity 2.65	$5^{a} \pm 1.53$	4.39 ± 1.98	5.71 ± 5.36	2.56 ± 1.78	$4.67^{b} \pm 0.46$	2.15 ± 1.66	2.47 ± 2.33	2.57 ± 2.09	$3.85^{ab} \pm 3.02$	2.82 ± 2.35	2.30 ± 0.51	3.01 ± 1.7
Germicide capacity 1.14 coelomatic fluid	4 ± 0.20	0.98 ± 0.50	1.23 ± 0.90	1.00 ± 0.10	1.45 ± 1.0	0.80 ± 0.10	1.20 ± 0.30	1.45 ± 0.30	2.15 ± 1.15	2.10 ± 0.80	1.25 ± 0.90	1.10 ± 0.4
Iron Crystalloid (%) 72.00) ^a ± 5.25	71.00 ± 5.75	71.00 ± 5.15	70.54 ± 6.15	$83.00^{\rm b}\pm 5.89$	74.85 ± 6.30	72.40 ± 7.20	71.60 ± 6.63	$72.30^{a} \pm 6.15$	73.80 ± 7.27	70.89 ± 5.89	71.30 ± 6.2
Values quoted are mean ± S	SD											
PA phagocytic amebocyte, C	CSC colorle	ss sphere cell, h	SSC red sphere or	ell, VC vibratile c	ell. Periods of hea	at exposition: 24 h	i (acute test), 2d 2	2 days, 7d 7 days	, 14d 14 days			

Polar Biol (2012) 35:221-229

Additionally, a positive correlation was observed between the percentage of red sphere cells and the PC in the acute (24 h) period (Fig. 1).

Coelomocyte cell viability was analyzed in all animals and all experimental periods; viability was above 97% with no significant differences between groups. Control coelomocytes had started to adhere to glass within 5 min and spread within 15 min, with the maximum rate of adhesion at 15 min and of spreading at 60 min. Animal coelomocytes exposed to higher temperatures presented a retardation in both parameters: at 2°C adhesion started at 10 min, reaching a peak after 20 min, whereas cell spreading started at 30 min; at 4°C, adhesion started at 20 min and was impaired (only 30%), and cell spreading at this temperature was extremely reduced as well (Figs. 2 and 3).

Regarding TEM analysis, no ultra structural difference was observed among the groups studied (data not shown). PA presented a large, central nucleus with loose chromatin, very well-evident nucleolus, in its cytoplasm a high quantity of perinuclear rough endoplasmic reticulum, glo-



Fig. 1 Positive correlation between phagocytic capacity (PC) and percentage of red sphere cells (RSC) in the sea urchin S. neumayeri. Open triangle 0°C, dots 2°C, plus 4°C



Fig. 2 Effects of acute temperature increase (within 24 h) on amebocyte cellular adhesion in the Antarctic sea urchin *S. neumayeri*. Increasing temperature retards or impairs cellular adhesion to glass



Fig. 3 Effects of acute temperature increase (within 24 h) on cellular spreading in the Antarctic sea urchin *S. neumayeri*. Increasing temperature severely impairs cellular spreading on glass

boid mitochondria and scarce vacuoles. Colorless sphere cells presented a small, peripheral nucleus with dense chromatin and its cytoplasm was fulfilled with electron lucent vesicles containing a more electron dense center. Red sphere cells presented similar characteristics to colorless sphere cells, except for the fact that the vesicle content was heterogeneous, varying from electron lucent to electron dense. Such heterogeneity could be due to different levels of maturation in the granules.

Iron crystalloid analysis presented a significant increase of 83% (SD = 5.89; P < 0.05) in PA at 2°C when compared to 72.0% (SD = 5.25) in the control group (0°C) in acute experiments (Table 1).

Discussion

Coelomocytes differential counting maintained the same proportion of cell types in all experimental groups. The predominant group was PA. Data obtained corroborate with those found by Isaeva and Korenbaum (1990), Borges et al. (2002) and Matranga et al. (2005) for polar and temperate sea urchin.

Results obtained related to the number of red sphere cells permit inferring that red sphere cells play an important role in the immune response in sea urchins, increasing in response to acute and chronic stress. Increases of this cell type have been documented in many studies reporting different kinds of stress: lesion on skeleton and dermis (D'Andrea-Winslow and Novitski 2008); environmental contamination by metals such as iron, copper and zinc (Pinsino et al. 2008); environmental contamination by oil soluble fraction (Borges et al. 2010); environmental contamination by industrial residues (Matranga et al. 2000). Thermal stress has also been investigated in temperate sea urchins. Data obtained by Matranga et al. (2000) for Paracentrotus lividus from the Gulf of Palermo showed both cold and heat stress induced an increase of Hsp70, a chaperone with immune stress marker potential. From the results presented here, it is now possible to affirm for the

Springer

226

first time that thermal stress also provokes a higher level of these cells in the perivisceral coelomic fluid in a polar echinoid.

One possibility to explain the increase of red sphere cell in response to thermal stress is due to the presence of same color granules in its interior, such granules contain echinochrome A, an antibacterial substance (Smith et al. 2006). Echinochrome, or 6-ethyl-2,3,5,7,8-pentahydroxy-1,4naphthoquinone has been linked with the scavenging of peroxy radicals in liposomes, trapping of superoxide anion radicals and binding of ferrous ions to inactive complexes in the aqueous phase (Lebedev et al. 2001). The increase of this cell population in response to stress could be a consequence of a self-protective reaction. Due to the chronic stress, organism becomes more vulnerable to opportunistic pathogens; thus, a higher level of cells which degranulate bacterial substance would be of great importance as a defense mechanism.

Phagocytic capacity in the control group observed in the present study was similar to those results found in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* by Borges et al. (2002). Phagocytic index (PI) conversely was higher in control groups here than those found by the same authors despite the use of the same methodology.

The Antarctic species studied here showed no significant differences in PC values with the exception of the acute warming, where values were higher at 2°C when compared to the control group. This result disagrees with Jiravanichpaisal et al. (2004) who found that immunological capacity decreased at increased temperatures in shrimps exposed to acute thermal stress. This phenomenon could be consequence of climatic oscillations in polar environment which experienced a sea temperature rise of 1°C over the last 50 years (Meredith and King 2005). The sea urchins are naturally exposed to thermal oscillation over the seasons contrary to shrimps which are cultivated in a fixed temperature and consequently are not exposed to temperature oscillations over the year.

Germicide capacity (GC) followed the same pattern as above. A significant difference was only observed in the acute period and only when temperature was increased to 2°C. The effect of environmental temperature was simulated in bioassays in in vitro amebocytes aclimatation of sub polar sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* to different temperatures (1, 10 and 23°C); the habitat temperature of this animal is an average of 6°C; therefore, bacterial activity of amebocyte acclimated in this case is directly stimulated by temperature increasing (Plytycz and Seljelid 1993). Such results partly disagree with those obtained in the present study where only in 2°C was observed a large GC, followed by a decrease in 4°C. However, when data concerning coelomocytes adhesion and spreading capacity are also considered, it seems likely

Springer

that the GC decrease at 4°C could be the result of a decrease in spreading capacity that consequently leads to a phagocytosis delay and then a reduction in activity of enzymes responsible for foreign body degradation.

Phagocytosis is part of innate immunity. It is a cellular response by which phagocytes engulf particles bigger than 0.5 μ m (Rabinovitch 1995), and the size of the phagosome is determined by the size of the phagocytosed particle (Secombes 1996). The present study demonstrated that phagocytosis in *S. neumayeri* was exclusively performed by PA, and other cell types did not participate in this process. This agrees with the literature for all echinoderms (Johnson 1969; Bertheussen and Seljelid 1978; Smith et al. 2006).

Phagocytosis is divided into three distinct phases: particle adherence to the cell surface, ingestion involving phagosome formation and the destruction of internalized particle (Secombes 1996). Yeasts *S. cerevisae* are widely used in phagocytosis assays due to the presence of β -glucan in its membrane, which acts as a very efficient stimulator of innate immune response (Secombes and Fletcher 1992), besides that *S. cerevisae* are non-pathogenic microorganisms and very easy to obtain, which contributes to its use as phagocytosis inductor. Moreover, its use is allowed in Antarctic environments as it does not produce either toxic or pathogenic residues.

Actin polymerization occurs following signal transduction after the initial contact between the particle and the phagocyte. The link to receptors and the activation of the intracellular signaling cascade are not fully understood, although recent studies have demonstrated the role of the Rho family of GTPases in the reorganization of the actin cytoskeleton during particle capture by phagocytes (Caron and Hall 1998). The Rho protein family is part of the Ras superfamily, and some of these increase actin-myosin IIbased contractility in the cell. These proteins cycle between an active (GTP-bound) state and an inactive (GDP-bound) state (Ridley 2001). There are more than 20 genes coding Rho proteins, and among the most conserved and widely expressed are Rho A, B and C, Rac (1, 2 and 3) and Cdc42.

The delays seen here in cell spreading at elevated temperatures could be due to alterations in cytoskeleton protein polymerization such as actin F, which modifies filopodium and lamellipodium formation. Both of these structures play a crucial role in the initial phases of phagocytosis (Lambrechts et al. 2004). Considering that cell viability test revealed a viability rate superior of 97%, this reinforces the hypothesis that PC decrease seen at 4°C is indeed due to cytoskeleton alterations. Thus, aiming to complement data obtained would be interesting to evaluate GTPases involved in this process (Hall and Nobes 2000): Rac to lamellipodium emission, Cdc42 to help cell migration and Rho that promote continuous adhesion during cell movement, with fiber stress formation (Nobes and Hall 1999). The evaluation of these factors in future studies would widen understanding of sea urchin phagocytosis and elucidate what mechanisms would be more affected by thermal stress.

The Sea Urchin Genome Sequencing Consortium et al. (2006) reported the sequence and analysis of the 814-megabase genome of the sea urchin *Strongylocentro-tus purpuratus*. They documented the presence of the main representative cytoskeleton proteins such as: actin, myosin II, tubulin and intermediate filaments (Morris et al. 2006). Boureux et al. (2007) demonstrated the conservation of Rho family proteins in phylogenetic context and concluded that among the inferior coelomates only sea urchins have a Rho family gene structure similar to vertebrates. The literature contains many studies that have evaluated the role of this gene family in sea urchin embryos (Nishimura et al. 1998; Cuéllar-Mata et al. 2000; Beane et al. 2006).

The intranuclear iron crystalloid is a structure found exclusively in echinoderms (Hobaus 1978) and its analysis here demonstrated a significant increase in trials at 2°C. Considering that PC also increased in the same trials, it can be inferred that this structure is involved in the immune response, as was proposed by Bachmann et al. (1980) whose experiments clearly demonstrate a crystalloid increase after phagocytic activity.

It is known that the crystalloid is formed by a protein structurally similar to ferritin (Karasaki 1965). Furthermore, increased iron release has been demonstrated in the acute immune response (Beck et al. 2001), what suggests a positive correlation between iron metabolism and the immune response, which is supported by the large quantity of crystalloids seen in animals exposed to 2°C, and that the increase in these nuclear structures coincides with a large PC.

Conclusion

The present work studied for the first time the correlation between increase of sea water temperature and innate immune response in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. Increase of temperature affected the phagocytic response, adhesion and spreading of coelomocytes. Besides that, the quantity of intranuclear iron crystalloid and the percentage of red sphere cells were both considered as biomarkers for heat stress. The present results, combined with those of Matranga et al. (2000) strongly enhance knowledge of cellular and molecular biomarkers in echinoderms. More questions were raised concerning the molecular mechanisms involved in the cited alterations in Antarctic sea urchins, and more studies should be carried out aiming to answer such questions.

Acknowledgments The authors want to express their acknowledgements to Secirm (Secretaria Interministerial para os Recursos do 146

Mar) and the Brazilian Navy for logistical support in Antarctica, CEBIMar-USP for supporting the pilot experiments and to FAPESP, CAPES and CNPq for financial support.

