ANDREWS KRUPINSKI EMERENCIANO

IDENTIFICAÇÃO DO PIGMENTO PRESENTE NOS ESFERULÓCITOS VERMELHOS DO OURIÇO DO MAR ANTÁRTICO STERECHINUS NEUMAYERI (MEISSNER 1900) E SEU PAPEL NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA

> Tese apresentada ao programa de pósgraduação de Biologia de Sistemas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2019 IDENTIFICAÇÃO DO PIGMENTO PRESENTE NOS ESFERULÓCITOS VERMELHOS DO OURIÇO DO MAR ANTÁRTICO STERECHINUS NEUMAYERI (MEISSNER 1900) E SEU PAPEL NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA

> Tese apresentada ao programa de pósgraduação de Biologia de Sistemas, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

> Área de Concentração: Biologia Celular, Tecidual e Desenvolvimento

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

Versão original.

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Emerenciano, Andrews Krupinski Identificação do pigmento presente nos esferulócitos vermelhos do ouriço do mar antártico Sterechinus neumayeri (Meissner 1900) e seu papel na modulação da resposta imune inata / Andrews Krupinski Emerenciano; orientador José Roberto Roberto Machado Cunha da Silva. -- São Paulo, 2019. 100 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Pigmento. 2. Ouriço do mar. 3. Imunidade inata. 4. Fagocitose. I. Roberto Machado Cunha da Silva, José Roberto, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Andrews Krupinski Emerenciano

Titulo da Dissertação/Tese: Identificação do pigmento presente nos esferulócitos vermelhos do ouriço do mar antártico Sterechinus neumayeri (Meissner 1900) e seu papel na modulação da resposta imune inata

Orientador: José Roberto Machado Cunha da Silva

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a, considerou o(a) candidato(a):

>) Aprovado(a) () Reprovado(a) (

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
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 :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405 e-mail: <u>cep@icb.usp.br</u>

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 705/14 referente ao projeto intitulado: "*Função do equinocromo na modulação da resposta imune inata em ouriços-do-mar antártico Sterechinus neumayeri e tropical Lytechinus variegatus*" sob a responsabilidade de **Andrews Krupinski Emerenciano,** 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 nº466 de 2012.

São Paulo, 15 de dezembro de 2014.

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, Airton e Ivone, que sempre me deram todo o apoio, amor e motivação para seguir em frente.

Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.

Clarice Lispector

RESUMO

EMERENCIANO, A. K. Identificação do pigmento presente nos esferulócitos vermelhos do ouriço do mar antártico Sterechinus neumayeri (Meissner 1900) e seu papel na modulação da resposta imune inata. Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas: Biologia Celular, Tecidual e Desenvolvimento). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2019.

equinodermos bentônicos amplamente Ouricos do mar são distribuídos geograficamente, que possuem um sistema imune inato bem desenvolvido capaz de fornecer uma ampla gama de respostas celulares e moleculares. As funções de seu sistema imune estão diretamente relacionadas aos celomócitos, diferentes tipos celulares presentes no líquido celomático. Dentre estas células, os esferulócitos vermelhos são considerados mediadores da resposta imune por meio da atividade antioxidante e bactericida do pigmento equinocromo-A presente em seus grânulos citoplasmáticos. Apesar da atividade descrita para os esferulócitos, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos de atuação deles no sistema imune inato de ouriços do mar. Diferentes estudos mostram o aumento da proporção dos esferulócitos vermelhos em diferentes condições de estresse ambiental. Diante disso, este trabalho teve como objetivo identificar o pigmento presente nos esferulócitos vermelhos do ouriço do mar antártico Sterechinus neumayeri, bem como avaliar suas funções no sistema imune inato. O pigmento foi extraído a partir dos celomócitos, purificado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), submetido a análises por espectrometria de massas (ESI-MS) e posteriormente avaliada sua atividade biológica em um contexto imunológico e molecular. Foram realizados ensaios *in vitro* com duas concentrações do pigmento (50 e 100µg/mL) durante 1h, 6h e 24 horas de incubação. Avaliou-se também o efeito dele na expressão dos genes policetídeo sintase (Pks), sulfotransferase (SULT), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), metalotioneína (MT) e Hsp70. O tratamento das células com diferentes concentrações de pigmento não alterou a expressão de PKs, SULT e MT. Já para SOD, CAT e Hsp70 observou-se a diminuição da expressão em 1 hora a 100 µg/mL, seguida de aumento da expressão de CAT em 24 horas, para ambas as concentrações testadas. Constatou-se que os esferulócitos vermelhos de S. neumayeri possuem um novo pigmento naftoquinônico polihidroxilado. Além disso, verificou-se que esta espécie não apresenta o equinocromo-A. Observou-se aumento da capacidade fagocítica, em relação ao controle, após uma 1 hora de tratamento com

as duas concentrações do pigmento. A análise da morfologia dos amebócitos fagocíticos após 1 hora de incubação com o pigmento mostrou aumento na marcação do citoesqueleto de actina, provavelmente devido a intensificação da polimerização dos filamentos de actina. Além disso foi observado uma diminuição da área dos amebócitos fagocíticos. Conclui-se que o pigmento presente nos esferulócitos vermelhos de *S. neumayeri* seja um forte candidato ao papel de imunoestimulador de amebócitos fagocíticos para esta espécie de ouriço do mar.

Palavras chave: Pigmento, Ouriço do mar, Imunidade inata, Fagocitose.

ABSTRACT

EMERENCIANO, A. K. Identification of the pigment present in the red sphere cells of the Antarctic sea urchin Sterechinus neumayeri (Meissner 1900) and its role in modulating the innate immune response. Ph.D Theses (PhD in Systems Biology: Cell, Tissue and Development Biology) São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2019.

Sea urchins are widely geographically distributed benthic echinoderms, which have a well-developed innate immune system capable of providing a wide range of cellular and molecular responses. All functions of your immune system are directly related to the coelomocytes, different cell types present in coelomic fluid. Among these cells, red sphere cells are considered mediators of immune response through a pigment with antioxidant and bactericidal activity, the echinochrome-A, located inside cytoplasmic granules. Despite the activities described for sphere cells, not so much is known about mechanisms of their action in the innate immune system of sea urchins. Different studies show an increased proportion of red sphere cells under different conditions of environmental stress. This study aimed to identify the pigment present in the sphere cells of antarctic sea urchin Sterechinus neumayeri as well as evaluate their functions in the innate immune system. The pigment was extracted from coelomocytes, purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), subjected to mass spectrometric analysis (ESI-MS) and then its biological activity was evaluated in the context of cell immune response. In vitro assays were performed with two pigment concentrations (50 and 100µg / mL) for 1h, 6h and 24 hours of incubation time. The pigment's effect on gene expression was also evaluated for polyketide synthase (Pks), sulfotransferase (SULT), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), metallothionein (MT) and Hsp70. Treatment of cells with different concentrations of pigment did not alter the expression of PKs, SULT and MT. For SOD, CAT and Hsp70 decreased expression at 1 hour at 100 µg /mL was observed, followed by 24-hour CAT expression increase for both tested concentrations. A new polyhydroxylated naphthoquinone pigment was found in red sphere cells of S. neumayeri. In addition, the echinochrome-A was not found in antarctic species. It was observed increased in phagocytic capacity compared to control after 1 hour treatment with both pigment concentrations. The analysis of morphology of phagocytic amoebocytes after 1 hour incubation with the pigment showed an increase in actin cytoskeleton labeling,

probably due to the intensification of the actin filaments polymerization. In addition, a decrease in phagocytics amebocytes area were observed. We can conclude that the pigment present in *S. neumayeri* red sphere cells is a strong candidate for the role of phagocytic amebocyte immunostimulator in this species of sea urchin.

Keywords: Pigment, Sea urchin, Innate immunity, Phagocytosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA Análise de Variância
- CAT Catalase
- CDs recptor de membrana
- cDNA DNA complementar
- CR1, 2, 3 e 4 recptor de célula fagocítica
- CT Cycle Threshold
- CTCF análise da fluorescência total corrigida das células
- DAPI 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (coloração fluorescente que se
- liga à adenina no DNA.
- DNA Ácido Desoxirribonucleico
- dNTPs Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- DTT Ditiotreitol
- EROs espécies reativas de oxigênio
- ESI-IT-TOF espectrometria de massas
- Fc recptor de membrana
- FSW Água do Mar Filtrada
- GTPases Família de enzimas hidrolase que se ligam ao nucleotídeo guanosina trifosfato
- HCI Ácido Clorídrico
- HSP Proteína de choque térmico
- ISO-EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético pH 7.5
- kV quilovolts
- LPS Lipopolisacarideo
- MgCl₂ Cloreto de Magnésio
- mRNA RNA mensageiro
- MT Metalotioneínas
- NaCI Cloreto de Sódio
- NFkB factor nuclear kappa B
- OH Hidroxila
- PBS Tampão fosfato-salino
- PCR Reação em cadeia da polimerase
- PKs Policetídeo Sintase

SOD - Superóxido Dismutase

SPE - extração de fase sólida

SULT - Sulfotransferase

SYBR Green - Corante de Cianina Assimétrico usado como corante de ácido nucléico na biologia molecular.