References

- Bachmann S, Pohla H, Goldschmid A (1980) Phagocytes in the axial complex of the sea urchin Sphaerechinus granularis (Lam.) fine structure and X-ray microanalysis. Cell Tissue Res 31:109–120. doi:10.1007/BF00236924
- Beane WS, Voronina E, Wessel GM, McClay DR (2006) Lineagespecific expansions provide genomic complexity among sea urchin GTPases. Dev Biol 300:165–179. doi:10.1016/j.ydbio. 2006.08.046
- Beck G, Ellis T, Zhang HY, Lin WY, Beauregard K, Habicht GS, Truong N (2001) Nitric oxide production by coelomocytes of Asterias forbesi. Dev Comp Immunol 25:1–10. doi:10.1016/ S0145-305X(00)00036-7
- Bernstein L, Bosch P, Canziani O, Chen Z, Christ R, Davidson O, Hare W, Huq S, Karoly D, Kattsov V, Kundzewicz Z, Liu J, Lohmann U, Manning M, Matsuno T, Menne B, Metz M, Mirza M, Nicholls N, Nurse L, Pachauri R, Palutikof J, Parry M, Qin D, Ravindranath N, Reisinger A, Ren J, Riahi K, Rosenzweig C, Rusticucci M, Schneider S, Sokona Y, Solomon S, Stott P, Stouffer R, Sugiyama T, Swart R, Tirpak D, Vogel C, Yohe G (2007) Climate change 2007: synthesis report
- Bertheussen K, Seljelid R (1978) Echinoid phagocytes in vitro. Exp Cel Res 111:401-412. doi:10.1016/0014-4827(78)90185-4
- Bindoff NL, Willebrand J, Artale V, Cazenave A, Gregory J, Gulev S, Hanawa K, Le Quéré C, Levitus S, Nojiri Y, Shum CK, Talley LD, Unnikrishnan A (2007) Observations: oceanic climate change and sea level. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (eds) Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge
- Borges JCS, Porto-Neto LR, Mangiaterra MBCD, Jensch-Junior BE, Silva JRMC (2002) Phagocytosis in vivo and in vitro in the Antarctic Sea Urchin Sterechinus neumayeri at 0°C. Polar Biol 25:891–897. doi:10.1007/s00300-002-0431-6
- Borges JCS, Branco PC, Pressinotti LN, Severino D, Silva JRMC (2010) Intranuclear crystalloids of Antarctic sea urchins as a biomarker for oil contamination. Polar Biol 33(6):843–849. doi: 10.1007/s00300-009-0762-7
- Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P (2007) Evolution of the Rho Family of Ras-Like GTPases in Eukaryotes. Mol Biol Evol 24(1):203–216. doi:10.1093/molbev/msl145
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J (1994) Biology of microorganism, 7th edn. Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs
- Calich VLG, Purchio A, Paula CR (1978) A new fluorescent viability test for fungi cells. Mycopathol 66(3):175–177. doi:10.1007/ BF00683967
- Caron E, Hall A (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. Science 282:1717–1721. doi:10.1126/science.282.5394.1717
- Cuéllar-Mata P, Martínez-Cadena G, López-Godínez J, Obregón A, García-Soto J (2000) The GTP-binding protein RhoA localizes to the cortical granules of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin egg in secreted during fertilization. Eur J Cell Biol 79(2):81–91. doi:10.1078/S0171-9335(04)70010-2
- D'Andrea-Winslow L, Novitski AK (2008) Active bleb formation in abated Lytechinus variegatus red spherule cells after disruption of acto-myosin contractility. Integr Zool 3(2):115–122. doi: 10.1111/j.1749-4877.2008.00086.x

🖉 Springer

228

Polar Biol (2012) 35:221-229

- Ebert TA, Dixon JD, Schroeter SC, Kalvass PE, Richmond NT, Bradbury WA, Woodby DA (1999) Growth and mortality of red sea urchins *Strongylocentrotus franciscanus* across a latitudinal gradient. Mar Ecol Prog Ser 190:189–209. doi:10.2983/0730-8000-27.5.1291
- Freshney RI (1987) Culture of animal cells: a manual of basic technique, 2nd edn. New York
- Hall A, Nobes CD (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 29:965–970. doi:10.1098/ rstb.2000.0632
- Harley CDG, Hughes AR, Hutgren KM, Miner BG, Sorte CJB, Thornber CS, Rodriguez LF, Tomanek L, Williams SL (2006) The impacts of climate change in coastal marine systems. Ecol Lett 9(2):228–241. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00871.x
- Harvell CD, Kim K, Burkholder JM, Colwell RR, Epsterin PR, Grimes DJ, Hofmann EE, Lipp EK, Osterhaus ADME, Overstreet RM, Porter JW, Smith GW, Vasta GR (1999) Emerging marine diseases—climate links and anthropogenic factors. Science 285:1505–1510. doi:10.1126/science.285.5433.1505
- Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, Samuel MD (2002) Climate warming and disease risk for terrestrial and marine biota. Science 296:2158–2162. doi: 10.1126/science.1063699
- Hayat MA (1981) Fixation for electron microscopy. Academic Press, New York
- Hobaus E (1978) Studies on phagocytes of regular sea urchins (Echinoidea, Echinodermata) I—the occurrence of iron containing bodies within the nuclei of phagocytes. Zoo Anz 200:31–40. doi:10.1007/BF00236924
- Isaeva VV, Korenbaum ES (1990) Defence functions of coelomocytes and immunity of echinoderms. Sov J Mar Biol 15:353–363
- Jackson JBC, Kirby MX, Berger WH, Bjorndal KA, Botsford LW, Bourque BJ, Bradbury RH, Cooke R, Erlandson J, Estes JA, Hughes TP, Kidwell S, Lange CB, Lenihan HS, Pandolfi JM, Peterson CH, Steneck RS, Tegner MJ, Warner RR (2001) Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. Science 293:629–638. doi:10.1126/science.1059199
- Jiravanichpaisal P, Söderhäll K, Söderhäll I (2004) Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. Fish Shell Immunol 17:265–275. doi:10.1016/j.fsi.2004.03.010
- Johnson PT (1969) The coelomic elements of sea urchins (Strongylocentrotus). I. The normal coelomocytes, their morphology and dynamics in hanging drop. J Invertebr Pathol 13:25–41. doi: 10.1016/0022-2011(69)90236-5
- Johnson PT (1971) Studies on disease urchins from Point Loma. In: Kelp habitat improvement project annual report, 1970–71. Calif. Inst. Technol., Pasadena
- Jones GM, Hebda AJ, Scheibling RE, Miller RJ (1985) Histopathology of the disease causing mass mortality of sea urchins (*Strongylocentrotus droebachiensis*) in Nova Scotia. J Inv Pathol 45:260–271. doi:10.1016/0022-2011(85)90102-8
- Karasaki S (1965) Intranuclear crystal within the phagocytes of the ovary of Arbacia punctulata. J Cell Biol 25(1):654–660. doi: 10.1083/jcb.25.3.654
- Kawakami T, Tsushima M, Katabami Y, Mine M, Ishida A, Matsuno T (1998) Effect of beta, beta-carotene, beta-echinone, astaxanthin, fucosanthin, vitamin A and vitamin E on the biological defense of the sea urchin *Pdseudocentrolus depressus*. J Exp Mar Biol Ecol 226(2):165–174. doi:10.1056/NEJM199404143301501
- Kurihara K, Shirayama Y (2004) Effects of increased atmospheric CO2 on sea urchin early development. Mar Ecol Prog Ser 274:161–169. doi:10.3354/meps274161
- Lafferty KD, Porter JD, Ford SE (2004) Are diseases increasing in the ocean? Ann Rev Ecol Evol Syst 35:31–54. doi:10.1146/annurev. ecolsys.35.021103.105704

- Lambrechts A, Van Troys M, Ampe C (2004) The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. Int J Biochem Cell Biol 36:1890–1909. doi:10.1016/j.biocel.2004.01.024
- Lebedev AV, Levitskaya EL, Tikhonova EV, Ivanova EV (2001) Antioxidant properties, autooxidation, and mutagenic activity of echinochrome a compared with its etherified derivative. Biochem (Mosc) 66(8):885–893. doi:10.1023/A:10119048 19563
- Maes P, Jangoux M (1984) The bald-sea-urchin disease: a biopathological approach. Helgol Mar Res 37:217–224. doi:10.1007/ BF01989306
- Mangiaterra MBBCD, Silva JRMC (2001) Induced inflammatory process in the sea urchin (*Lytechinus variegatus*). J Inv Biol 120(2):178–184. doi:10.1111/j.1744-7410.2001.tb00122.x
- Matranga V, Toia G, Bonaventura R, Muller WEG (2000) Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. Cell Stress Chaperon 5(2):113–120. doi:csac.2000.158
- Matranga V, Pinsino A, Celi M, Natoli A, Bonaventura R, Schröder HC, Müller WEG (2005) Monitoring chemical and physical stress using immune cells. In: Matranga V (ed) Echinodermata. Springer, Berlin, pp 85–110
- 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. Mar Biol 149:25–34. doi:10.1007/s00227-005-0212-1
- McCallum H, Harvell D, Dobson A (2003) Rates of spread of marine pathogens. Ecol Lett 6(12):1062–1067. doi:10.1046/j.1461-0248.2003.00545.x
- McDowell M, Trump BF (1976) Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. Arch Pathol Lab Med 100:405–414
- Meredith MP, King JC (2005) Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. Geophys Res Let 32(19):5. doi:10.1029/2005GL024042
- Morris RL, Hoffman MP, Obar RA, McCafferty SS, Gibbons IR, Leone AD, Cool J, Allgood EL, Musante AM, Judkins KM, Rossetti BJ, Rawson AP, Burgess DR (2006) Analysis of cytoskeletal and motility proteins in the sea urchin genome assembly. Dev Biol 300(1):219–237. doi:10.1016/j.ydbio. 2006.08.052
- Mydlarz LD, Jones LE, Harvell CD (2006) Innate immunity, environmental drivers and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. Ann Rev Ecol Evol Syst 37:251–288. doi:10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110103
- Nishimura Y, Nakano K, Mabuchi I (1998) Localization of Rho GTPase in sea urchin eggs. FEBS Let 441:121–126. doi: 10.1016/S0014-5793(98)01531-2
- Nobes CD, Hall A (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. J Cell Biol 144(6): 1235–1244. doi:10.1083/jcb.144.6.1235
- Pancer Z, Rast JP, Davidson EH (1999) Origins of immunity: transcription factors and homologues of effector genes of the vertebrate immune system expressed in sea urchin coelomocytes. Immunogen 49:773–786. doi:10.1007/s002510050551
- Pinsino A, Della Torre C, Sammarini V, Bonaventura R, Amato E, Matranga V (2008) Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Italy. Cell Biol Toxicol 24(6):541–552. doi:10.1007/s10565-008-9055-0
- Plytycz B, Seljelid R (1993) Bacterial clearance by the sea urchin Strongylocentrotus droebachiensis. Dev Comp Immunol 17:283–289. doi:10.1016/0145-305X(93)90047-T
- Rabinovitch M (1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. Trends Cell Biol 5:85–88. doi:10.1016/S0962-8924(00)88955-2

D Springer

Polar Biol (2012) 35:221-229

- Reynolds ES (1963) The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17:208-212
- Ridley AJ (2001) Rho GTPases and cell migration. J Cell Sci 114:2713–2722
- Scheibling RE, Feehan C, Lauzon-Guay JS (2010) Disease outbreaks associated with recent hurricanes cause mass mortality of sea urchins in Nova Scotia. Mar Ecol Prog Ser 408:109–116. doi: 10.3354/meps08579
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, Sodergren E, Weinstock GM, Davidson EH, Cameron RA, Gibbs RA, Angerer RC, Angerer LM, Arnone MI et al (2006) The genome of the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus. Science 314(5801):941– 952. doi:10.1126/science.1133609
- Secombes CJ (1996) The non-specific immune system: cellular defenses. In: Iwama G, Nakanishi T (eds) The fish immune system: organism, pathogen, and environment. Academic Press, UK, pp 63–95
- Secombes CJ, Fletcher TC (1992) The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. Ann Rev Fish Disease 2:53–71. doi:10.1016/0959-8030(92)90056-4
- Shirayama Y, Thornton H (2005) Effect of increased atmospheric CO2 on shallow water marine benthos. J Geophys Res 110:C09S08. doi:10.1029/2004JC002618
- Silva JRMC, Peck L (2000) Induced in vitro phagocytosis of the Antarctic starfish Odontaster validus (Koehler, 1906) at 0°C. Polar Biol 23(4):225–230. doi:10.1007/s003000050438