RNA – Ácido Ribonucléico

RP-HPLC - cromatografia líquida de alta performance de fase inversa

RT-qPCR - PCR quantitativo em tempo real

TFA - ácido trifluoroacético

TLR - receptores Toll

SRCR - receptores Scavenger

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Filogenia de ouriços do mar4
Figura 2 - Anatomia de um ouriço do mar6
Figura 3 - Estrutura química apresentada para o pigmento vermelho equinocromo-A.
Figura 4 - Exemplar de ouriço do mar da espécie Sterechinus neumayeri23
Figura 5 - Arrasto com a rede e triagem manual dos animais colhidos24
Figura 6 - Mapa da região de coleta dos animais24
Figura 7 - Pigmento extraído de celomócitos de S. neumayeri em etanol absoluto27
Figura 8 - Esquema representativo da extração em fase sólida com coluna SPE 28
Figura 9 - Exemplo de padronização dos oligonucleotídeos por qRT-PCR37
Figura 10 - Exemplo de mensuração realizada para obtenção da fluorescência total corrigida das células (CTCF) e área de espraiamento (µm ²)40
Figura 11 - Fotomicrografia de celomócitos a fresco do ouriço do mar <i>Sterechinus neumayeri</i> em contraste de fase42
Figura 12 - Cromatograma da separação inicial das frações celulares e de carapaça/espinho, por RP-HPLC, usando uma coluna C18 em 0-100% de solvente B a 214 nm
Figura 13 - Cromatograma de separação da fração celular por RP-HPLC, usando uma coluna C18 em 0-100% de solvente B a 473nm45
Figura 14 - Espectro de absorção no UV-Visível da fração celular de <i>S. neumayeri</i> adquirido a 473 nm47
Figura 15 - Perfil de massas do pigmento purificado da fração celular de <i>S. neumayeri</i> .
Figura 16 - Proporção de celomócitos viáveis de <i>S. neumayeri</i> ao longo de 0 a 24 horas de exposição as concentrações de pigmento. Cada barra representa a média de dois experimentos independentes em triplicata ± SD
Figura 17 - Capacidade fagocítica de amebócitos fagocíticos de <i>S. neumayeri</i> expostos a 50 e 100 µg/mL de pigmento por 1h, 6h e 24 horas52

Figura 19 - Alterações na marcação do citoesqueleto de actina em amebócitos fagocíticos de *S. neumayeri*, induzidas pelo tratamento com o pigmento.57

Figura 20 - Valores representam a Fluorescência Total Corrigida das Células (CTCF) de AFs de *S. neumayeri* expostos a 50 e 100 µg/mL de pigmento por 1 hora...58

Figura 21 - Correlação positiva entre capacidade fagocítica e intensidade de fluorescência após uma hora de exposição de AFs a 50 e 100 µg/mL de pigmento.

Figura 22 - Área de espraiamento de AFs de *S. neumayeri* expostos a 50 e 100 µg/mL de pigmento por 1 hora......60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados.	33
Tabela 2 - Avaliação do número total e relativo dos diferentes tipos celu Sterechinus neumayeri (N=6)	lares em 43
Tabela 3 - Analise inicial das frações celulares de carapaça/espinhos de S. n	eumayeri 48

Sumário

1 INTRODUÇÃO 23			. 23
	1.1	Ambiente antártico	. 24
	1.2	Ouriços do mar	. 25
	1.3	Sistema imune de ouriços do mar	. 29
	1.4	Mediadores celulares da resposta imune inata em ouriços do mar	. 31
	1.5	Pigmento dos esferulócitos vermelhos	. 34
	1.6	Fagocitose	. 38
	2	OBJETIVOS	. 42
2.	.1	Objetivo geral	. 42
	2.2	Objetivos específicos	. 42
3	M	ATERIAIS E MÉTODOS	. 43
	3.1	Colheita dos animais	. 43
	3.2	Manutenção dos animais	. 46
	3.3	Obtenção e classificação dos celomócitos	. 47
	3.4	Contagem total e relativa de celomócitos	. 47
	3.5	Extração de pigmentos	. 48
	3.6	Purificação do pigmento por RP-HPLC	. 50
	3.7	Análise por espectrometria de massas	. 51
 3.8 Exposição in vitro dos celomócitos ao pigmento 3.9 Ensaio de viabilidade celular 		Exposição in vitro dos celomócitos ao pigmento	. 51
		Ensaio de viabilidade celular	. 52
	3.10	Avaliação da atividade fagocítica in vitro	. 52
	3.11	Análise da expressão gênica por RT-qPCR	. 53
	3.1	11.1 Extração de RNA total	. 53
	3.' 3.'	11.2 Sintese de DNA complementar	. 54
	3. 3.	11.4 RT-PCR	. 55
	3.1	11.5 gRT-PCR - PCR quantitativo em tempo real	. 56
	3.1	11.6 Padronização dos oligonucleotídeos para q-RT-PCR	. 57
	3.1	11.7 Análise diferencial da expressão gênica	. 58
	3.12	Análise da morfologia celular e do citoesqueleto de actina	. 59
	3.1	12.1 Análises de fluorescência	. 59
	3.1	12.2 Mensuração da área da célula espraiada	. 60
	3.13	Análise Estatística	. 61
4	RI	ESULTADOS	. 63
	4.1	Contagem total e diferencial dos celomócitos	. 63
	4.2	Extração e purificação dos pigmentos	. 64
	4.3	Análise por espectrometria de massas (MS)	. 69

4.4 Análises in vitro	72
4.4.1 Avaliação da viabilidade celular	72
4.4.2 Avaliação da atividade fagocítica in vitro	73
4.4.3 Expressão de genes alvos relacionados às vias de biossíntese de	
pigmentos, atividade antioxidante e estresse	74
4.4.4 Avaliação da morfologia celular e organização do citoesqueleto de act	ina
em amebócitos fagocíticos expostos ao pigmento	78
5 DISCUSSÃO	83
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

Os ouriços do mar fazem parte do filo Equinodermata, que por sua vez são representados por invertebrados marinhos bentônicos de ampla distribuição geográfica, desde ambientes tropicais até ambientes polares (HYMAN, 1955). Os invertebrados marinhos pertencentes a este filo possuem numerosas espécies com papéis fundamentais em seus ecossistemas, além de características únicas e especializadas, como o sistema hidrovascular e os pés ambulacrais (SMITH *et al.*, 1992; MENGE *et al.*, 1994). Apesar da ausência de um sistema circulatório fechado e de possuir simetria radial, eles são deuterostômios (HYMAN, 1955) o que os posiciona filogeneticamente mais próximos aos cordados do que os demais grupos de invertebrados (HIBINO *et al.*, 2006). Sendo que padrões similares de emergência de moléculas relacionadas à imunologia, sugerem que alguns dos mecanismos celulares empregados pelos vertebrados, para regulação da diversidade adaptativa e receptores, podem ter emergido de sistemas estabelecidos antes em ancestrais deuterostomados, com a finalidade de controlar o sistema inato (LITMAN *et al.* 2005; 2007).

A habilidade de invertebrados ectotérmicos em se defenderem contra uma série de microorganismos patogênicos oportunistas, está diretamente relacionada à capacidade com que os mesmos possuem de sobreviver em ambientes tão distintos ao redor do planeta. Diferentes aspectos deste filo vêm sendo avaliados, dentre os quais, os imunológicos, que envolvem o estudo de mecanismos de defesa exercidos pelos celomócitos, presentes no celoma perivisceral, sendo estes, os principais responsáveis pela resposta imune inata (GROSS *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 2010). No entanto, as diferentes funções desempenhadas por cada tipo celular presente no líquido celomático de ouriços do mar são pouco compreendidas.

Em ouriços do mar, bem como em outros invertebrados, não se aplica o conceito, bem estabelecido, de imunidade adaptativa, sendo estes animais, dotados apenas de um sistema imune inato (DEVEALE et al., 2004), altamente sofisticado e diversificado, que por sua vez, é mediado por um amplo repertório de proteínas inatas de reconhecimento de patógenos (SODERGREN *et al.*, 2006), sendo este tipo de imunidade mediada pelos celomócitos, responsáveis por processos tais como fagocitose, encapsulação, citotoxicidade e produção de agentes antimicrobianos. A reposta humoral, por outro lado, é exercida por uma variedade de moléculas como

lectinas, aglutininas, lisinas e outras que desempenham importante papel na defesa do organismo contra uma série de patógenos (SMITH *et al.*, 2010).

Diversos autores descrevem o aumento do número de celomócitos de diferentes espécies de ouriços do mar quando submetidos à diferentes tipos de estresse ambiental, sendo que dentre os celomócitos, o esferulócito vermelho é o que mais apresenta alterações em resposta ao estresse (BORGES *et al.*, 2007; BRANCO *et al.*, 2012; FALUGI *et al.*, 2012; MATRANGA, 2005; SMITH *et al.*, 2010), sendo considerado um biomarcador de estresse ambiental (COTEUR *et al.*, 2004, PINSINO; MATRANGA, 2015). Sabe-se que, ao degranularem, os esferulócitos vermelhos liberam equinocromo-A presente e seus grânulos (JOHNSON;CHAPMAN, 1970), um pigmento naftoquinônico polihidroxilado pertencente à classe das quinonas (MARTÍNEZ; BENITO, 2005), que por sua vez, constitui um grupo de compostos policetídeos que apresentam ampla distribuição e atividade biológica (KOLTSOVA *et al.*, 1981).

Apesar do crescente número de estudos envolvendo os celomócitos, a grande maioria, baseia-se na análise destes como resposta à mudanças ambientais e contaminantes, havendo um déficit de dados relacionados à função biológica destas células no sistema imune inato destes organismos, principalmente dos esferulócitos vermelhos, quem vem chamando a atenção devido as características farmacológicas do equinocromo-A. Diante disso, estudos que avaliem a função biológica dos diferentes tipos celulares em ouriços do mar tornam-se necessários, visando melhorar o entendimento do seu papel na imunidade inata, dada sua importância para a sobrevivência destes organismos (LOKER *et al.,* 2004).

Interessantemente, o aumento dos esferulócitos vermelhos no ouriço do antártico *Sterechinus neumayeri* foi observado após indução de estresse térmico (BRANCO *et al.*, 2012) e da inoculação de LPS (GONZALEZ-ARAVENA *et al.*, 2015), sendo que em ambos os estudos houve também o aumento da capacidade fagocítica após o desafio. Estes resultados nos levaram a buscar entender melhor as funções que os esferulócitos vermelhos e o pigmento por ele produzido, desempenham no sistema imune inato de ouriços do mar, utilizando como modelo a espécie de ouriço antártico *Sterecinus neumayeri*.

1.1 Ambiente antártico

O continente antártico possui as temperaturas mais baixas registradas do planeta, abrigando diversas espécies endêmicas resultantes da derivação do continente para o Polo Sul (EASTMAN 1991, 1993). As características únicas da região, como a convergência antártica, as variações de salinidade, intensa sazonalidade em relação à luminosidade, produtividade primária, e as altas concentrações de oxigênio dissolvido na água, determinaram a evolução de uma fauna marinha única e extremamente endêmica (DEWITT, 1970; FOSTER, 1984; EASTMAN; GRANDE, 1989; NORTH, 1991; EASTMAN, 1993).

A temperatura não foi o fator primariamente responsável pela baixa diversidade da fauna recente (CLARKE; CRAME, 1989; EASTMAN; GRANDE,1989). Da mesma forma, a emergência dos equinodermos antárticos, provavelmente, não foi uma resposta direta ao resfriamento, mas uma subsequente distribuição desse grupo sob as condições de frio, necessariamente associadas a uma variedade de especializações relacionadas à baixa temperatura da água, tais como adaptações enzimáticas e adaptações de membrana (EASTMAN, 1993).

A temperatura é um fator que exerce papel fundamental em processos biológicos de diferentes organismos, sendo capaz de determinar a taxa de processos essenciais, tais como: reações enzimáticas, difusão e transporte de membrana, induzir alterações nas taxas metabólicas, além da taxa de crescimento e reprodução (HOCHACHKA; SOMERO, 2002). Este pode ser um dos fatores que controlam o estabelecimento de diferentes organismos em ambientes extremos, uma vez que são capazes de se adaptarem à determinadas faixas de temperatura. Contudo, mudanças além dessas faixas, podem provocar declínio da população (HOEGH-GULDBERG; BRUNO, 2010).

1.2 Ouriços do mar

Dentre os organismos presentes no Filo Equinodermata, os ouriços do mar são os mais abundantes e conhecidos, junto com as estrelas do mar. Este filo por sua vez, pode ser subdividido em cinco classes: Crinoidea (crinoides/lírio do mar), Asteroidea (estrelas do mar), Ophiuroidea (ofiuroides, estrelas serpetes), Echinoidea (ouriços-domar e bolachas do mar) e Holothuroidea (pepinos do mar). Após diversas alterações sofridas ao longo da história na sua classificação, foi apenas em 1875, com os avanços dos estudos da embriogênese em invertebrados, foi que Huxley (1875) propôs o grupo Deuterostomata (durante a embriogênese o blastóporo dará origem ao ânus). 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 (Figura 1), que faz desses organismos importantes ferramentas de estudo das características evolutivas apresentadas pelos vertebrados (ROMER; PARSONS, 1985).

Figura 1 – Filogenia de ouriços do mar. Cladograma evidenciando a relação entre os ouriços do mar e outros grupos animais e sua proximidade aos cordados, sugerindo sua importância como modelo para estudos filogenéticos.



(Retirado de Sodergren et al., 2006)

Os equinodermos possuem características únicas, tais como a presença de um sistema hidrovascular ou ambulacrário, constituído por um singular sistema de canais celomáticos e apêndices superficiais que são prolongamentos ocos denominados pés ambulacrais que atuam por meio do sistema hidrovascular, podendo atuar na captura de alimentos, locomoção e percepção ambiental (HYMAN, 1955; RUPPERT; BARNES, 1996).

Os animais que compõem este filo são exclusivamente marinhos, tipicamente bentônicos, em grande maioria séssil ou com baixa capacidade de locomoção. Possuem esqueleto interno, composto por ossículos calcários, podendo estes serem flexíveis, como nas estrelas-do-mar e ofiuroides, ou, mais rígidos, formando uma superfície esquelética, como nos ouriços e bolachas do mar, que apresentam ainda espinhos ou tubérculos fixos ao esqueleto (HYMAN, 1955).

Constituem um dos grupos de grande importância das comunidades bentônicas, ocupando diferentes níveis tróficos, com ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrados em zonas polares e tropicais. Estes animais são essencialmente herbívoros, mas podem abranger também organismos carnívoros ou detritívoros, apresentando um sistema digestório completo – composto por boca e ânus – ausente em ofiuroides e asteroides (PEARSE, 2006; VENTURA *et al.*, 2006).

equinoides, classe ao qual pertencem os ouriços-do-mar, são Os caracterizados como celomados, com simetria bilateral na fase larval, e pentaradial na fase adulta. Podem ser subdivididos em dois grupos: regulares (ouriços do mar) e irregulares (bolachas do mar). Os ouriços do mar apresentam tipicamente forma globosa, levemente achatados nos polos, apesar de alguns serem ovais. São formados por uma carapaça de carbonato de cálcio, onde encontram-se os espinhos, e que delimita a cavidade celomática, que por sua vez é preenchida por líquido celomático, onde circulam os elementos celulares, denominados celomócitos. Possuem a boca diametralmente oposta ao ânus e em contato com a superfície, rodeada por uma membrana ligeiramente calcificada, denominada membrana peristomial, que delimita os cinco dentes da lanterna de Aristóteles, órgão utilizado para alimentação. Na cavidade celomática, encontram-se as gônadas, o aparelho digestório e os cordões nervosos que fazem parte do sistema nervoso simples por eles apresentados. As brânquias ficam externas à carapaça, rodeando a extremidade da membrana peristomial e o início da carapaça em sentido perpendicular à mesma (RUPPERT; BARNES, 1996) (Figura 2). A composição do líquido celomático assemelha-se à da água-do-mar, diferindo um pouco na concentração de alguns compostos como potássio, lipídeos, proteínas e açucares dissolvidos (CHIA; XING, 1996).

Figura 2 – Anatomia de um ouriço do mar. Esquema ilustrando principais características internas de um ouriço do mar.



(retirado de Pinsino; Matranga. 2015).

O genoma do ouriço do mar *Strongylocentrotus purpuratus* revelou um vasto repertório genético, onde muitos dos genes identificados foram considerados inovações ou conhecidos apenas fora dos deuterostomados, sugerindo perda em vertebrados (SODERGREN *et al.*, 2006). A partir daí, foram identificados mais de 1.000 genes modelos com relevância à imunidade e outras funções celulares (HIBINO *et al.*, 2006), com representantes homólogos de importantes reguladores imunes e hematopoiéticos de cordados, assim como genes que são críticos na imunidade adaptativa de vertebrados mandibulados (RAST *et al.*, 2006).

Análises posteriores reforçam a importância do estudo do sistema imune inato de ouriços do mar, uma vez que foram identificados aproximadamente 340 membros da família de receptores Toll (TLR) (PANCER; COOPER, 2006), mais de 200 membros de receptores NOD (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 vertebrados, representando uma expansão de mais de 10 vezes quando comparado aos vertebrados (BUCKLEY; RAST, 2012). Desta forma, os ouriços do mar podem ajudar a desvendar variações adicionais para proteção contra patógenos, e fornecer recursos, até então pouco conhecidos para, aplicações antimicrobianas com

relevância direta à saúde humana, além de levar à identificação de novas funções imunes em deuterostômios.

Dentre funções importantes, como seu papel no ambiente marinho antártico, o ouriço do mar antártico Sterechinus neumayeri, apresenta-se como excelente 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). Encontrase como o ouriço do mar regular mais abundante em águas rasas da antártica, podendo ser encontrado em cascalhos e rochas em profundidade máxima relatada de 500 metros (BREY; GUTT, 1991). Entre os predadores dessa espécie, podemos citar a estrela do mar Odontaster validus e a anêmona Urticinopsis antarcticus (DAYTON et al., 1970). Devido às baixas temperaturas presentes no ambiente antártico, o desenvolvimento da espécie é consideravelmente lento, sendo que seu processo de gametogênese pode demorar 2 anos (PEARSE et al., 1991) e a metamorfose de seus embriões ocorre em média 4 messes após sua fertilização (BOSCH et al., 1987). A flutuação na disponibilidade de alimentos ao longo do período de sua reprodução é um dos principais fatores que podem afetar esse mecanismo, sendo que esta espécie apresenta um comportamento oportunista de alimentação. Análise das diferentes estratégias relacionadas na disponibilidade de alimentos durante a interanualidade não apresentou grandes mudanças, sugerindo que apesar do seu ciclo reprodutivo de 2 anos, o seu comportamento oportunista permite uma gestão bem sucedida das deficiências interanuais no suprimento de alimentos (CHIANTORE et al., 2001).

Diante disso, os equinoides vêm atraindo cada vez mais a atenção de pesquisadores que buscam encontrar mecanismos imunológicos primitivos que seriam filogeneticamente ancestrais aos dos vertebrados, além de fornecer conhecimento de novas moléculas resultantes da adaptação ao ambiente antártico que possam ser de interesse para aplicações biotecnológicas (LOKER *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2010).

1.3 Sistema imune de ouriços do mar

Em resposta a pressão exercida por microorganismos patogênicos, houve a necessidade do desenvolvimento do sistema imune ao longo da história. Todos os organismos multicelulares desenvolveram mecanismos adaptativos para lidar com

infecções e proteger-se por meio da destruição dos agentes invasores e seus componentes (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 microrganismo (BOLS *et al.*, 2001). Esses mecanismo baseiam-se em respostas celulares e humorais, divididas em via aferente ou sensitiva, que vai reconhecer as substancias estranhas ao organismo, e a via eferente ou efetora, que por sua vez vai recrutar e ativar células imunes, induzir migração para o foco 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).

O sistema imune inato evoluiu desenvolvendo uma série de estratégias para identificação do próprio/não-próprio, que são baseadas no reconhecimento de padrões moleculares, determinando o que é próprio e não infeccioso, assim como o normal e anormal dentro de seu próprio organismo. Estes padrões são decifrados por receptores que induzem ou inibem uma resposta imunológica, dependendo do significado destes sinais (MEDZHITOV; JANEWAY, 2002). Assim, após o reconhecimento do patógeno, ocorre a ativação de mecanismos que normalmente visam a sua destruição (KURTZ, 2004). A multiplicidade de mecanismos imunológicos pode ser grande dentro de um indivíduo, ou até mesmo dentro das várias classes ou filos. Essa grande variedade de mecanismos faz-se necessária devido a importância da atividade a ser realizada, sendo raro que uma função importante seja desempenhada por um único mecanismo dentro de um indivíduo (PASQUIER, 2001).