- Silva JRMC, Vellutini BC, Porto Neto LR, Pressinotti LN, Ramos MC, Cooper EL, Hernandez-Blazquez FJ, Jensch Junior BE, Borges JCS (2007) Resposta imune inespecífica de animais ectotérmicos Antárticos sob temperatura polares. Oecol Bras 11(1):110–112. doi:10.4257/oeco.2007.1101.11
- Smith LC, Britten RJ, Davidson EH (1992) SpCoel1, a sea urchin profilin gene expressed specifically in coelomocytes in response to injury. Mol Biol Cell 3:403–414
- Smith LC, Rast JP, Brocton V, Terwilleger DP, Nair SV, Bucley KM, Majestke AJ (2006) The sea urchin immune system. ISJ 3:25–29
- Steig EJ, Schneider DP, Rutherford SD, Mann ME, Comiso JC, Shindell DT (2009) Warming of the Antarctic ice-sheet surface since the 1957 International Geophysical Year. Nature Lett 457:459–462. doi:10.1038/nature07669
- Tajima K, Takeuchi K, Takahata M, Hasegawa M, Watanabe S, Iqbal MM, Ezura Y (2000) Seasonal occurrence of the pathogenic Vibrio sp. of the disease of sea urchin Strongylocentrotus intermedius occurring of low water temperature and the preservation methods of the disease. Grad Sch Fisheries Sci 66(5):799–804
- Tajima K, Silva JRMC, Lawrence JM (2007) Immunological Response to bacterial disease. In: Lawrence JM (ed) Edible sea urchin: biology and ecology. Elsevier, UK, pp 167–182
- Tauber AI, Chernyak L (1997) Metchnikoff and the origins of immunology, from metaphor to theory. Oxford University Press, New York

229

Springer

Artigo : The impact of rising sea temperature on innate imune parameters in the tropical subtidal sea urchin *Lytechinus variegatus* and the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter*.

Publicado em Marine Environmental Research. 2013; 92:95-101

Marine Environmental Research 92 (2013) 95-101

Contents lists available at ScienceDirect



Marine Environmental Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marenvrev



The impact of rising sea temperature on innate immune parameters in the tropical subtidal sea urchin *Lytechinus variegatus* and the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter*



Paola Cristina Branco^{a, *}, João Carlos Shimada Borges^a, Marinilce Fagundes Santos^a, Bernard Ernesto Jensch Junior^{a, b, 1}, José Roberto Machado Cunha da Silva^{a, b}

^a Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, CEP 05508-000, Sao Paulo, SP, Brazil
^b Marine Biology Center of University of Sao Paulo — CEBIMar-USP, Rodovia Manoel Hypólito do Rezo, km, 1315, Praia do Cabelo Gordo, CEP 11600-000.

² Marine Biology Center of University of Sao Paulo – CEBIMAR-USP, Rodovia Manoel Hypolito do Rego, km. 131,5, Prata do Cabelo Gordo, CEP 11600-000, São Sebastião, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history: Received 21 July 2013 Received in revised form 1 September 2013 Accepted 9 September 2013

Keywords: Temperature Global warming Coelomocytes Immune function Phagocytosis Tropical sea urchins Effects physiology Biomarker Lytechinus variegatus Echinometra lucunter

ABSTRACT

Ocean temperatures are rising throughout the world, making it necessary to evaluate the impact of these temperature changes on sea urchins, which are well-known bioindicators. This study evaluated the effect of an increase in temperature on the immune response of the subtidal *Lytechinus variegatus* and the intertidal *Echinometra lucunter* sea urchins. Both species were exposed to 20 (control), 25 and 30 °C temperatures for 24 h, 2, 7 and 14 days. Counting of coelomocytes and assays on the phagocytic response, adhesion and spreading of coelomocytes were performed. Red and colorless sphere cells were considered biomarkers for heat stress. Moreover, a significant decrease in the phagocytic indices and a decrease in both cell adhesion and cell spreading were observed at 25 and 30 °C for *L. variegatus*. For *E. lucunter*, the only alteration observed was for the cell proportions. This report shows how different species of sea urchins respond immunologically to rising temperatures.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Studies on temperature started with Fourier (1827), who first described the Earth's temperature. Arrhenius (1896) was the first to speculate about whether variations in the atmospheric concentration of carbon dioxide have contributed to long-term variations in climate.

Despite the large amount of publications concerning the theme of global warming, articles that emphasize the effects of climatic changes on marine ecosystems account for less than 5% of these publications. The oceans cover 71% of the Earth and absorb approximately a third of all carbon dioxide produced by human activities; thus, they have enormous importance for the regulation

of the planet's climate (Rahmstorf et al., 2007). There is clear evidence that ocean temperatures have been increasing over the years (Trenberth, 2010).

Temperature plays a central and vital role on the biological processes of all organisms. It impacts the rate of enzymatic reactions, membrane transport and substance diffusion. A moderate increase in temperature can provoke alterations to the metabolic rate of an organism, resulting in fundamental changes in biological processes, such as growth and reproduction. Previous studies reported that temperature influences sea urchin fertilization and early development (Rupp, 1973; Sewell and Young, 1999; Tyler et al., 2000; Byrne et al., 2009); larval survival (Roller and Stickle, 1993) and feeding, digestion and absorption (Klinger et al., 1986).

Marine ecosystems have a fundamental ecological role for the planet, and the impacts caused by human activities seem to cause irreversible alterations on its ecology. Such impacts include decreases in ocean productivity, changes to the marine food chain, reduction of the number of marine species and increases in

^{*} Corresponding author. Tel.: +55 11 30917223; fax: +55 11 30917402. E-mail address: pbranco@usp.br (P.C. Branco).

¹ In memoriam.

^{0141-1136/\$ -} see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.09.005



Fig. 1. Temperature records in Sao Sebastiao, north coast of Sao Paulo over the year 2009. The winter registered the lowest temperature, 20 °C on average, and the summer temperature records reached 26 °C. These records were used to justify the experimental temperatures chosen.

diseases in the marine environment (Hoegh-Guldberg and Bruno, 2010).

For this reason, investigations into the effect of increasing sea water temperature on the innate immune system of a marine model would be extremely useful for better understanding the mechanisms by which global warming operate on a particular animal class.

Sea urchins are benthonic animals with limited moving capacity, as demonstrated by Pearse (2006); thus, environmental changes impact them greatly, and for this reason, Kobayashi and Okamura (2004) classified them as excellent bioindicators. Furthermore, sea urchins have a phylogenetic position that approaches chordates, justifying their use in innate immune studies (Litman et al., 2005; Hibino et al., 2006; Silva, 2013).

The literature has described four types of coelomocytes for sea urchins: phagocytic amoebocytes, vibratile cells, red sphere cells and white sphere cells (Johnson, 1971; Bertheussen and Seljelid, 1978; Mangiaterra and Silva, 2001). Phagocytic amoebocytes (PA) are used as a tool to evaluate the innate immune response in sea urchins exposed to biotic and abiotic factors (Borges et al., 2002).

Tropical species present wider thermal tolerance windows when compared to temperate and polar species (Pötner, 2002). Nevertheless, thermal tolerance windows differ between species depending on the range of the environmental temperature. *Lytechinus variegatus* tolerate a field temperature up to 35 °C briefly (Beddingfield, 1997). Higher temperatures can cause mass mortality episodes in this species (Meyer and Birkeland, 1974 and Rivera, 1978 reviewed in Watts et al., 2013). By contrast, *Echinometra lucunter* is an intertidal species that was classified by Hendler et al. (1995) as a species that highly tolerates wide oscillations in temperatures. Understanding how both species respond immunologically to thermal stress will improve the understanding of thermal tolerance in these tropical echinoid species. The aim of this study was to evaluate the effect of sea water increase in temperature on the innate immune system of two different tropical sea urchin species: the subtidal *L. variegatus* and the intertidal *E. lucunter*.

2. Material and methods

2.1. Animal collection and maintenance

Tropical sea urchins of the species *L. variegatus* (n = 65) and *E. lucunter* (n = 65) (males and females) were collected from sites near the Marine Biology Center of University of Sao Paulo (CEBIMar-USP), northern coast of Sao Paulo State ($23^{\circ}49.530'$ S, $045^{\circ}26.394'$ W), by autonomous diving at depths of 3-6 m during the winter of 2009. The sampling and all experiments were in accordance with Brazilian legislation and were approved by IBAMA (License number: Sisbio 27922-1).

Sea urchins were kept in a water glass fiber tank (500 L) with 50% natural sea water pumped from Barequeçaba beach, Sao Sebastiao, northern coast of Sao Paulo State (23°49.31'S, 045°26.8'W). The sea water was renewed daily in the Animal facility of Marine Biology Center of University of Sao Paulo (CEBIMar-USP). The sea urchins were held in the laboratory for seven days before the experiments. Temperature and salinity were monitored and maintained at 20 °C and 35‰, respectively. Of the 65 animals collected of each species, groups of 20 were designated for each temperature analyzed (20, 25 and 30 °C) in addition to one group of five animals for the 0-h control group. Five sea urchins were designated for each period analyzed (0 and 24 h and two, seven and 14 days).

After seven days, the sea urchins were transferred to the experimental tanks (35 L, five animals per tank, seven liters per animal). The sea urchins remained in these tanks during the entire

experimental period. The water was replaced daily, after being warmed to the relevant experimental temperature. The tanks were equipped with Better Sarlo S90[®] submersible aquarium pumps and aerators. Dissolved oxygen tests were performed daily, and the dissolved oxygen was maintained at 10 \pm 1 ppm in the experimental tanks for all groups analyzed. Furthermore, weekly tests of pH, nitrite and nitrate levels were performed and maintained at 8.0, <0.3 mg/l and 5 mg/l, respectively, in the experimental tanks for all groups analyzed, without oscillation despite increasing temperatures. During the entire period, the animals were fed *ad libitum* with green algae *Ulva* sp. and brown algae *Sargassum* spp. collected from the same collection point as the sea urchins.

The sea water temperature for the control group was 20 °C on average. A zero time point control group of animals was analyzed prior to any temperature exposure. The acute thermal variation was performed by abruptly increasing the temperature to the experimental temperatures (25 or 30 °C); the animals were maintained at the increased temperatures for 24 h prior to analysis. The chronic

Phagocytic Capacity : PC = $\frac{n^{\circ} \text{ of phagocytic amoebocytes phagocytosing}}{\text{total number of phagocytic amoebocytes}}$

Phagocytic Index : $PI = \frac{\text{total number of phagocytosed yeast cells}}{n^{\circ} \text{ of phagocytic amoebocytes phagocytosing}}$

thermal variation was performed by increasing the temperature by 1 °C per day until the experimental temperature was reached (25 or 30 °C); the sea urchins remained at the experimental temperature for an additional two, seven and 14 days prior to later analysis. These temperatures were chosen based on the annual temperature variation for 2009 recorded by CEBIMar-USP (Fig. 1) and also due to their capacity to promote cellular and physiological alterations while not causing the death of the sea urchins.

The sea water temperature was maintained with a precision of 0.2 °C with a thermostat Full Gauge TIC 17 RGTi[®] and a 300 W aquarium heater, and the air temperature was maintained at 18 °C with an air conditioner. The light cycle during all experimental periods was 12 h light/12 h dark.

2.2. Perivisceral coelomatic fluid collection

An amount of 1 ml of coelomatic fluid was collected from all animals of each group (n = 5 per treatment). A puncture was performed via the peristomial membrane with a 12.7 \times 0.33 mm needle and a 1 ml syringe. The needle was obliquely introduced to avoid puncturing the intestines and/or gonads.