Invertebrados apresentam como principal mecanismo endógeno de defesa um eficiente e elaborado sistema imune inato que permite seu estabelecimento com sucesso num ambiente rico em bactérias e outros potenciais patógenos (RARMÍREZ-GOMES; GARCIA-ARRARÁS, 2010). Para isso, os invertebrados possuem um grande repertório de genes responsáveis por codificar uma ampla variedade de isoformas de proteínas que desempenham papeis cruciais nesta resposta, além de mecanismos moleculares que vão controlar esta diversidade de proteínas (SODERGREN *et al.*, 2006 LITMAN *et al.*, 2007).

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). Adicionalmente à imunidade celular e humoral, estudos em ouriços do mar demonstraram que estes são capazes de manter (e talvez reforçar) as funções imunes de acordo com o envelhecimento do animal (MCCAUGHEY;BODNAR, 2012), e que as respostas imunológicas diferem em animais de gêneros diferentes (ARIZZA *et al.*, 2013). Desta forma, estudos que avaliem funções imunes adicionais às já conhecidas, podem trazer novas perspectivas para uma área, até então, pouco conhecida, além de acrescentar informações a estudos já estabelecidos.

Memória específica é uma característica do sistema imunológico adaptativo dos vertebrados, que se baseia em linfócitos e anticorpos, sendo a parte mais estudada do nosso sistema imunológico. A maioria dos patógenos são eliminados por mecanismos inatos, muitas vezes, já antes de o sistema imunológico adaptativo tornase ativo (KURTZ, 2004). Sendo assim, tanto a iniciação das respostas imunes adaptativas, quanto a indução de mecanismos efetores particulares parecem depender dos sinais fornecidos pelo sistema imune inato (MEDZHITOV; JANEWAY, 1998). Estudos indicam que a memória específica pode também existir em sistemas imunológicos inatos, uma vez que diferentes táxons de invertebrados, como baratas, camarões e besouros apresentaram uma resposta melhorada à exposição secundária (LITTLE *et al.*, 2005), porém, os mecanismos são ainda desconhecidos, sendo este fato uma importante evidencia para compreensão dos princípios e evolução da resposta imunológica (KURTZ, 2004).

1.4 Mediadores celulares da resposta imune inata em ouriços do mar

Celomócitos são popularmente conhecidos como as células do sistema imune presentes em equinodermos. Estas por sua vez compreendem uma população heterogênea de células com características morfológicas diferentes para cada tipo, que podem ser encontradas livremente em movimento em toda cavidade celômica (SMITH *et al.*, 2010), além de também ser encontrado no tecido conjuntivo de outros órgãos em equinodermos (PINSINO *et al.*, 2007). No líquido celomático de ouriços

do mar, essas células podem ser diferenciadas quanto à sua morfologia, tamanho, abundância relativa e função, fato que torna a classificação padrão para todos os equinodermos uma tarefa difícil (GARCÍA-ARRARÁS; RAMIREZ-GOMEZ, 2010). De acordo com estas características, as células podem ser divididas em quatro tipos principais, sendo que a composição bem como a quantidade de cada tipo pode variar, de acordo com a espécie e também com as condições fisiopatológicas de cada individuo (SMITH *et al.*, 2010; PINSINO; MATRANGA, 2015).

Dentre os quatro tipos celulares os amebócitos fagocíticos (AF), são os mais abundantes, compondo aproximadamente 40 a 80 % do número total, sendo que estas são células agranulares que emitem projeções citoplasmáticas sob a forma de lamelipódios e filopódios. Seu tamanho varia de 3-20 µm, e possuem capacidade de adesão e espraiamento quando em contato com lâminas de vidro e placas de cultura, e estão envolvidas com a fagocitose, quimiotaxia, rejeição de tecidos enxertados, produção de espécies reativas de oxigênio, aglutinação e coagulação. Adicionalmente as estas funções, os amebócitos sob estímulo imunológico, expressam genes relacionados ao sistema imune (incluindo homólogos do Complemento, uma lectina do tipo C e um homólogo de NFkB), sendo considerados os principais efetores da resposta imune inata em ouriços (GROSS *et al.*, 1999).

Estudos indicam que a população de fagócitos na verdade consiste de tipos celulares diferentes que são diferenciados com base na morfologia e organização do citoesqueleto de actina, padrões de motilidade baseados em actina e expressão diferencial de genes e proteínas (SMITH *et al.*, 2010). Podem ser subdivididos em três tipos: célula discoidal, célula poligonal e pequenos amebócitos. A principal diferença entre os dois primeiros tipos, está diretamente relacionada à organização dos filamentos de actina do citoesqueleto dessas células. Essa diferença no padrão de organização reflete na diferença de capacidade que estas possuem para migrar e realizar suas funções. Além disso, foi observado que a distribuição intracelular 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 suas funções (SMITH et al., 2010).

As células vibráteis (CV) são esféricas e possuem um longo flagelo, que auxilia na movimentação. Seu tamanho pode variar de 6 a 20 µm, e sua distribuição no líquido celomático perivisceral pode variar de 9 a 20 % do total de células, sendo que sua

função permanece pouco elucidada, estando relacionada principalmente às reações de coagulação e na movimentação do líquido celomático (GARCÍA-ARRARÁS; RAMIREZ-GOMEZ, 2010; GROSS *et al.*, 1999; HIBINO *et al.*, 2006; MATRANGA *et al.*, 2005).

Somando aos quatro tipos celulares presentes em ouriços os esferulócitos podem ser divididos em duas populações distintas – esferulócitos incolores e esferulócitos vermelhos – de acordo com a sua coloração. Caracterizados pela presença de grânulos no interior de seu citoplasma, esses grânulos podem conter pigmento ou serem incolores. Seu tamanho pode variar de 8 a 20 µm, e a sua distribuição varia substancialmente entre espécies, de 5 a 10 % (GROSS *et al.*, 1999; GARCÍA-ARRARÁS; RAMIREZ-GOMEZ, 2010). Suas funções permanecem pouco compreendidas na literatura, sendo que para os esferulócitos incolores Arizza e colaboradores (2007) sugerem uma potente atividade citolítica através da liberação de lisinas mediada pela presença de amebócitos fagocíticos. O que demonstrou a necessidade de uma atuação cooperativa para desempenhar sua atividade.

Por outro lado, os esferulócitos vermelhos apresentam atividade bactericida em processos inflamatórios, além de serem encontrados ao redor de lesões e locais de infecções. Sua atividade bactericida, tanto para bactérias gram-positivas, quanto gram-negativas, está relacionada com a presença do pigmento equinocromo (3,5,7,8-pentahidroxi-6-etil-1,4-naftoquinona) nos seus grânulos citoplasmáticos. Além disso, o equinocromo apresenta atividade antioxidante. Levando em consideração estas funções, os esferulócitos vermelhos são considerados mediadores da resposta imune em ouriços (SERVICE; WARDLAW, 1984; GROSS *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 2006; GARCÍA-ARRARÁS; RAMIREZ-GOMEZ, 2010).

Existem diversas descrições sobre a importância dos celomócitos no combate a microorganismos invasores, constituindo parte dos mecanismos de resistência natural 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).

Os celomócitos são os mediadores centrais da resposta imune em ouriços, sendo que alterações nas proporções dos diferentes tipos celulares, assim como atividade fagocítica, alterações na expressão gênica e de proteínas, como as de choque térmico (HSPs) são parâmetros da resposta imune comumente utilizados para avaliação do estado destes animais, já que mudanças antropogênicas podem induzir alterações destas respostas, tornando os indivíduos mais susceptíveis a infecções e indicando um possível estresse ambiental que esteja ocorrendo (MATRANGA *et al.*, 2005; BORGES *et al.* 2010; PINSINO; MATRANGA, 2015).

A injeção de LPS em ouriços Strongylocentrotus purpuratus e posterior análise proteômica, revelou o papel principal do estresse na regulação de células imunes de ouriços do mar, após identificação de 27 proteínas de resposta ao estresse e desintoxicação (DHEILLY et al., 2013). Adicionalmente, um estudo recente em Paracentrotus lividus, demonstrou que após a injeção de LPS, os celomócitos foram capazes de induzir uma resposta ao estresse, aumentando os níveis proteicos e gênicos de proteínas de choque térmico hsp70 e 90, além da proteína beta timosina, um precursor de peptídeos antimicrobianos. Este estudo também mostrou um aumento da concentração de amebócitos fagocíticos e esferulócitos vermelhos após algumas horas de tratamento (CHIARAMONTE et al., 2019). As proteínas de choque térmico são proteínas altamente conservadas, que desempenham um papel importante na resposta às condições de estresse, atuando também para impedir a toxicidade e a morte das células, protegendo células e os tecidos contra danos. Portanto, os níveis proteicos e atividade enzimática podem ser empregados como sinais de estresse ambiental, tanto em campo como em estudos laboratoriais, além da proporção de esferulócitos vermelhos e talvez dos celomócitos totais (SMITH et al. 2010).

1.5 Pigmento dos esferulócitos vermelhos

Em geral, a atividade descrita para os esferulócitos vermelhos está diretamente relacionada à presença do pigmento vermelho, conhecido como equinocromo-A nos seus grânulos. O equinocromo-A foi descrito inicialmente por MacMunn (1885), sendo descrito como um carreador de oxigênio. Em 1912, McClendon questionou a função respiratória do pigmento, pois suas soluções não continham quantidade significativa de ferro e quando submetidas a vácuo, não absorviam quantidade apreciável de oxigênio atmosférico, descartando assim sua função como carreador de oxigênio.