From the total collected volume of coelomatic fluid (1 ml), 100 μ l was used for the phagocytic assay, 100 μ l for the cell adhesion assay, 100 μ l for the cell spreading assay and 20 μ l for the differential counting of coelomocytes. The last assay was performed in a glass slide with 100 cells to obtain a percentage of each cell type. All of the analyses were performed in triplicate.

2.3. Cell viability assay

The cell viability was determined by the Trypan Blue (0.4%) exclusion technique according to Freshney's protocol (1987). Trypan blue is a vital dye, and its penetration in the cell is absent unless a membrane lesion is present. Thus, all cells which excluded the dye were considered viable.

2.4. Phagocytosis assay

Approximately 100 μ g of yeast cells were diluted in sea water. The yeast cells were counted in a Neubauer chamber. A proportion of 10 yeast cells per phagocytic amoebocyte was obtained.

The phagocytosis assay was performed using 100 μ l of coelomatic fluid that was placed on a microscope slide for 1 h to allow for cell spreading. After this period, a solution of yeast cells in sea water was added in the proportion previously described (Borges et al., 2002). The coelomocytes were exposed to the yeast cells for 1 h, and then, the cells were observed under phase microscopy for the evaluation of the phagocytic indices. For the Germicide Capacity evaluation, two stains were used to determine the viability of the yeast: ethidium bromide and fluorescein diacetate (Silva and Peck, 2000 adapted from Calich et al., 1978).

The phagocytic indices used were described previously by Silva and Peck (2000) and were calculated based on the following equations:

 $\label{eq:Germicide Capacity:GC} \text{Germicide Capacity:GC} = \frac{\text{number of dead yeast cells}}{25 \text{ phagocytosed yeast cells}}$

2.5. Germicide Capacity of coelomatic fluid

After the coelomic fluid collection, 1 ml of fluid was placed in a microfuge tube and centrifuged for 5 min at 1000 G. The pellet was removed, and the supernatant (100 μ l) was placed on a glass slide for 2 h with 100 μ l of a suspension of 1 \times 10⁶ yeasts/ml. Ethidium bromide and fluorescein diacetate were used as previously described. The Germicide Capacity of the coelomatic fluid was determined for 100 yeast cells.

2.6. Cell adhesion analysis

Samples of $100 \,\mu$ l of coelomatic fluid were placed on glass slides and kept at the relevant experimental temperatures for the different periods (2, 5, 10, 15 or 30 min). Then, the slides were washed with sea water and the adherent cells were fixed in modified McDowell's solution (4% formaldehyde and 2% glutaraldehyde diluted in sea water; McDowell and Trump, 1976). The percentage of adherent cells was established based on the initial number of cells plated (cells in 100 μ l of coelomic fluid).

2.7. Cell spreading analysis

Samples of 100 μ l of coelomatic fluid were placed on glass slides and kept at the relevant experimental temperatures for the different periods (15, 20, 30 or 60 min). Then, the glass slides were washed with sea water and fixed in modified McDowell's solution (4% formaldehyde and 2% glutaraldehyde diluted in sea water; McDowell and Trump, 1976). The cells were considered to have spread when they presented lamellipodia and showed an

 Table 1

 Effect of increased sea temperature on coelomocyte percentage and phagocytic indices in the tropical sea urchin Lytechinus variegatus exposed to 20 (control group), 25 and 30 °C for acute (24 h) and chronic (two, seven and 14 days) periods and prior to any temperature exposure (0 h).

	Temperature	(°C)
--	-------------	------

Temperature (°C)	control			25				30					
Period	0 h	24 h	2 d	7 d	14 d	24 h	2 d	7 d	14 d	24 h	2 d	7 d	14 d
n (animals)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Percentage of PA	68.70 ± 3.90	67.60 ± 3.36	65.80 ± 2.87	68.20 ± 3.02	67.50 ± 2.85	47.40 ± 5.59	42.20 ± 3.76	55.20 ± 3.11	66.40 ± 4.77	49.40 ± 4.27	60.80 ± 8.40	55.00 ± 18.23	63.33 ± 3.78
Percentage of CSC	7.10 ± 1.95	$6.20 \pm 2.77a$	$7.40 \pm 2.18a$	$6.80 \pm 3.15a$	7.50 ± 2.85	17.40 ± 4.15 ab	19.80 ± 5.54b	$17.20 \pm 4.20b$	9.60 ± 4.92	$21.00 \pm 4.06b$	16.60 ± 3.78ab	10.25 ± 7.97 ab	9.33 ± 2.51
Percentage of RSC	5.18 ± 1.98	$4.20 \pm 1.78a$	$5.20 \pm 3.12a$	$4.60 \pm 2.20a$	$4.80 \pm 2.50a$	$20.00\pm5.14b$	$24.00 \pm 2.64b$	$12.20 \pm 3.11b$	$11.80 \pm 1.30b$	$13.80 \pm 5.01b$	$12.20 \pm 7.52b$	$18.00\pm6.97b$	$19.67 \pm 1.53b$
Percentage of VC	19.02 ± 4.27	22.00 ± 5.61	21.60 ± 4.57	20.40 ± 4.85	20.20 ± 5.21	15.20 ± 3.42	15.80 ± 3.42	15.40 ± 1.52	12.20 ± 0.83	15.80 ± 3.03	10.20 ± 2.68	16.50 ± 5.19	7.66 ± 3.51
Phagocytic Capacity	63.00 ± 2.18	$60.66 \pm 1.93a$	$61.52 \pm 2.15a$	$60.50 \pm 2.20a$	$62.00 \pm 1.89a$	$41.61 \pm 4.51b$	64.60 ± 2.79 ab	63.00 ± 5.38ab	$29.84 \pm 3.90b$	$32.80 \pm 3.89b$	$22.80 \pm 5.63b$	$27.00\pm1.41b$	$21.89 \pm 2.50b$
Phagocytic Index	1.58 ± 0.15	1.59 ± 0.13	$1.62 \pm 0.15a$	$1.55 \pm 0.19a$	1.57 ± 0.21	1.72 ± 0.06	$1.72 \pm 0.12a$	$1.65 \pm 0.08a$	1.54 ± 0.08	1.32 ± 0.04	$1.39 \pm 0.24b$	$1.75 \pm 0.35b$	1.45 ± 0.32
Germicide Capacity	9.50 ± 1.50	$10.10 \pm 1.24a$	12.09 ± 2.08	9.86 ± 0.98	11.09 ± 1.60	$26.00\pm2.35b$	11.78 ± 1.07	11.32 ± 1.27	9.95 ± 1.32	$9.87 \pm 1.13a$	10.89 ± 1.65	12.98 ± 3.01	10.12 ± 2.90
Germicide Capacity	5.30 ± 1.30	$7.08 \pm 1.20a$	6.98 ± 2.14	8.02 ± 1.22	8.17 ± 2.87	$8.09 \pm 2.13b$	8.08 ± 2.08	7.86 ± 3.00	9.80 ± 2.30	$7.88 \pm 0.98a$	7.65 ± 1.25	10.01 ± 3.12	8.10 ± 1.20
Coelomatic Fluid													

Values quoted are means \pm SD. PA: phagocytic amoebocytes, CSC: colorless sphere cells, RSC: red sphere cells, VC: vibratile cells. Periods of heat exposure: 24 h (acute test), two days (2 d), seven days (7 d) and 14 days (14 d). 0 h: control group of animals that was analyzed prior to any temperature exposure. The letters indicate a significant difference among temperatures at the same periods of exposure (P < 0.05).

P.C. Branco

 Table 2

 Effects of increased sea temperature on coelomocyte percentage and phagocytic indices in the tropical sea urchin Echinometra lucunter exposed to 20 (control group), 25 and 30 °C for acute (24 h) and chronic (two, seven and 14 days) periods and prior to any temperature exposure (0 h).

(°C)	control	20				25				50			
Period	0 h	24 h	2 d	7 d	14 d	24 h	2 d	7 d	14 d	24 h	2 d	7 d	14 d
n (animals)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Percentage of PA	70.50 ± 1.76	71.40 ± 2.07	69.60 ± 2.65	70.80 ± 1.75	71.00 ± 2.35	60.20 ± 3.83	55.00 ± 3.31	49.60 ± 2.70	75.20 ± 2.94	63.00 ± 1.41	62.50 ± 2.15	58.00 ± 1.90	63.00 ± 1.80
Percentage of CSC	2.85 ± 0.37	3.20 ± 0.83	$2.70 \pm 0.85a$	$3.00 \pm 0.75a$	2.90 ± 0.81	5.20 ± 1.64	$10.00 \pm 3.67b$	$11.60 \pm 3.84b$	2.00 ± 0.70	4.60 ± 1.51	$4.50 \pm 1.85 ab$	4.60 ± 2.10 ab	4.80 ± 1.20
Percentage of RSC	2.50 ± 0.99	$2.60 \pm 1.14a$	$2.50 \pm 0.98a$	$3.00 \pm 1.10a$	2.80 ± 1.20	$6.20 \pm 2.58ab$	$12.60 \pm 3.50b$	$17.80 \pm 4.20b$	2.40 ± 0.54	$11.00 \pm 2.73b$	$10.00 \pm 2.24b$	17.50 ± 1.90b	9.50 ± 2.54
Percentage of VC	24.15 ± 2.20	23.20 ± 1.78	24.90 ± 2.45	23.20 ± 2.34	23.30 ± 2.10	28.40 ± 2.60	22.60 ± 3.43	21.00 ± 6.96	20.40 ± 3.20	21.40 ± 2.96	23.00 ± 3.23	19.90 ± 2.70	22.70 ± 3.10
Phagocytic Capacity	66.00 ± 1.80	67.42 ± 1.37	65.35 ± 1.50	67.00 ± 1.75	66.98 ± 1.85	53.50 ± 4.43	57.12 ± 2.65	61.61 ± 2.66	46.22 ± 1.48	51.77 ± 5.73	52.65 ± 4.85	55.00 ± 4.35	52.00 ± 3.35
Phagocytic Index	1.66 ± 0.20	1.61 ± 0.22	1.65 ± 0.25	1.63 ± 0.32	1.70 ± 0.27	1.54 ± 0.16	1.58 ± 0.06	1.73 ± 0.20	1.63 ± 0.28	1.52 ± 0.15	1.45 ± 0.60	1.60 ± 0.10	1.50 ± 0.12
Germicide Capacity	9.00 ± 1.80	10.00 ± 1.50	12.00 ± 2.00	13.50 ± 1.89	11.00 ± 2.20	13.00 ± 2.20	10.50 ± 2.90	16.00 ± 3.50	9.75 ± 4.20	10.25 ± 2.50	11.40 ± 3.00	12.00 ± 2.50	13.00 ± 4.30
Germicide Capacity	4.80 ± 3.00	6.50 ± 2.40	7.00 ± 4.30	7.00 ± 2.40	5.00 ± 3.50	7.50 ± 3.00	6.00 ± 2.50	7.00 ± 1.90	5.50 ± 1.80	6.70 ± 3.50	7.00 ± 0.90	8.00 ± 1.20	8.50 ± 2.80
Coelomatic Fluid													

Values quoted are means \pm SD. PA: phagocytic amoebocytes, CSC: colorless sphere cells, SSC: red sphere cells, VC: vibratile cells. Periods of heat exposure: 24 h (acute test), two days (2 d), seven days (7 d) and 14 days (14 d). 0 h: control group of animals that was analyzed prior to any temperature exposure. The letters indicate a significant difference among temperatures at the same periods of exposure (P < 0.05).



Fig. 2. Adhesion percentage of phagocytic amoebocytes exposed to different temperatures for different periods. A significant reduction was observed at 25 °C and 30 °C when compared to control temperature (20 °C).

elongated shape. The percentage of spread cells was determined from counts of 100 cells.

2.8. Coelomocyte ultrastructural analysis

The coelomocytes were collected as previously described, centrifuged at 1200 G for 10 min at 4 °C and then fixed in a cold 2.5% glutaraldehyde solution for ultrastructural analysis (Hayat, 1981). The cells were post-fixed in 1% osmium tetroxide in phosphate buffer containing sucrose 0.5% for 2 h at 4 °C. Then, the cell pellets were placed in 0.5% uranyl acetate in distilled water with 1% sucrose at 4 °C for 24 h. After dehvdration in a series of alcoholic solutions from 70% to 100%, two immersions in propylene oxide were conducted of 20 min each, followed by propylene oxide and Araldite infiltration for 12 h at room temperature on a shaking platform. The cell pellets were then placed in Spurr resin, using molds, and placed into an oven at 70 °C for three days. For semithin microtome sections (0.5 µm thick), an LKB Porter Blum MT1 ultramicrotome was used: for ultrathin sections (approximately 70 nm) an LKB Porter Blum MT2 ultramicrotome was used. The sections were positioned onto copper grids, stained using 2% uranyl acetate in distilled water for 1 h and washed in distilled water for 30 min (Reynolds, 1963). The observations were performed using a Transmission Electron Microscopy (TEM; JEOL-JEM-100 CXII).

2.9. Statistical analysis

The data were analyzed by one-way ANOVA using the assumptions of the Kolmogorov–Smirnov test (normality test) and Bartlett test (homogeneity of variances). To compare the means, Tukey's post test (GraphPad Software Inc.) was performed. Significant differences were considered at P < 0.05.

3. Results

The coelomocytes differential counting showed a significant increase in colorless sphere cells (CSC) (P < 0.05) in *L. variegatus* exposed to 25 °C for two days when compared to the control group at the same period; the same was observed after seven days of exposure. Additionally, an increase of red sphere cells (RSC) was

observed after acute and chronic exposure, with a very significant increase under 25 °C after two days (P < 0.01), seven and 14 days (P < 0.05). The same was observed under 30 °C in all periods analyzed (Table 1). A significant increase in CSC (P < 0.05) was observed in *E. lucunter* exposed to 25 °C for two and seven days. Additionally, a significant increase in RSC (P < 0.05) was observed for the same species exposed to 25 °C and 30 °C for two and seven days and to 30 °C after acute exposure (Table 2).

The phagocytosis assay revealed a very significant decrease in the phagocytic capacity (PC) of *L. variegatus* exposed to 25 °C for 24 h and 14 days and exposed to 30 °C for all periods analyzed, when compared to the respective control groups. The Germicide Capacity (GC) of *L. variegatus* was significantly increased under acute exposure to 25 °C (P < 0.05) (Table 1). For *E. lucunter*, no significant differences were observed, despite the temperature and exposure periods employed (Table 2).

The viability of the coelomocytes was studied in all animals from both species in all experimental groups and remained above 97% for both species; no significant differences were observed.

Regarding the adhesion and spreading assays, the coelomocytes in the control group of L. variegatus started to adhere to the glass slide within 5 min and started to spread within 15 min. A significant delay in cell adhesion (P < 0.05) was observed for L. variegatus at 25 °C; all groups analyzed presented an initial adhesion at 10 min. The coelomocytes of the groups of L. variegatus exposed to 30 °C for seven and 14 days started to adhere at 30 min, with a rate of only 26% after 14 days. Cell spreading was also affected in the groups L. variegatus exposed to 30 °C for seven and 14 days, with a low spreading rate of 20% after 14 days. The adhesion percentages of L. variegatus were reduced in the experimental groups (25 °C and 30 °C) when compared to the control groups (20 °C) for all periods of exposure (P < 0.05). A more prominent reduction was observed at 30 °C (Fig. 2). The spreading percentages for L. variegatus were not significantly altered in any of the experimental groups. The adhesion and spreading assays of E. lucunter remained similar to the control group, which was also similar to the control group of L. variegatus. No differences were observed between the experimental groups for this species (data not shown).

The transmission electron microscopy analysis showed no ultrastructural differences among the groups studied for both species (data not shown). The phagocytic amoebocytes had large, central nuclei, with loose chromatin and highly evident nucleoli, a high amount of perinuclear rough endoplasmic reticulum, globoid mitochondria and a scarcity of vacuoles. The colorless sphere cells had small, peripheral nuclei with dense chromatin, and their cytoplasms were filled with electron lucent granules containing electron dense cores. The red sphere cells had similar characteristics to the colorless sphere cells, except that their granule content was heterogeneous, with variable electron densities. Such heterogeneity might be due to differing maturation degrees of the granules.

4. Discussion

Our results mainly indicate that two distinct tropical species respond differently to rising sea temperature. *L. variegatus* seemed to be more susceptible to thermal stress, presenting alterations in cell counting, innate immune parameters and coelomocyte adhesion and spreading. However, the species E. lucunter presented changes only in cell counting at some exposure periods and temperatures and did not show changes in any of the other parameters measured. These differences between the two species may be due to their habitats. Although both species inhabit the north coast of Sao Paulo, Brazil, and were collected at the same depths, they exist in different specific habitats. E. lucunter inhabit intertidal zones of rocky shores, making them more exposed to thermal variations throughout the day, whereas L. variegatus typically inhabits sea grass beds, but can also be found on rocky or sandy shores and is thus less exposed to thermal oscillation, which explains its vulnerability to heat stress. Consequently, E. lucunter is more thermal resistant than L. variegatus.

The different responses to thermal stress observed in these two species of tropical sea urchins might also be explained by different genetic responses indicated physiologically by their different thermal tolerances. The molecular mechanisms involved in these species' thermo tolerance should be identified to confirm this hypothesis. The sensitivity levels of molecules, organelles, cells, tissues and the complete organism to thermal stress need to be distinguished; the different mechanisms responsible for long and short-term tolerance also need to be determined (Pötner, 2002). The most limiting factor to thermal tolerance is the oxygen rate because heat stress provokes hypoxia (Pötner, 2001). In the present study, however, the dissolved oxygen level remained unaltered even under high temperatures due to the additional air pumps in the experimental tanks.

One important mechanism associated with thermal tolerance that may explain the distinct immune responses between *L. variegatus* and *E. lucunter* is the heat shock response, which involves an increased synthesis of heat shock proteins (HSP). The HSPs are a highly conserved group of proteins that are present in all cells and organisms studied to date, including sea urchins (Matranga et al., 2000; Matranga and Bonaventura, 2002; Osovitz and Hofmann, 2005). Selected HSPs, also known as chaperones, play crucial roles in the folding/unfolding of proteins, assembly of multiprotein complexes, transport/sorting of proteins into the correct subcellular compartments, cell-cycle control and signaling and protection of cells against stress/apoptosis (Li and Srivastava, 2004).

Another protein also reported as a potential marker for the thermal tolerance response is the high mobility group b1 protein (HMGB1), which is an activator of transcription (Somero, 2005). In sea urchins, HMGB1 was first isolated in the temperate sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Niemeyer et al., 1995); however no study evaluating the expression of HMGB1 under heat stress in sea urchins has been conducted.

Such differences in the thermal stress response may not be attributed to sex variability. Although the present study did not sacrifice animals to report this data, the literature supports that the sex ratio for both species is almost 1:1 (one male for each female). For *E. lucunter*, McClanahan and Muthiga (2013) described a sex ratio of 1:1 and Lima et al. (2009) described a sex ratio of 1:12:1. For *L. variegatus* a sex ratio of 1:1 was also demonstrated by Reuter and Levitan (2010).

The coelomocyte differential counting showed the same proportion of cell types in all experimental temperature groups for both species, with the predominant group being phagocytic amoebocytes. These results corroborate those obtained by Johnson (1969), Bertheussen and Seljelid (1978), Isaeva and Korenbaum (1990) and Borges et al. (2002).

The red sphere cells increased in the majority of treatments analyzed for both species. This suggests that this cell type plays an important role in the innate immune response of these species, increasing in cases of stress, as was previously proposed by Matranga et al. (2000). An increase of this cell type has been documented by many studies reporting on different types of stress, including environmental contamination by industrial residues (Matranga et al., 2000); lesions on the skeleton and dermis (D'Andrea-Winslow and Novitski, 2008); environmental contamination by metals, such as iron, copper and zinc (Pinsino et al., 2008); and environmental contamination by an oil soluble fraction (Borges et al., 2010). A higher level of these cells in the coelomatic fluid due to heat stress has also been reported in Antarctic sea urchins (Branco et al., 2012).

One possible explanation for the increase of red sphere cells in response to thermal stress is their content of uniform granules, which contain an antibacterial substance named echinochrome A (Smith et al., 2006). This substance was first mentioned by MacMunn (1885). Echinochrome, or 6-ethyl-2,3,5,7,8-pentahydroxy-1,4-naphthoquinone, was linked to the scavenging of peroxy radicals in liposomes, the trapping of superoxide anion radicals and the binding of ferrous ions to inactive complexes in the aqueous phase (Lebedev et al., 2001). The increase of this cell population under stress might be part of a selfprotective reaction.

Colorless sphere cells increased at 25 °C in the chronic period (two and seven days) for both species and in the acute period at 30 °C for *L. variegatus*. This can be explained by the hypothesis of Matranga et al. (2000) that CSCs are the same cell type as RSCs just at different levels of maturation. This was supported by the ultra-structural analysis of coelomocytes in this study, which found that the only difference between the two types of sphere cells was the electron density of their granules. Thus, the increase in CSCs may also be due to cell stress.

The phagocytic indices were only significantly different in L. variegatus exposed to different temperatures for different time periods; similar results were observed for the cell adhesion and spreading experiments. All experiments revealed that the extreme temperature (30 °C) for this species acts as an important limiting factor. Opposing these data, E. lucunter presented no significant alteration in any of the analyzed parameters, except cell counting. One possible explanation for this response variability between these species could be differences in the properties and organization of the cytoskeleton and its accessory proteins. The cytoskeleton mediates a variety of essential biological functions in all eukaryotic cells (Hall, 1998), and any change in its disruption can lead to adverse cellular responses. To avoid such responses, heat shock proteins interact with the cytoskeleton to contribute to their thermoprotective response (Dalle-Donne et al., 2001; Liang and MacRae, 1997).

5. Conclusion

The present work demonstrated how rising sea temperature influences the innate immune response in two species of tropical sea urchins. L. variegatus presented alterations in cell counting, innate immune parameters and coelomocyte adhesion and spreading. However, the species E. lucunter presented only alterations in cell counting after some periods of exposure to different temperatures. Such differences can be explained by the particular habitats of these species. More studies on the molecular events involved in the thermoprotective mechanisms for both species should be conducted to better understand sea urchin physiology and the effects of global warming on marine ecology.

Acknowledgments

The authors express their acknowledgments to CEBIMar-USP for their support with the animal collection and experiments and to grants 2011/06044-4 and 2011/15612-6, São Paulo Research Foundation (FAPESP) and to CAPES for the scholarship.