Amostras puras de equinocromo-A, somente foram isoladas a partir de 1934 (BALL, 1934). Em 1939, Hartmann e colaboradores reportaram que o equinocromo-A seria responsável por estimular na ativação e aglutinação do esperma de *Arbacia pustulosa*, porém Tyler (1939), estudando o efeito do equinocromo purificado na

espécie *Strogiloncetrotus purpuratus*, não observou os mesmos resultados, sugerindo que o efeito estimulador de esperma nos experimentos de Hartmann e colaboradores, fosse o complexo formado pelo equinocromo-A e proteínas do extrato de ovos daquela espécie. Sua estrutura molecular foi identificada em 1940 por Kuhn e Wallenfels ((6-etil-2,3,5,7,8-penta-hidroxi-1,4-naftoquinona) Figura 3).

Figura 3. Estrutura quÍmica apresentada para o pigmento vermelho equinocromo-A. Nota-se a presença de várias hidroxilas (OH) associadas ao composto.



Echinochrome A

Posteriormente, foi observado por Johinson (1969) que bactérias gramnegativas estimulavam, no ouriço do mar *S. purpuratus*, a ação quimiotática dos amebócitos fagocíticos para o foco da infecção, com posterior acumulação de esferulócitos vermelhos e consequente liberação do pigmento equinocromo-A por degranulação. Por outro lado, a resposta às bactérias gram-positivas consistia na migração de amebócitos fagocíticos e de células vibráteis. Sua atividade bactericida foi demonstrada no ouriço do mar *Echinus esculentus*, onde verificaram que o equinocromo-A está presente nas células em uma concentração entre 3 e 60 µg e possui ampla atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas na concentração de 50 µg/mL (SERVICE; WARDLAW, 1984). Além de sua atividade bactericida, foi reportado também que este pigmento parece estar relacionando com a eliminação de radicais peróxido em lipossomas, aprisionamento de radicais ânion superóxido e ligação a íons ferrosos, formando complexos inativos em fase aquosa (LEBEDEVE *et al.* 2001). Sendo que dentre todos os pigmentos naftoquinônicos conhecidos em equinodermos, o equinocromo-A é o que apresenta a maior atividade antioxidante (GERASSIMENKO *et al.* 2006).

O Equinocromo-A é um pigmento naftoquinônico polihidroxilado pertencente à classe das quinonas (MARTÍNEZ; BENITO, 2005), que por sua vez envolve um grupo de compostos policetídeos (metabólitos secundários) que apresentam ampla distribuição e atividade biológica (KOLTSOVA *et al.* 1981). Assim, em 1988, as propriedades antioxidantes, antimicrobianas, de estabilizar membranas de eritrócitos e de reduzir o nível de colesterol no sangue já eram conhecidas (LEBEDEV *et al.* 2001). Embora o mecanismo preciso de ação ainda não seja totalmente compreendido, é sugerido que o seu principal alvo é o DNA (EL-NAJJAR *et al.*, 2011). Sua atividade até então descrita gerou um interesse farmacológico, apesar de seu papel não ser totalmente conhecido.

Em 1999, foi desenvolvida na Rússia uma preparação solúvel em água nomeada Histocromo, com o equinocromo-A como princípio ativo. Sendo indicado como antioxidante, medicamento oftálmico e cardioprotetor no caso da doença arterial coronariana e o ataque cardíaco (MISHCHENKO *et al.*, 2003). Ao contrário dos antioxidantes endógenos, (como as naftoquinonas, vitamina E e ubiquinona), o equinocromo é capaz de neutralizar os catalisadores da oxidação de membranas lipídicas, tais como cátions de ferro acumulados na região de dano isquêmico dos tecidos (LEBEDEV *et al.*, 2008), o que pode ser relacionado com sua atividade cardioprotetora e amenizadora da injúria, que é acompanhada na presença de radicais livres oxidativos e sobrecarga de cálcio (LEBEDEV *et al.* 2005). Desde de o desenvolvimento deste fármaco até os dias atuais, o grupo da Professora Mishchenko, vem trabalhando na descoberta de funções biológicas adicionais com relevância direta à saúde humana, incluindo antifibrose, antidiabético, antialérgico, protetor mitocondrial entre outros. Sugerindo que este possui muito mais efeitos biológicos do que o encontrado para o fármaco Histocromo (HOU *et al.*, 2018).

Em ouriços do mar o equinocromo-A pode ser encontrado nos esferulócitos vermelhos que são responsáveis por sua biossíntese e também disperso no líquido celomático, bem como na carapaça, espinhos e outros órgãos (ANDERSON *et al.*, 1969; KUWAHARA *et al.*, 2010).

Smith e Smith (1985), estudando a resposta ao estresse em bolachas do mar *Mellita quinquiesperforata*, observaram que a liberação do equinocromo dos esferulócitos vermelhos é similar à liberação de mediadores indutores de alergia de basófilos e mastócitos em mamíferos, e concluíram que a sensibilização das células, degranulação sem lise celular, liberação de histamina e similaridades das células envolvidas, sugerem uma possível correlação com a resposta alérgica de mamíferos. Coates e colaboradores (2017) demostraram que a degranulação do equinocromo é mediada pelo influxo de cálcio nos esferulócitos vermelhos, e que sua atividade bactericida está diretamente relaciona com a capacidade de quelação de íons ferrosos.

Alterações na proporção dos esferulócitos vermelhos tem sido observadas frente a diferentes tipos de estresse, tais como: lesões no esqueleto calcário e na derme (D`ANDREA-WINSLOW; NOVITSKI, 2008); contaminação do meio por metais, tais como ferro, cobre, zinco e arsênio (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), aumento da temperatura (BRANCO *et al.* 2012; BRANCO *et al.* 2013) e indução por LPS (GONZALES-ARAVENA *et al.* 2015; CHIARAMONTE *et al.*, 2019).

Segundo Matranga e colaboradores (2000), seria interessante conhecer as origens da grande população de esferulócitos vermelhos observada em ocasiões de estresse ambiental induzido experimentalmente em equinodermos, cujos resultados apontam apenas um aumento da proporção dessas células, enquanto número total de células permaneceu estável. No trabalho o grupo sugere que os outros tipos celulares presentes no fluído celomático convertam-se em esferulócitos vermelhos, o que confirmaria a hipótese de que os esferulócitos incolores e vermelhos são o mesmo tipo celular em diferentes momentos fisiológicos. Outra possibilidade levantada pelo grupo é de que as regiões hematopoiéticas estariam liberando os esferulócitos vermelhos. No entanto isso permanece em aberto, uma vez que não se sabe ao certo qual é a região hematopoiética.

A biossíntese do equinocromo-A pelos esferulócitos vermelhos é algo que também está pouco elucidado na literatura, mas parece que este é produzido a partir de moléculas de ácido acético, que são condensadas e modificadas pela enzima Policetídeo sintase (PKs) (CALESTANI *et al.,* 2003 CALESTANI; WESSEL, 2018). Calestani e colaboradores (2003) elucidaram em células pigmentadas de embriões de ouriços do mar que a biossíntese do equinocromo é regulada dentre outras pela expressão da enzima Policetídeo sintase (PKs), uma família multi-domínio ou

complexo de enzimas que sintetizam compostos policetídeos (KHOSLA *et al.*, 1999). Além disso, demonstraram que a enzima sulfotransferase (SULT) também está presente em células pigmentadas, mas não é essencial para a biossíntese do equinocromo, uma vez que, embriões que não expressavam esta enzima apresentavam células pigmentadas. Diferente do encontrado para PKs, onde os embriões assumem um fenótipo albino. A enzima Sult também é conhecida por atuar na desintoxicação de xenobióticos em seres humanos (HOPWOOD, 1997; STAUTON; WEISSMAN, 2001). Adicionalmente, Ageenko e colaboradores (2014), demonstraram que a diferenciação de células pigmentadas ocorre em paralelo com a expressão de genes envolvidos na síntese de naftoquinonas (PKs e SULT) em cultura de células primárias derivadas da blástula de embriões de ouriços.

Apesar dos avanços nos estudos das funções deste pigmento, ainda pouco se sabe sobre suas funções, bem como a função dos esferulócitos vermelhos no que tange às respostas imunes de ouriços do mar.

1.6 Fagocitose

Há mais de 100 anos o biólogo russo Élie Metchnikoff (1854-1916) demostrou o significado biológico da fagocitose. Suas descobertas basearam-se no estudo de aspectos nutricionais e embriológicos de equinodermos, onde observou que algumas células presentes na cavidade celomática e em tecido mesenguimal tinham a capacidade de se movimentar e de internalizar partículas inertes ou mesmo vivas. Após essas observações, 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. Demonstrando assim, o processo de migração de células celomáticas para o foco inflamatório e o seu significado (TAUBER; CHERNYAK, 1997). Desde então, tem sido reconhecido como um componente crítico das respostas imunes inata e adaptativa contra agentes patogênicos. A capacidade de células específicas de englobar e ingerir patógenos externos, bem como, células mortas ou muitos outros tipos de partículas estranhas é um processo fundamental na manutenção da homeostase e na defesa imunológica do organismo (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

38

A fagocitose pode ser definida como o processo pelo qual partículas geralmente maiores que 0,5 µm de diâmetro, são englobadas (MAY; MACHESKY, 2001). 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, além de ser um processo filogeneticamente conservado (FLANNAGAN *et al.*, 2012). Durante esse processo, células especializadas são responsáveis por englobar partículas estranhas ao organismo e transportá-las do meio extracelular para vacúolos intracelulares (fagossomos), onde são então degradadas (HENRICKS *et al.*, 1986).