References

- Arrhenius, S., 1896. On the influence of carbonic acid in the air upon the temper-
- ature of the ground. Philos. Mag. 41, 237–276.
 Beddingfield, S.D., 1997. The Nutrition, Growth, Reproduction and Population Dynamics of *Lytechinus variegatus* (Lamarck) from Contrasting Habitats in SL Joseph Bay, Florida (Ph.D. dissertation). University of Alabama at Birmingham, rmingham, AI
- Bertheussen, K., Seljelid, R., 1978. Echinoid phagocytes in vitro. Exper. Cell Res. 111, 401-412.
- ges, J.C.S., Porto-Neto, L.R., Mangiaterra, M.B.C.D., Jensch-Junior, B.E., Silva, J.R.M.C., 2002. Phagocytosis in vivo and in vitro in the Antarctic Sea Urchin Sterechinus neumayeri at 0 °C. Polar Biol. 25, 891–897. Porto-Neto. L.R., Mangiaterra, M.B.C.D., Jensch-Junior, B.E.
- Sterechnus neumayeri at 0 °C. Polar Biol. 25, 891–897.
 Borges, J.C.S., Branco, P.C., Pressinotti, L.N., Severino, D., Silva, J.R.M.C., 2010. Intra-nuclear crystalloids of Antarctic sea urchins as a biomarker for oil contamina-tion. Polar Biol. 33 (6), 843–849.
 Branco, P.C., Pressinotti, L.N., Borges, J.C.S., lunes, R.S., Kfoury Jr., J.R., Silva, M.O., Gonzalez, M., Santos, M.F., Peck, L.S., Cooper, E.L., Silva, J.K.M.C., 2012. Cellular biomarkers to elucidate global warming effects on Antarctic sea urchin Ster-echinus neumayeri. Polar Biol. 35, 221–229.
 Byrne M. Ho, Selvakumaraswamy P. Nguyen H.D. Dworianyn S.A. Davis, A.P.
- Byrne, M., Ho, M., Selvakumaraswamy, P., Nguyen, H.D., Dworjanyn, S.A., Davis, A.R., 2009. Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early development under near-future climate change scenarios. Proc. R. Soc. B 276, 1997. 1883-1888.
- Calich, V.L.G., Purchio, A., Paula, C.R., 1978. A new fluorescent viability test for fungi cells. Mycopathology 66 (3), 175–177. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Milzani, A., Di Simplicio, P., Colombo, R., 2001. The actin
- cytoskeleton response to oxidants; from small heat shock protein phosp lation to changes in the redox state of actin itself. Free Radic, Biol. Med. 31, 1624–1632.
- D'Andrea-Winslow, L., Novitski, A.K., 2008, Active bleb formation in abated Lyte D'Andrea-Winslow, L., Novitski, A.K., 2008. Active bleb formation in abated Lytechnius variegatus red spherule cells after disruption of acto-myosin cron-tractility. Integr. Zool. 3 (2), 115–122.
 Fourier, J.B.J., 1827. Memoire sur les temperatures du globe terrestre et des espaces planetaires. Mem. Acad. Roy. Sci. 7, 569–604.
 Freshney, R., 1987. Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique, Alan R. Liss (area) New Media.
- (org), Inc., New York. Hall, A., 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science 279, 509–514.
- Hain, Y., 1956, Kilo Off also and the actin Cytoke Corp. Academic 27-9, 365–374. Hayat, M.A., 1981, Fixation for Electron Microscopy. Academic Press, New York. Hendler, G., Miller, J.E., Pawson, D.L., Kier, P.M., 1995. Sea Stars, Sea Urchins and Allies: Echinoderms of Florida and the Caribbean. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Washington.
 Hibino, T., Loza Coll, M., Messier, C., Majeske, A., Cohen, A., Terwilliger, D., Buckley, K., Brockton, V., Nair, S., Berney, K., Fugman, S.D., Anderson, M.K., Pancer, Z., Cameron, R.A., Smith, L.C., Rast, J.P., 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. Develop. Biol. 300, 349–365.
 Hoegh-Guldberg, O., Bruno, J.F., 2010. The impact of climate change on the World's marine ecosystems. Science 328, 1523–1528.
 Isaeva, V.Y., Korenbaum, E.S., 1990. Defence functions of coelomocytes and immunity of echinoderms. Sov. J. Mar. Biol. 15, 353–363.
 Johnson, P.T., 1969. The coelomic elements of sea urchins (*strongylocentrotus*). I. The normal coelomocytes. their morphology and dynamics in hanging drop.

- normal coelomocytes, their morphology and dynamics in hanging drop. J. Inverteb: Pathol. 13, 25–41. Johnson, P.T., 1971. Studies on disease urchins from Point Loma. In: Kelp Habitat Improvement Project Annual Report, 1970–71. Californian Institute of Tech-
- nology, Pasadena, pp. 82–90.

- Klinger, T.S., Hsieh, H.L., Pangallo, R.A., Chen, C.P., Lawrence, J.M., 1986. The effect of
- temperature on feeding, digestion and absorption of Lytechinus variegatus (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). Physiol. Zool. 59 (3), 332–336. Kobayashi, N., Okamura, H., 2004. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. Chemosphere 55, 1403–1412.
- Lebedev, A.V., Levitskaya, E.L., Tikhonova, E.V., Ivanova, E.V., 2001. Antioxidant properties, autooxidation, and mutagenic activity of echinochrome A compared with its etherified derivative, Biochemistry (Mosc) 66 (8), 885–893.
 Li, Z., Srivastava, P., 2004. Heat shock proteins. Curr. Protocol Immunol.. http://
- c., Strakawa, T., 2004. Intel stock proteins. Curl. Froctor Infinition. http:// dx.doi.org/10.1002/0471142735.ina01ts58. Appendix 1 T. 1g, P., MacRae, T.H., 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. J. Cell Sci. 110, 1431–1440. Lima, E.I., Gomes, P.B., Souza, I.R., 2009, Reproductive biology of Echinometra
- Lima, E.J., Gomes, P.B., Souza, J.K., 2009. Reproductive biology of Echnometral lucinter (Echinodermata: Echinoidea) in a northeast Brazilian sandstone reef. An. Acad. Bras. Ciênc. 81 (1), 51–59.
 Litman, G.W., Cannon, J.P., Dishaw, L.J., 2005. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. Nature 5, 966–979.
 Mangiaterra, M.B.B.C.D., Silva, J.R.M.C., 2001. Induced inflammatory process in the converting (Marching unique process). Langetable Biol. 130 (1) 178–194.

- Mangiateria, M. Bok.L.D., Shva, J. Shva, J. Shva, Zool. Hutteeu Infaminatory process in the sea urchin (*lytechnins variegatus*). J. Inverteber Bol. 120 (2), 178–184.
 Matranga, V., Toia, G., Bonaventura, R., Muller, W.E.G., 2000. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. Cell Stress Chaperones 5 (2), 113–120.
 McClanahan, T.R., Muthiga, N.A., 2013. Echinometra lucunter, In: Lawrence, J.M.
- (Ed.), Sea Urchins: Biology and Ecology, third ed. Academic Press, San Diego, CA, pp. 337–349. McDowell, M., Trump, B.F., 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and
- electron microscopy, Arch. Pathol, Lab, Med. 100, 405-414.
- MacMunn, CA., 1885. On the chromatology of the blood of some invertebrates. Q. J. Microsc. Sci. 25, 469–490. Matranga, V., Bonaventura, R., 2002. Sea urchin coelomocytes, the progenitors of vertebrate immune effectors, as bio-indicators of stress and pollution. In: Yokota, Y., Matranga, V., Smolenicka, Z. (Eds.), The Sea Urchin: From Basic Biology to Aquaculture. Sweetsand Zeitlinger, Lisse, The Netherlands, pp. 161–176.
- Meyer, D.L., Birkeland, C., 1974, Marine studies Galeta point, In: Rubinoff, R.W.
- Meyer, DL., Birkeland, C., 19/4. Marine studies Galeta point. In: Rubinoff, KW. (Ed.), Smithsonian Institution Environmental Sciences Program. Smithsonian Institution, Washington, D.C, pp. 129–226.
 Niemeyer, C.C., Foerster-Ziober, A., Flytzanis, N., 1995. Purification of a high-mobility-group 1 sea-urchin protein and cloning of cDNAs. Gene 164, 211–218.
 Osovitz, C.J., Hofmann, G.E., 2005. Thermal history-dependent expression of the hero? Green in nuclear cas urgehing: biogenergraphic patterns and the offect of
- Osovitz, C.J. Honnam, G.E., 2005. Internal instory-dependent expression of the hsp70 gene in purple sea urchins: biogeographic patterns and the effect of temperature acclimation. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 327, 134–143.
 Pearse, J.S., 2006. Ecological role of purple sea urchin. Science 314, 940–941.
 Pinsino, A., Della Torre, C., Sammarini, V., Bonaventura, R., Amato, E., Matranga, V., 2008. Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental
- stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Italy. Cell Biol. Toxicol. 24 (6), 541–552.
- Pötner, H.O., 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. Naturwissenschaften 88 (4), 137-146.
- Imitation of thermal tolerance in animals. Naturwissenschaften 88 (4), 137–140.
 Pötner, H.O., 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 132 (4), 739–761.
 Rahmstorf, S., Cazenave, A., Church, J.A., Hansen, J.E., Keeling, R.F., Parker, D.E., Somerville, R.C.J., 2007. Recent climate observations compared to projections.
- Science 316, 709.
- Reuter, K.E., Levitan, D.R., 2010. Influence of sperm and phytoplankton on spawning in the echinoid *Lytechinus variegatus*. Biol. Bull. 219, 198–206.
 Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208–212.
- Rivera, J.A., 1978. Aspects of the Biology of Lytechinus variegatus (Lamarck, 1816) at Jobos Bay, Puerto Rico (Echinodea: Toxopneustidae) (MSc thesis). University of Puerto Rico, Mayaguez.
- Puerto Kico, Mayaguez.
 Roller, R.A., Stickle, W.B., 1993. Effects of temperature and salinity acclimation of adults on larval survival, physiology, and early development of *Lytechinus var-iegatus* (Echinodermata: Echinoidea). Mar. Biol., 583–591.
 Rupp, J.H., 1973. Effects of temperature on fertilization and early cleavage of some tropical echinoderms, with emphasis on *Echinometra mathaei*. Mar. Biol. 23 (3), 183–189.
 Sewell, M.A., Young, C.M., 1999. Temperature limits to fertilization and early development in the tropical case uprehis *Echinometra Insurante, Lexo*. Mar. Biol.
- development in the tropical sea urchin Echinometra lucunter. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 236 (2), 291-305.

- development in the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 236 (2), 291–305.
 Silva, J.R.M.C., 2013. Immunology in sea urchins. In: Lawrence, J.M. (Ed.), Sea Urchins: Biology and Ecology, third ed. Academic Press, San Diego, CA, pp. 187–195.
 Silva, J.R.M.C., Peck, L., 2000. Induced *in vitro* phagocytosis of the Antarctic starfish *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 0 °C. Polar Biol. 23 (4), 225–230.
 Smith, L.C., Rast, J.P., Brocton, V., Terwilleger, D.P., Nair, S.V., Bucley, K.M., Majestke, A.J., 2006. The sea urchin immune system. Invertebr. Surv. J. 3, 25–29.
 Somero, G.N., 2005. Linking biogeography to physiology: evolutionary and acclamatory adjustments of thermal limits. Front. Xool. 2, 1.
 Trenberth, K.E., 2010. The ocean is heating, isn't it? Nature 465, 304.
 Tyler, P.A., Young, C.M., Clarke, A., 2000. Temperature and pressure tolerances of embryos and larvae of the Antarctic sea urchin *Sterchinus neumayeri* (Echinodermata: Echinoidea): potential for deep-sea invasion from high latitudes. Mar. Ecol., Pug. J.B., 2013. Lytechinus. In: Lawrence, J.M. (Ed.), Sea Urchins: Biology and Ecology, third ed. Academic Press, San Diego, CA, pp. 475–490.

Artigo : New insights into innate immune system of sea urchin: coelomocytes as biosensors for environmental stress

Publicado em AO Biology. No prelo.

New insights into innate immune system of sea urchin: coelomocytes as biosensors for environmental stress

Paola Cristina Branco^{1#}, Debora Alvares Leite Figueiredo¹, José Roberto Machado Cunha da Silva^{1/2}

- 1. Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo.
- 2. Marine Biology Center of University of Sao Paulo CEBIMar-USP

Corresponding author: Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, CEP 05508-000, Sao Paulo, SP – Brazil

E-mails:

Paola C Branco: pbranco@usp.br Débora A L Figueiredo: debora.figueal@gmail.com José RMC Silva: jrmcs@usp.br

Manuscript type: Critical Review

All authors contributed to conception and design, manuscript preparation, read and approved the final manuscript.

Competing interests: none declared

Conflict of interests: none declared

Abstract

Introduction

In the last decade several studies reinforced the use of sea urchin as model for immunological purposes due to their phylogenetic proximity to chordates and also due to the diverse immune genes common to vertebrates. Since the year of 2000, the use of sea urchin as bioindicators for environmental stress has been suggested, especially regarding the use of their immune cells, also referred to as coelomocytes. In this critical review, we provide a brief but consistent review covering the most studied topics of innate immune system of sea urchin emphasizing the use of coelomocytes as biosensors for environmental disorders.

Conclusion

The use of coelomocytes as biomarkers is a very useful and sensitive tool to evaluate marine environmental stress. However the mechanisms by which these conditions lead to an upregulation of coelomocytes, either increasing its number or increasing the proteins or genes expressed by them, are poorly understood. We reinforce that further studies aiming to answer these questions are necessary.