De maneira geral, para que a fagocitose ocorra tem-se o reconhecimento da partícula por receptores na membra, que induz uma reorganização do citoesqueleto de actina e a emissão de protrusões que evolvem a partícula, internalizando-a juntamente com sua membrana para formar o fagossomo. Diante da formação do fagossomo e da necessidade de degradação da partícula internalizada inicia-se então a fusão com lisossomos, passando a ser reconhecido como fagolisossomo. A partir dessa fusão, acontece a degradação da partícula ingerida (NORDENFELT; TAPPER, 2011). Esse processo pode gerar um quadro inflamatório local ou sistêmico, principalmente devido a citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que podem ser produzidas (UNDERHILL; GOODRIDGE, 2012).

São descritos diversos receptores de membrana envolvidos na fagocitose, dentre os quais, destacam se os receptores do Fc, manose, CDs e integrinas beta 1 (GREENBERG; GRINSTEIN, 2002). Os receptores do sistema complemento incluem: CR1, 2, 3 e 4, que são expressos em células fagocíticas e estão envolvidos na fagocitose (DIAMOND *et al.*, 1993). A eficiência da interação entre os receptores e seus ligantes depende de sua mútua afinidade e de sua densidade na superfície dos fagócitos e das partículas a serem fagocitadas (FLANNAGAN *et al.*, 2012).

O reconhecimento de partículas pelos receptores induz a necessidade de mudanças na membrana da célula. Essas mudanças acontecem na concentração do fosfatidilinositol 4-5 bifosfato, um fosfolipídio de membrana da camada interna, que durante processos de fagocitose tem um aumento transitório nos pseudópodes até que ocorra a internalização da partícula. Portanto, este é essencial para a internalização de partículas (FLANNAGAN *et al.,* 2012).

Dentre as características marcantes da fagocitose temos o rápido acumulo de factina e proteínas acessórias na região perifagossomal. Os rearranjos do citoesqueleto são promovidos pelas Rho GTPases. Dentre estas, Cdc42 estimula a formação de filopódios, estando ativa em fases iniciais da fagocitose; Rac1, induz a formação de lamelipódios e está ativa em todo fagossomo e RhoA que provavelmente está envolvida na formação do fagossomo (FLANNAGAN *et al.*, 2012). O papel central das Rho GTPases na fagocitose fornece uma explicação parcial do por que eles são substratos tão comuns para toxinas e efetores bacterianos (ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002).

A capacidade destrutiva impressionante desempenhada pelo fagolisossomo é atribuída à atividade combinada de vários efetores, incluindo enzimas hidrolíticas, oxidantes e peptídeos catiônicos (FLANNAGAN *et al.*, 2012). Além disso, geralmente tem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e em alguns tipos celulares, como neutrófilos em mamíferos, tem a liberação de peptídeos antimicrobianos que contribuem, juntamente com os outros efetores para a morte e degradação do microrganismo fagocitado (SWANSON, 2008).

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. Sendo que este importante mecanismo de defesa é efetivamente realizado por uma subpopulação dos celomócitos, os amebócitos fagocíticos, que são responsáveis por reconhecer, fagocitar e degradar partículas estranhas ao organismo (GROSS *et al.,* 1999, MATRANGA *et al.,* 2005). As primeiras observações de fagocitose por celomócitos de equinodermos foram realizadas em estrelas do mar *Asteria rubens*, após injeção de tinta da china, as células fagocitando foram encontradas em diferentes partes do corpo (SMITH, 1981).

A capacidade de células realizarem fagocitose pode ser investigada por meio da avaliação da capacidade fagocítica, que leva em conta a proporção de fagócitos que estão realizando fagocitose dentro de uma população de fagócitos (GAGNAIRE *et al.,* 2006; SILVA; PECK, 2000). Diferentes metodologias podem ser empregadas para este tipo de análise, que vão desde métodos mais convencionais, utilizando microscopia de fase (PIPE *et al.,* 1999; SILVA; PECK, 2000), até os mais sofisticados, que usam microscopia de fluorescência e citometria de fluxo com análises de partículas fluorescentes (COTEUR *et al.,* 2003; CHIA; XING, 1996).
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar e purificar o pigmento presente nos esferulócitos vermelhos do ouriço do mar antártico *Sterechinus neumayeri*. Verificar a atividade deste pigmento no sistema imune inato, correlacionando sua função com o papel dos esferulócitos vermelhos.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar inicialmente os pigmentos presentes em *S. neumayeri*, através da análise de extratos das células e carapaça/espinhos.
- II. Extrair e purificar o pigmento presente nos esferulócitos vermelhos de S. neumayeri.
- III. Expor os celomócitos de S. neumayeri in vitro a diferentes concentrações do pigmento purificado (50 e 100 µg/mL) por 1, 6 e 24 horas.
- IV. Avaliar os efeitos da exposição ao pigmento na viabilidade dos celomócitos.
- V. Identificar os efeitos da exposição ao pigmento na atividade fagocítica dos amebócitos fagocíticos de *S. neumayeri*.
- VI. Avaliar os efeitos da exposição ao pigmento no citoesqueleto de actina e na morfologia dos amebócitos fagocíticos de *S. neumayeri*.
- VII. Identificar os efeitos da exposição ao pigmento na modulação de genes relacionados à biossíntese de pigmentos – Policetídeo Sintase (PKs), Sulfotransferase (SULT) – antioxidante – Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Metalotioneínas (MT) – e estresse – Proteína de choque térmico (Hsp70).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Colheita dos animais

Exemplares adultos do ouriço do mar antártico Sterechinus neumayeri (Meissner, 1900) ((n=40) figura 4), foram coletados sem distinção de gênero, com o auxílio de uma rede de arrasto (malha de nylon com espaçamento de 1 cm² e abertura da boca de 2 m) a uma profundidade de 3 – 10 metros (figura 5). As coletas foram realizadas nas proximidades da Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz, baía do Almirantado, ilha do Rei George, arguipélago das Shetland do Sul (62° 09.568 058° 26.959') e na Estação Antártica Chilena, Profesor Julio Escudero, baía de Maxwell, ilha do Rei George, arquipélago das Shetland do Sul (62 ° 12' 12.2"s 58° 56' 41.7"w), durante os meses de janeiro/fevereiro de 2015, fevereiro de 2017, fevereiro de 2018 e novembro de 2018 (figura 6), todos dentro do verão antártico por meio do PROANTAR (Programa Antártico Brasileiro). Após passagem da rede, os animais coletados foram imediatamente transferidos para caixas plásticas no bote de apoio. contendo água marinha coletada igualmente das proximidades do ponto de coleta dos animais. O bote foi então conduzido até a praia e as caixas com os animais foram imediatamente transportadas até os tangues de manutenção na estação brasileira ou para a câmara fria da estação chilena, situados a aproximadamente 150 metros da praia.



Fonte: arquivo pessoal.

Durante o estudo, foram realizadas quatro coletas, sendo que na primeira, os animais foram empregados para extração e purificação do pigmento, realizadas no laboratório de Histofisiologia Evolutiva no Instituto de Ciências biomédicas e no laboratório de Bioquímica e Biofísica no Instituto Butantan. A partir da segunda coleta, os animais foram empregados para a realização dos ensaios biológicos *in vitro*, bem como para obtenção de mais pigmento.



Figura 5 - Arrasto com a rede e triagem manual dos animais colhidos.

Fonte: arquivo pessoal.

Figura 6 - Mapa da região de coleta dos animais. Ponto vermelho representa a região da estão Chilena e ponto preto a região da estação brasileira. Fonte: Google mapas.



Fonte: Google mapas.

3.2 Manutenção dos animais

Após coleta, os ouriços do mar foram mantidos em caixas plásticas com capacidade para 200 litros de água do mar, juntamente com algas marinhas coletadas durante os arrastos. Para manutenção dos animais foram realizadas trocas de água do mar (50%) diariamente com água do mar nova, coletada em regiões mais afastadas das estações.

A temperatura e a salinidade foram monitoradas diariamente e mantidas a 0,0 \pm 0,5 °C e 34 \pm 1 ‰ respectivamente. Para facilitar o monitoramento da temperatura foram utilizados termostatos de máxima e mínima (Full Gauge[®] MT-530 super), com variação máxima de 0,5 \pm °C. A temperatura ambiente do local de manutenção e experimentação dos animais foi mantida a 0,0 \pm 0,5 °C, afim de garantir que a água e os animais não sofressem alterações térmicas expressivas. As caixas plásticas foram mantidas com bomba submersa para circulação e arejamento da água, Sarlo Better S250 (250L/hora – Motobomba®,) e arejadores conectados a pedra porosa, 24 horas por dia.

Todos os animais, após coleta, foram aclimatados por um período de pelo menos 5 dias antes do início dos experimentos, minimizando assim o possível estresse causado pela coleta e transporte. Além da aclimatação, foi estabelecido um fotoperíodo natural.

3.3 Obtenção e classificação dos celomócitos

O líquido celomático perivisceral contendo os diferentes celomócitos de *S. neumayeri* foi obtido com o auxílio de seringas de 1 mL, com agulha de 13x3,3, via membrana peristomial de acordo com (Plytycs e Seljelid 1993). Para evitar que o sistema digestório ou as gônadas fossem perfuradas, a agulha foi inserida de maneira transversalmente oposta a lanterna de Aristóteles.

Após obtenção dos celomócitos, uma pequena alíquota foi submetida à classificação dos diferentes tipos celulares, sendo então depositada sobre lâminas de vidro, cobertas por lamínulas e observadas em fotomicroscópio de contraste de fase (Axio Scope. A1 com epi-fluorescência de LED, Carl Zeiss, German).

A classificação dos diferentes celomócitos foi realizada seguindo características próprias de cada tipo celular com o auxílio da literatura existente para ouriços do mar (CHIA;XING,1996; BORGES et al., 2005; Smith et al., 2006). Desta forma, as células foram subdivididas em quatro tipos: Amebócitos Fagocíticos células com vasto citoplasma translúcido, com capacidade de adesão e espraiamento, apresentando ainda, filopódios e lamelipódios; Células Vibráteis – pequenas células esféricas, dotadas de um único flagelo responsável por contínuos movimentos circulares; Esferulócitos Vermelhos - células esféricas com movimento ameboide e presença de grânulos intracitoplasmáticos vermelhos; Esferulócitos Incolores células esféricas com movimento ameboide е presenca de grânulos intracitoplasmáticos incolores.

3.4 Contagem total e relativa de celomócitos

As contagens total e relativa dos celomócitos de *S. neumayeri* foram realizadas em câmara de contagem celular do tipo Neubauer, onde alíquotas do líquido

celomático foram adicionadas e posteriormente foram realizadas contagens, levando em conta cada tipo celular presente nos quatro quadrantes externos da câmara em fotomicroscópio de contraste de fase (Axio Scope. A1 com epi-fluorescência de LED, Carl Zeiss, German).

Para a contagem total, o número de células contadas nos quatro quadrantes foi dividido por 4 e multiplicado por 10⁴, obtendo-se assim, o número total de células por mL de líquido celomático. Quando necessário, as células foram diluídas e o fator de diluição foi levado em conta para o cálculo. Já para a contagem relativa de cada tipo celular, a quantidade de cada tipo contado foi então multiplicada por 100, obtendo-se desta forma, a proporção de cada tipo celular presente.

3.5 Extração de pigmentos

Para a avaliação inicial dos pigmentos presentes no ouriço do mar *S. neumayeri*, foram realizadas extrações de pigmentos presentes tanto nos celomócitos, denominada de fração celular, quanto na carapaça e espinhos, denominada de fração carapaça/espinho.

Com o intuído de se obter um extrato bruto contendo os pigmentos para cada fração, foi utilizado o método de acordo com Kuwahara e colaboradores (2009), com algumas modificações. Inicialmente, o fluido celômico total foi coletado por meio de um corte na membrana peristomial de cada ouriço do mar e vertido em Becker. A suspensão de células foi então centrifugada a 1000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente e então foi adicionado 5 mL de HCL (6M) ao pellet de células para lise e extração do pigmento. Para extração de pigmentos da carapaça/espinhos, estes foram lavados e secos no escuro após retirada do líguido celomático, e então 5 gramas foram submetidas a extração adicionando-se 10 mL de HCI (6M). Após obtenção dos pigmentos em suspensão por meio da adição do HCI, os mesmos foram extraídos adicionando-se três vezes o volume inicial com éter etílico, formando uma segunda fase (etérea) e agitando-se vigorosamente para passagem dos pigmentos para a fase etérea. Posteriormente, a camada etérea contendo os pigmentos foi lavada três vezes com solução salina (5% NaCl) para total remoção do HCl e seca sob pressão reduzida. Os extratos contendo os pigmentos foram ressuspendidos em etanol absoluto (figura 7) e submetidos a subsequente extração em fase sólida ou armazenados a -20,0 °C no escuro.

Figura 7 - Pigmento extraído de celomócitos de *S. neumayeri* em etanol absoluto.



Fonte: arquivo pessoal. Falcon 50 mL.

Após a extração inicial, a solução de pigmento em etanol absoluto foi submetida à extração de fase sólida (SPE), em cartuchos C18 (Strata ®, 55 µm, 70Å, 5 g/20 ml, Phenomenex Inc., Torrance, CA, EUA), que foi realizado em quatro etapas (Figura X): 1º. Condicionamento do cartucho com metanol para recebimento da amostra; 2º. Aplicação da amostra e retenção da amostra na coluna; 3º. Remoção de impurezas interferentes; 4º. Eluição da amostra pré-purificada (figura 8). Este processo foi realizado por pressão negativa com o auxílio de uma bomba de vácuo em Manifold (Visiprep[™] SPE Vacuum Manifold Sigma-Aldrich). Subsequentemente, a solução de pigmento foi submetida à purificação por cromatografia líquida de alta performance de fase inversa (RP-HPLC) e análise de espectrometria de massas com base no método descrito por Kuwahara e colaboradores (2010).



Figura 8 - Esquema representativo da extração em fase sólida com coluna SPE.

(retirado de Jardim, Isabel 2010).

3.6 Purificação do pigmento por RP-HPLC

As frações de pigmentos extraídas foram purificados por RP-HPLC, utilizando um sistema de HPLC (20 Å Prominence, Shimadzu co., Kyoto, Japão). Alíquotas das amostras foram carregadas em uma coluna C18 (ACE® C18, 5 µm, 100Å, 250 mm × 4,6 mm, Phenomenex Inc., EUA), com dois solventes: A = ácido trifluoroacético (TFA) / água (1:1000) e B = TFA/Acetonitrila/água (1:900:100). O pigmento foi eluído a uma taxa de vazão constante de 1 mL min⁻¹ a 38,0 °C, com um gradiente 0-100% de solvente B em 20 min após uma eluição de 5 minutos isocrático com 0% B. O conteúdo eluído da coluna foi monitorado por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA, na faixa de 200 a 500 nm e o pico de interesse foi coletado manualmente. Posteriormente o pigmento obtido da purificação foi seco por liofilização, quantificado pelo peso e armazenado em -20,0 °C até o uso ou submetido à análise de espectrometria de massas.

3.7 Análise por espectrometria de massas

Todas as etapas de purificação, bem como as análises por espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biofísica, do Instituto Butantan sob supervisão do Prof^o Dr. Daniel Carvalho Pimenta.

Após a purificação por HPLC, o pigmento eluído foi analisado por espectrometria de massas em um espectrômetro de massa ESI-IT-TOF (Shimadzu co., Kyoto, Japão), em modo de ionização positivo e negativo. A amostra foi diluída em um metanol de 50% e introduzida manualmente no espectrômetro através de um injetor Rheodyne 7010, ou diretamente analisada por meio de um sistema de HPLC acoplado ao espectrômetro de massas. A voltagem utilizada da interface foi de 4,5 kV e a voltagem do detector, 1,8 kV, com temperatura de 200,0 °C. Os espectros de massa foram coletados na faixa de 100 – 2000 m/z (relação entre massa/carga), e a aquisição de dados foi pelo software LCSolutions (Shimadzu co., Kyoto, Japão).

3.8 Exposição in vitro dos celomócitos ao pigmento

Celomócitos de pelo menos três ouriços do mar *S. neumayeri* foram coletados (ver 2.3) em solução de anticoagulante ISO-EDTA (1:1) de acordo com Matranga e colaboradores (2000), e imediatamente após coleta, as células foram centrifugadas a 800 X g por 5 minutos a 0,0 °C. O pellet de células foi então ressuspendido em aproximadamente 15mL de água do mar filtrada a 0,22 µm (FSW). A suspensão celular foi mantida em gelo e a concentração de exposição ajustada para 10⁶ células por mL.

Previamente a exposição dos celomócitos, o pigmento extraído da fração celular de *S. neumayeri* foi ressuspendido em *FSW* a 0,22 µm e adicionado a placas de cultura de 24 poços, juntamente com as células (10^6 célula/mL) em duas concentrações diferentes, sendo uma de 50 µg/mL e a outra de 100 µg/mL por um período de exposição de 1, 6 e 24 horas a 0,0 °C. As concentrações de pigmento foram determinadas de acordo com estudos prévios de Service & Wardlaw (1984), onde demonstram a atividade bactericida do equinocromo-A a 50 µg/mL, e a concentração de pigmento por célula em torno de 3 a 60 µg. Sendo assim, os valores

aqui estabelecidos encontram-se dentro dos valores encontrados por célula e extrapolados ao de sua atividade bactericida.

Cada exposição foi realizada em triplicata e os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes, sendo essa uma replicata biológica. As células sem adição das diferentes concentrações do pigmento foram usadas como grupo controle para a exposição ao pigmento em todos os tempos analisados. Ao final de cada período de exposição, as triplicatas dos celomócitos empregados para a análise de expressão gênica foram armazenados em RNAlater[™] (Thermo Fisher®), congelados e transportados até o laboratório de Histofisiologia Evolutiva, onde foram realizadas as análises.

3.9 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pela técnica de exclusão com Azul de Tripan (0,4%) de acordo com o protocolo de Freshney (1987). Uma vez que se trata de uma corante vital, ele não apresenta interação com a membrana de células viáveis. Desta forma, as células que apresentaram exclusão pelo corante foram consideradas viáveis.

Alíquotas de líquido celomático foram adicionadas no mesmo volume de uma solução do corante a 0,4 % e após 5 minutos foram colocadas em câmara de Neubauer, onde foi realizada a contagem de células viáveis e não viáveis nos quatro quadrantes externos. A porcentagem de células vivas foi obtida por meio do número de células viáveis dividido pelo número total de células contadas.

Esse ensaio foi realizado a fim de avaliar se o aumento da concentração de pigmento *per se* seria capaz de afetar a viabilidade dos celomócitos de *S. neumayeri*.

3.10 Avaliação da atividade fagocítica in vitro

Para avaliar a atividade fagocítica dos amebócitos fagocíticos, foram utilizadas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, por serem microrganismos capazes de induzir uma resposta imune, serem de fácil obtenção e manipulação, além de serem organismos não patogênicos, evitando assim, possíveis contaminações em caso de acidentes. As leveduras foram previamente diluídas em FSW e a proporção de

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

Decorrido o tempo de incubação das células com o pigmento, 10⁵ amebócitos fagocíticos foram adicionados (triplicata) em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de vidro (15 mm) por um período de 1 hora a 0,0 °C, para adesão e espraiamento das células. Transcorrido este período, foi adicionado uma alíquota da suspensão de leveduras *S. cerevisiae* na proporção de 10 leveduras para cada amebócito fagocítico.

A atividade fagocítica foi avaliada após incubação das células com as leveduras por uma hora. Decorrido este período, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído salino (4% pH 7,4), e as lamínulas lavadas com FSW para retirada das leveduras não fagocitadas, e então as células foram submetidas a coloração de Rosenfeld (Rosenfeld 1947) e analisadas sob microscopia de luz no fotomicroscópio de contraste de fase (Axio Scope. A1 com epi-fluorescência de LED, Carl Zeiss, German).