Keywords: Biomarkers, innate immune system, sea urchin, coelomocytes, environmental stress **Introduction**

Sea urchins belong to the deuterostome clade, sharing with chordates a common ancestry. This feature has been more explored since 2006, when the genome of *S. purpuratus* was sequenced. In this pioneer study, a sophisticated immune system mediated by an immense repertoire of innate pathogen recognition proteins has been described, containing more than 200 members of Toll Like Receptors (TLR), NOD-like receptors and Scavenger Receptors (1).

A gene family that plays an important role in immunity for sea urchins is the Sp185/333 that encodes a diverse array of putative immune response proteins. This family is readily induced in immune cells of the sea urchin in response to immune challenge (2).

Another important issue that justifies the use of sea urchins in scientific research is their use as bioindicators for environmental stress. The aim of this critical review is to provide a general view of innate immune system of sea urchin and assess the use of their coelomocytes as biosensors for environmental stressful conditions.

Sea urchin: basic characteristics and model for scientific studies

Sea urchins are benthonic animals that belong to the Echinodermata phylum, constituting the Echinoidea class. The word Echinodermata comes from the Greek *Echino=spine* and *Derma=tegument*. They present pentameric radial symmetry during their adult phase. They possess an aquatic vascular system, a simple and radial nervous system, and sexual reproduction with external fecundation (3). They are exclusively marine and are endowed with very limited capacity of locomotion, justifying their use as environmental bioindicators (4).

The classification of the Echinodermata has suffered many alterations and, in 1875, Huxley proposed the Deuterostomata clade and four phyla were introduced: Chaetognatha, Echinodermata, Hemichordata and Chordata (5). At this time the phylogenetic proximity of echinoderms and chordates was evidenced (Figure 1).

The role of sea urchins for early development studies is well known, however they became model for other areas of scientific studies such as: efflux transport (6); autophagy and apoptosis (7) and, due to its phylogenetic proximity to chordates, they became a very interesting model for the study of immune system (8, 9, 10) (Figure 1).

Innate immune system in sea urchin: general aspects

The word "immune" was used to indicate that the Catholic Pope (and nowadays to the politicians during their mandates) was not liable to men's laws, being protected and free from

penalties. The concept was transferred to organisms, and refers to their effort to maintain homeostasis after injury or infection of microorganism/parasites or even allografts (11).

In the late nineteenth century, the Russian biologist Elie Metchnikoff (1854–1916) observed that some cells present in the perivisceral coelom of echinoderms were able to move and engulf inert or even live particles. Metchnikoff observed this phenomenon in various taxa, although not in cephalochordates (11) Metchnikoff is the creator of the metaphysical concept (as we use today) of the immune system as an active process mediated by some animal cells (12).

Sea urchins have an innate immune system that works through cellular and humoral response. Cellular response is mediated by coelomocytes, cells with free circulation in the coelomic cavity which can infiltrate tissues and organs besides being the first mediators of allograft rejections; they act in response to host invasion, injury and cytotoxic agents (13). Cellular components will be described in the next section.

Humoral Factors

A wide range of immune molecules are expressed by sea urchin coelomocytes and released in the coelomic fluid; they are subject of extensive research and most molecules are homologous to the vertebrate immune system, such as lectins, cytokines, profilins and others. These humoral components are capable of destroying or damaging invading microorganisms. Each molecule is associated with a specific function like neutralizing pathogens, recognizing foreign material, opsonization (enhance of cellular response) and wound healing (13). Altogether, these molecules contribute to a complex and efficient defense mechanism.

Agglutinins are humoral factors involved in phagocyte aggregation to form clots and encapsulation of foreign material, besides participating in wound repair. A study in *P. lividus* showed that the presence of hemagglutin enhanced *in vitro* adhesion of autologous coelomocytes and appears to be involved in cell-cell and cell-matrix interactions (13).

Hemolysins are molecules capable of interacting with membranes and recognizing self from nonself particles like lipopolysaccharides (LPS), zymosan and erythrocytes (14)

Lectins are important defense molecules responsible for identification and opsonization of foreign cells; these molecules are also related to clot formation, and wound repair. They recognize carbohydrate fragments on cell surface (self and non-self) and on extracellular matrix (14).

Complement system

This system is basically composed by the alternative and the lectin pathways and its function is related to opsonization. Homologue of C3 (SpC3) has been indentified (15). They are produced by phagocytes and can be induced by LPS stimulation, which was the first complement molecule identified in an echinoderm (14). Another complement protein discovered is SpBf (B Factor), also expressed by coelomocytes. It is a complement receptor and

its function is thought to be similar to the human Bf which interacts with C3 to form the enzyme C3 convertase (13,15).

AMPs – Antimicrobial peptides

AMPs are molecules with short amino-acid sequences and their composition can present different conformations and molecules (16,17)

In echinoderms AMPs are found mainly in coelomocytes, and their functions are associated with the capacity to kill bacteria and act in immunoregulatory mechanisms like the production and release of cytokines. They can act both in cell membrane and in internal sites and have the capacity to permeabilize and form pores in membranes, and thus have the potential to act in slow or non-growing bacteria; besides, they can alter the adhesive features of abiotic surfaces affecting initial adhesion of microbial cells (17).

The first AMP described for sea urchin was a cysteine-rich AMP, from the green sea urchin *S. droebachienses*, the so called Strongylocins (1 and 2) (16), with potent activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The same group found two recombinant peptides in *S. purpuratus:* SpStrongylocin 1 and SpStrongylocin 2, and two new peptides in *S droebachienses*: Centrocins (1 and 2) with either activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria beyond the fungal activity of centrocins.

These findings demonstrate the diverse immune molecules present in the sea urchin immune system; these molecules are responsible for different response mechanisms to different pathogens, suggesting that they are extremely important for host defense.

Coelomocytes: morphology and citophysiology

Sea urchins have four coelomocyte types in the coelomic fluid: phagocytic amoebocytes (PA), red spherule cells (RSC), colorless spherule cells (CSC) and vibratile cells (VC) (Table 1 and Figure 2).

Phagocytic Amoebocyte: Considered the main effector of sea urchin immune system, this cell is in highest proportion among all coelomocytes and is known to be involved in different immunological responses such as chemotaxis, graft rejection, encapsulation, cytotoxicity, reactive oxygen species production, agglutination, clotting rejection, immune genes expression and primarily in phagocytosis (Figure 3) (18). The proportion of this cell type can vary among different species (14). Also, some articles have reported different subpopulations of phagocytes. Based on their morphology, they can be classified as polygonal, discoidal and small phagocytes. The main differences are related to their cytoskeleton rearrangements (19). Posterior studies demonstrated that these subpopulations present different molecules expression such as: SpC3 (20), Sp185/333 (21) and different phagocytic capacities (22).

Red Spherule Cell: Spherical cells containing granule in their cytoplasm. These granules are related to antibacterial activity, containing a red naphthoquinone molecule called echinochrome A, which degranulates and acts against Gram-positive and Gram-negative bacteria; in addition,

they are found in high concentration surrounding injuries, being considered to participate in wound healing (18).

Colorless Spherule Cell: Spherical cells containing granule in their cytoplasm. These granules differ from the red spherule cell in the electron density of their granules, reinforcing the hypothesis that both spherule cells are the same cell type in different physiological moments of maturation (23).

Both spherule cells are similar in shape and size, impeding their fractioning by separation gradient and cell sorting. Also, both of them present amoeboid migration (18). *Vibratile cell:* Round and small flagellate cells that move in a non-directional way. For this reason, they seem to be involved in the coelomatic fluid movement and coagulation (15).

Environmental stress and innate immune parameters

Environmental stress can be defined as "an environmental factor causing a change in a biological system, which is potentially injurious" (24). Thereafter, a necessity to evaluate the environmental stress has evolved, when the time has come for the use of biomarkers and biomonitoring, arising considerably the number of publications regarding this issue.

Regarding biomarkers that can be involved with coelomocytes of sea urchins, literature can be didactically divided into: 1- studies involving the proportion of coelomocytes, 2- studies involving heat shock response, 3- studies involving immunological responses, 4- studies involving molecules related to inflammatory process (Figure 4).

1- Studies involving the proportion of coelomocytes

Studies comprising the proportion of coelomocytes as biomarkers are mainly related to the red spherule cell. The use of RSCs was first proposed in 2000 (23), in a study that demonstrated their increase in case of polluted sea water by industries residues and cold and hot sea water. Posteriorly, studies were conducted and classified them as biomarkers for different environmental stressors such as contamination by metals (25) and by oil soluble fraction (26). Heat stress has also been reported for Antarctic sea urchins (27) and for tropical sea urchins (28).

The increase in colorless spherule cells was also reported as biomarker for heat stress in tropical sea urchins (28). The explanation for this can also be found in the hypothesis that this cell type can be a different maturation stage of red spherule cell (23). This hypothesis is supported by observations of Transmission Electron Microscopy (Figure 2) and Flow Cytometer (personal communication)

2- Studies involving the heat shock response

Heat shock proteins (HSPs) are a large class of proteins that have been conserved throughout evolution and are expressed in all cell types studied so far. Considered chaperones, this class of proteins helps the correct folding and unfolding of proteins aiming to achieve a correct three-dimentional conformation, which is strictly correlated to a functional protein. Studies demonstrated that their expression is up-regulated after the exposure to different stressors such as: hypoxia, heavy metal exposition and diseases and are finely correlated to immune function, playing important roles in antigen presentation and activation of macrophages (29). Taking into consideration that HSPs are evolutionarily conserved, there are strong possibilities that the function of HSPs in modulating immune response might also be present in sea urchins.

The HSP70 is heat shock protein with 70KDa that are the most studied among the chaperones. In the pioneer study of HSP70 expression by coelomocytes, the expression of HSP 70 was demonstrated for heat shock (35°C) and cold shock (4°C) for acute periods. Heavy metal, acidic pH and UV radiation led to an increase of Hsp70 expression in coelomocytes in culture (30, 31).

3- Studies involving immunological responses

Regarding immunological responses that can be affected by environmental stress, literature describes the phagocytic response of sea urchins exposed to thermal stress for different periods (27, 28), in which the phagocytic response, adhesive properties and cell spreading are impaired under elevated temperatures. Besides, the capture of metal oxide nanoparticles by phagocytes has been described as a biomarker for evaluating this nanoparticle toxicity (32).

4- Studies involving molecules related to inflammatory process.

The activity of cholinesterase as a good biomarker for environmental contamination of metal oxide nanoparticles was also reported (32). The same was reported for cold stress (33). Another stress marker already described for sea urchin coelomocytes is the methalotionein gene (MT1) described in heavy metal contamination (34). A study revealed that coelomocytes are biomarkers for DNA-damaging agents including ultraviolet radiation and hydrogen peroxide (35).

Conclusion:

The last decade was very important to elucidate the use of coelomocytes and their responses to environmental disorders, reinforcing and consecrating their use as biosensors for different environment stressful conditions (Figure 5). Despite all the efforts, many questions remain unanswered: What are the molecular mechanisms, signaling cascade and genes involved in the upregulation of coelomocytes? How could the activation of innate immune response be positive for the homeostasis of the organism and what are would be the consequences of it? These are just some examples of innumerous questions that can be raised. Much more study should be conducted aiming to better comprehend the use of coelomocytes, their regulation and the consequences for the organism after an environmental challenge.

Acknowledgments:

The authors express their acknowledgments to grants 2011/06044-4 and 2011/15612-6, São Paulo Research Foundation (FAPESP), to CAPES and CNPq for the financial support and to Adam Arai Martens for the English revision of this manuscript.

References

- 1- Sodergren E, Weinstock GM, Davidson EH, Cameron RA, Gibbs RA, Angerer RC, Angerer LM, Arnone MI et al. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Science. 2006; 314:941–952.
- 2- Smith LC. Innate Immune Complexity in the Purple Sea Urchin: Diversity of the *Sp185/333* System. Front Immunol. 2012; 3: 70.
- 3- Smith VJ. The echinoiderms. In: Ratcliffe NA, Rowley AF (eds), Invertebrate blood cells, Academic Press, New York, NY, pp 513 -562, 1981.
- 4- Coteur G, Gosselin P, Wantier P, Chambost-Manciet Y, Danis B, Pernet PH, Warnau M, Dubois, P. Echinoderms as Bioindicators, Bioassays, and Impact Assessment Tools of Sediment-Associated Metals and PCBs in the North Sea. Arch Environ Contam Toxicol. 2003; 45 (2), 190-202.
- 5- Cuénot, L. Anatomie éthologie, et systématique, des Échinodermes. In: Grassé, P. ed: Traité de zoologie. v.2, Échinodermes, stomocordes, procordes. Paris: Masson, p.1-363, 1948.
- 6- Epel D, Cole B, Hamdoun A, Thurber RV. The sea urchin embryo as a model for studying efflux transporters: Roles and energy cost. Mar Environ Res. 2006; 62:S1-S4.
- 7- Chiarelli R, Agnello M, Bosco L, Roccheri M.C. Sea urchin embryos exposed to cadmium as an experimental model for studying the relationship between autophagy and apoptosis. Mar Environ Res. 2013; 13: S0141-1136
- 8- Silva JR. The onset of phagocytosis and identity in the embryo of *Lytechinus variegatus*. Dev. Comp. Immunol. 2000; 24: 733-739.
- 9- Mangiaterra MBBCD, Silva JRMC. Induced inflammatory process in the sea urchin (*Lytechinus variegatus*). J Invertebr Biol. 2001; 120:178-184.
- 10- Faria MT, Silva JRMC. Innate immune response in the sea urchin *Echinometra lucunter*. J Invertebr Pathol. 2008; 98:58-62.
- 11- Silva, JRMC, 2013. Immunology in sea urchins. Pp. 187-195. In: Sea Urchins: Biology and Ecology. 3rd edition (J.M. Lawrence, Ed.), Academic Press, San Diego, CA.
- 12- Tauber AI, Chernyak L (1997) Metchnikoff and the origins of immunology, from metaphor to theory. Oxford University Press, New York
- 13- Gross PS, Al Sharif WZ, Clow LA, Smith LC. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. Dev. Comp. Immunol. 1999; 23: 429 442.
- 14- Ramirez-Gomez F, Garcia-Arrarás JE. Echinoderm immunity. Invertebrate Surviv J. 2010; 7: 211-220.
- 15- Smith LC, Rast JP, Brockton V, Terwilliger DP, Nair SV, Buckley K, et al. The sea urchin immune system. Inv. Surv. J. 2006; 3: 25-39.
- 16- Li C, Haug T, Styrvold OB, Jorgensen TO, Stensvag K. Stromgylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin *Strongylocentrotus droebanchiensis*. Dev Comp Immunol. 2008; 32:12, 1430-1440.
- 17- Schiallaci D, Cusimano MG, Cunsolo V, Saletti R, Russo D, Vazzana M, et al. Imune mediators of sea-cucumber *Holothuria tubulosa (Echinodermata)* as source of novel antimicrobial and anti-staphylococcal biofilm agents. AMB Express. 2013; 3-35
- 18- Matranga V, Pinsino A, Celi M, Natoli A, Bonaventura R, Schröder HC, and Müller WEG 2005. Monitoring chemical and physical stress using sea urchin immune cells. In: Echinodermata, ed Matranga V. Springer, Heidelberg, 85–110.
- 19- Edds KT. Cell biology of echinoid coelomocytes. I. Diversity and characterization of cell types. J. Invert. Biol. 1993; 61: 173-178

- 20- Gross PS, Clow LA, Smith LC. SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes. Immunogenetics. 2000; 51: 1034-1044.
- **21-** Brockton V, Henson JH, Raftos DA, Majeske AJ, Kim YO, Smith LC. Localization and diversity of 185/333 proteins from the purple sea urchin unexpected protein-size range and protein expression in a new coelomocyte type. J. Cell. Sci. 2008; 121, 339–348.
- 22- Borges JC, Jensch-Junior BE, Garrido PA, Mangiaterra MB, Silva JRMC. Phagocytic amoebocyte sub populations in the perivisceral coelom of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). J Exp Zool A Comp Exp Biol. 2005 Mar 1;303(3):241-8.
- 23- Matranga, V, Toia, G, Bonaventura, R., Muller, WEG. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. Cell Stress Chaperones 2000; 5(2), 113-120.
- 24- Hoffmann AA and Parsons PA 1997 Extreme environmental change and evolution. 1st ed., Cambridge: Cambridge University Press
- **25-** Pinsino, A, Della Torre, C, Sammarini V, Bonaventura R, Amato E, Matranga, V. Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Italy. Cell Biol Toxicol. 2008; 24(6),541-52.
- 26- Borges JCS, Branco PC, Pressinotti LN, Severino D, Silva JRMC. Intranuclear crystalloids of Antarctic sea urchins as a biomarker for oil contamination. Polar Biol. 2010; 33(6), 843-849.
- 27- Branco PC, Pressinotti LN, Borges JCS, Iunes RS, Kfoury-Jr JR, Silva MO, Gonzalez M, Santos MF, Peck LS, Cooper EL, Silva JRMC,. Cellular biomarkers to elucidate global warming effects on Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. Polar Biol. 2012 35, 221-229.
- **28-** Branco PC, Borges JCS, Santos MF, Silva JRMC The impact of rising sea temperature on innate immune parameters in the tropical subtidal sea urchin *Lytechinus variegatus* and the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter*. Mar Environ Res 2013; 92:95-101.
- 29- Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. J Leukoc Biol. 2009 Jun;85(6):905-10.
- 30- Matranga V, Bonaventura R, Di Bella G. Hsp70 as a stress marker of sea urchin coelomocytes in short term cultures. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2002, 48 (4):345-9.
- **31-** Matranga V, Pinsino A, Celi M, Bella G, Natoli A. Impacts of UV-B radiation on short term cultures of sea urchin coelomocytes. Mar Biol. 2006, 149:24-34.
- **32-** Fallugi C, Aluigi MG, Chiantore MC, Privitera D, Ramoino P, Gatti MA, Fabrizi A, Pinsino A, Matranga V. Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin. Mar Inviron Res. 2012; 76:114-121.
- **33- Angelini C, Amaroli A, Falugi C, Di Bella G, Matranga V.** Acetylcholinesterase activity is affected by stress conditions in *Paracentrotus lividus* coelomocytes. Mar Biol. 2003, 143: 623-628.
- 34- Rumahlatu D, Corembima AD, Amin M, Rohman F. Activation, concentration and expression of metallothionein 1 on sea urchin as biomonitoring heavy metal cadmium. Research Inventy: International Journal Of Engineering And Science, 2013;3(3): 6-12.
- 35- Loram J, Raudonis R, Chapman J, Lortie M, Bodnar A. Sea urchin coelomocytes are resistant to a variety of DNA damaging agents. Aquat Toxicol. 2012 Nov 15;124-125:133-8.

Figures and table legends

Figure 1. Cladogram demonstrating the phylogenetic position of the Deuterostome group (Orange box). The phylogenetic proximity of sea urchin (echinoderm) to chordates shall be noted.
Figure 2. Coelomocytes morphology. A. Phagocytic amoebocyte: cell with a large and central nucleus with loose chromatin and cytoplasm with quantity of endoplasmic reticulum indicating an intense synthetic activity. B. spherical cell with a small, peripheral nucleus with dense chromatin and cytoplasm filled with homogenous vesicles. C. Morphology similar to red spherule cell varying only in its vesicles density, which are more heterogenous.

Figure 3. Phagocytosis. It represents the first line of defense for invertebrates and vertebrates. In sea urchins phagocytic amoebocyte is the only cell type that is able to perform phagocytosis. A. Schematic drawing demonstrating steps of phagocytosis. 1. Chemotaxis to the foreign particle (through chemotactic elements like LPS, complements and demaged cells) culminating in adhesion of phagocyte to the particle. 2. Cytoskeleton remodeling leading to pseudopodia extension around the particle. 3. Formation of phagosome in which the particle is completely internalized. 4. Fusion of phagosome to lysosomes aiming to digest the phagocytic particle. 5. Phagocytized material is then digested by lysosomal enzymes. 6. Discharge of digested material that cannot be recycled by the cell. B. Phagocytosis observed under phase contrast microscopy. A phagocytic amoebocyte is visualized spread onto glass slide. Inside its cytoplasm is possible to observe some yeast cells internalized (arrow).

Figure 4. Graphics drawn based on indexed researches from 2000 to 2013 involving environmental stress on sea urchin coelomocytes. For this search either the proportion of coelomocytes or the genes upregulation and immune response were considered. A. Proportion of stressors capable to induce coelomocytes alterations. B. Proportion of sea urchin species studied. C. Proportion of studies performed on laboratory stress conditions or collected at field work. D. Proportion of biomarkers reported for sea urchin environmental stress.

Figure 5. Schematic drawing demonstrating the effect of stress on coelomocytes. Phagocytic amoebocytes respond with impairment in the immunological function, lacking adhesive properties, presenting alterations on cell spreading and decreased phagocytic capacity. Spherule cells, either colorless or red ones, respond with increase in their cell numbers. Also, coelomocytes respond to stress increasing the expression of HSPs.

Table 1. Sea urchin coelomocytes: morphological characteristics according to phase and transmission electron microscopy, nomenclatures used, type of migration of proportion of each cell type.

 Table 1: Coelomocyte rev.docx

Coelomocyte	Different Nomenclatures	Sub-type	Morphology based on Phase Contrast Microscopy	Morphology based on Electron Microscopy	Migration	Proportion on CF
Phagocytic Amoebocyte	Phagocytes	Discoidal Cell Polygonal Cell Small phagocytes	This cell type is agranular and presents capacity to emit cytoplasmic projections. Also they can acquire a spread shape when in touch with a glass slide.	A large and central nucleus with loose chromatin and abundant quantity of endoplasmic reticulum indicating an intense synthetic activity (Branco et al., 2013).	Mesenchymal	60-70% (Borges et al., 2005)
Red Spherule Cells	Red Amoebocyte	-	Spherical cell with red cytoplasmic granules containing a naftoquinone substance called echinochrome what gives the redish color.	Small, peripheral nucleus with dense chromatin and its cytoplasm fulfilled with heterogeneous vesicles. (Branco et al., 2013).	Ameboid	5-10% (Borges et al., 2005)
Colorless Spherule Cells	Colorless Amoebocyte	-	Spherical cell with colorless cytoplasmic granules.	Small, peripheral nucleus with dense chromatin and its cytoplasm was fulfilled with electron lucent vesicles with a more electron dense center. (Branco et al., 2013).	Ameboid	5-10% (Borges et al., 2005)
Vibratile Cell	-	-	Round cell with one single flagellum that allow it to move.		Rotational movement	15-20% (Borges et al., 2005)



Figure 1: Fig 1 oa_biology.tif



Figure 2: Fig 2 oa_biology.tif



Figure 3: Fig 3 oa_biology.tif



Figure 4: Fig 4 oa_biology .tif



Figure 5: Fig 5 ao_biology.tif

Trabalhos publicados em colaboração

- Effects of trophic levels (chlorophyll and phosphorous content) in three different water bodies (urban lake, reservoir and aquaculture facility) on gill morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Borges, JCS, Vivai, ABBS, Branco, PC, Silva, OM, Silva, JRMC. Journal of Applied Ichthyology, v. 29, p. 573-578, 2013.
- Energetic metabolic differences between tropical *Lytechinus variegatus* and polar *Sterechinus neumayeri* echinoderms. Borges, JCS, Silva, JRMC, Rocha, AJS, Jensch-Jr, BE, Pressinotti, LN, Gomes, V, Branco, PC, Phan, VN. Pesquisa Antártica Brasileira, v. 5, p. 1-8, 2011.
- Intranuclear crystalloids of Antarctic sea urchins as a biomarker for oil contamination. Borges, JCS, Branco, PC, Severino, D, Silva, JRMC. Polar Biology (Print), v. 33, p. 843-849, 2010