Para a obtenção da proporção de células que estavam fagocitando, um total de 100 células de cada triplicata foram contadas, levando em consideração células que realizaram ou não fagocitose.

3.11 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

3.11.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total dos celomócitos foi realizada com o kit PureLink®, RNA Mini Kit, seguindo as respectivas instruções do fabricante (ambion[®] Life technologies). As células utilizadas para extração de RNA total foram incubadas com as diferentes concentrações do pigmento e armazenadas em RNAlater. Posteriormente, no laboratório de Histofisiologia Evolutiva, o RNAlater foi removido e o pellet de células foi então submetido a extração de RNA total.

A concentração de RNA total foi determinada por leitura espectrofotométrica no equipamento EPOCH a 260 e 280 nm. A pureza das amostras foi avaliada por meio da razão 260/280, sendo que as amostras que apresentaram valores abaixo de 1,8 e acima de 2,0 foram refeitas. Para avaliar a integridade dos RNAs resultantes da

extração, realizou-se corrida eletroforética em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador.

3.11.2 Síntese de DNA complementar

O cDNA foi sintetizado por meio da transcrição reversa dos RNAs totais dos celomócitos com M-MLV transcriptase reversa. Para tanto, utilizou-se 1 μ g de RNA total de interesse, 4 μ l RTbuffer 5X, 2 μ l de Dithiothreitol (DTT; 100 nM), 1 μ l de oligodT (500 μ g/mL), 1 μ l de inibidor de ribonucleases (20 U/ μ l), 1 μ l de mix de dNTP (10 mM), 1 μ l de transcriptase reversa M-MLV (200U) e H₂O ultrapura. O RNA total foi incubado com oligodT + dNTPs em volume final de 12 μ l a 65,0 °C por 5 minutos. A seguir, foi mantido em gelo e adicionado o RT buffer, DTT, inibidor de ribonucleases e o M-MLV, seguido por incubação a 37,0 °C por 50 minutos, 70,0 °C por 15 minutos e mantido a 4,0 °C.

3.11.3 Desenho dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram desenhados com base em sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) para os genes alvos determinados. Para o desenho dos oligonucleotídeos, utilizamos o programa AmplifX V 1.7.0. Os oligonucleotídeos cuja sequencias não estão depositadas no GenBank, as sequencias foram cedidos pelo Profº Dr. Marcelos Gonzalez Aravena do Instituto Antártico Chileno, onde realizei estágio durante meu doutoramento por um período de três meses. Para garantir que os oligonucleotídeos utilizados fossem reconhecidos em ouriços, utilizamos ferramenta Primer Blast а (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para cada par de oligo, onde todos reconheceram com 98% de similaridade algum gene depositado no GenBank para ouriços do mar, principalmente da espécie Strongylocentrotus purpuratus (primeira espécie de ouriço sequenciada). As sequências dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho são apresentadas na tabela 1.

Gene		Sequencia (5'-3')	Amplicon	
Pks	Fw	GAAGTTGGGTGCCACTATTG	185 pb	
	Rv	TAGCGTTGGAATCGGTGATG		
SULT	Fw	TCCTGGTTTGAAAACGTCCT	285 pb	
	Rv	AGTCGCCAACCTCTCCTTT		
SOD	Fw	GAGGCATGTAGGTGATCTCG	82 pb	
	Rv	GGAGATGACCGTGTCTGTGA		
CAT	Fw	CGGCTACCGTCACATGAAC	050 - 6	
	Rv	CTTGTCTGCCTGCTCCTG	252 pb	
МТ	Fw	CACCATGCCTGATGTCAAGT	200 <i>I</i>	
	Rv	TGTCTGCTTGGAGCATGTTG	290 pb	
Hsp70	Fw	ACAAGAGGGCAGTCAGGAGA	040 4	
	Rv	TTTGCCCAACTTGGAGTCAC	218 pb	
18S	Fw	GAGCCTGCGCTTAATTTGAC	186 pb	
	Rv	GGCGCAACTATTTAGCAAGC		

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados. As colunas correspondem ao gene alvo, sequencias e tamanho do amplicon dos oligonucleotídeos.

3.11.4 <u>RT-PCR</u>

Para a reação de RT-PCR com os produtos da transcrição reversa foram utilizados os reagentes da Platinum TAQ DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific), seguindo especificações técnicas do fabricante. A reação foi preparada com 200 nM de cada dNTP; 1,5 mM de MgCl₂; 2,5 μ l do PCR Buffer 10X; 200 nM de DNTPs; 1 μ l de amostra (normalmente 5 ng); 0,2 μ l da Platinum TAQ DNA polimerase, H₂O ultrapura suficiente para completar 25 μ l de volume de reação. Após o desenho e recebimento dos diferentes oligonucleotídeos, estes foram submetidos a uma

padronização da temperatura, onde foi testada a temperatura de anelamento de cada par de oligonucleotídeos através de testes RT-PCR com diferentes temperaturas.

As etapas de ciclagem do termociclador foram nas seguintes condições: 1°: 95,0 °C por 1 minuto para desnaturação; 2°: a temperatura de anelamento específica de cada oligonucleotídeo; 3°: 72,0 °C por 1 minuto para extensão. Todas as reações ocorreram em 40 ciclos e ao final foram mantidos a 4,0 °C.

Posteriormente, para analisar o resultado da reação, realizou-se corrida eletroforética em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador, levando em conta a presença de bandas únicas no gel, bem como o tamanho do amplicon gerado, sendo este igual ao desenhado para os oligonucleotídeos.

3.11.5 gRT-PCR - PCR quantitativo em tempo real

Para a quantificação do produto resultante da reação de PCR em tempo real, foi utilizado o reagente Fast SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific). As reações foram realizadas em um volume final de 10 µl, sendo 5 µl do reagente SYBR Green, e os 5 µl restantes utilizados para oligonucleotídeos específicos nas concentrações de uso (250 mM, previamente padronizado) e 5 ng do cDNA de interesse. As reações foram realizadas no equipamento Quantstudio 12K real time Systems (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) nas seguintes condições: 95,0 °C por 20 segundos (ativação), 40 ciclos de 95,0 °C por 3 segundos (desnaturação) e 60,0 °C por 30 segundos (anelamento e extensão). Os controles negativos das reações foram feitos substituindo o cDNA por água Milli-Q autoclavada ou água ultrapura. Os genes de interesse foram avaliados em duplicata para cada um e repetidos por três vezes em dias diferentes, sendo que o gene endógeno (18S) foi avaliado em todas as placas.

Para avaliação da especificidade de cada reação, após o término da corrida foram analisadas a curva de dissociação do produto amplificado, que foi gerado em uma escala crescente de temperatura. Posteriormente, o resultado obtido na curva de amplificação foi analisado, quanto ao inicio e término da linha base e também quanto a altura (estando sempre dentro da região exponencial da curva) da linha do CT (Cycle Threshold), sendo que esta última teve um valor fixado para cada gene e o mesmo foi mantido para todas as placas analisadas. O valor de CT expresso pela curva de amplificação corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência do reagente SYBR Green, associado ao produto de amplificação, atinja uma linha limite. Por fim, a comparação entre CTs correlaciona-se com a expressão gênica através do número de ciclos necessários para que diferentes genes atinjam o mesmo ponto de fluorescência.

3.11.6 Padronização dos oligonucleotídeos para q-RT-PCR

Para avaliar a melhor concentração de oligonucleotídeos para utilização no presente trabalho, todos os oligonucleotídeos foram testados por qRT-PCR na concentrações de 250, 500 e 1000 nM, assegurando assim sua especificidade. Sendo assim, foram realizados testes com 5 ng de cDNA e os resultados foram comparados por meio da observação de variações no CT e alterações na curva de dissociação entre cada concentração. A concentração escolhida foi de 250 nM, uma vez que esta não apresentou dímeros que pudessem comprometer a curva de amplificação.

Uma vez que se trata de uma quantificação relativa de expressão, foi calculada a eficiência de amplificação de cada oligonucleotídeo. Para tanto, foi realizada uma diluição seriada de um pool de cDNA das amostras (25; 12,5, 6,25; 3,12 e 1,56 ng), seguido por uma reação de qRT-PCR em triplicata para cada concentração de amostra. Os valores médios de CTs obtidos foram plotados numa curva padrão para cada oligonucleotídeo em função do logaritmo das concentrações de cDNA. A partir da curva padrão de cDNA temos a regressão linear de uma reta e um valor de coeficiente angular que foi utilizado para o calcular a eficiência de amplificação (figura 9).

Figura 9 - Exemplo de padronização dos oligonucleotídeos por qRT-PCR. A: Curva de dissociação indicando especificidade e ausência de dímeros, seguido da curva de amplificação da reação para PKs. B: Linha de tendência, Slope e cálculo da eficiência a partir da curva de cDNA. O gráfico representa a distribuição das concentrações de cDNA e do Cts obtidos.



A eficiência de amplificação aceitável, encontra-se entre 1,8 e 2,1, sendo que 2 representaria 100% de eficiência (Rasmussen, 2001). Sendo assim, aceitou-se valores entre 90 e 110% de eficiência.

3.11.7 Análise diferencial da expressão gênica

Após análise de toda a padronização, a expressão gênica dos diferentes alvos foi realizada com o cDNA de interesse (como descrito anteriormente). Os dados foram submetidas à análise de expressão gênica diferencial, realizado conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001) na seguintes fórmulas: 1° - Δ CT = $^{CT}_{alvo} - ^{CT}_{endógeno}$; 2° - $\Delta\Delta$ CT = $^{\Delta CT}_{tratado} - ^{\Delta CT}_{controle}$; 3° - Expressão diferencial = 2 - $^{\Delta\Delta CT}$.

3.12 Análise da morfologia celular e do citoesqueleto de actina

As análises morfológicas e do citoesqueleto foram realizadas apenas no grupo de 1 hora de exposição às diferentes concentrações do pigmento, uma vez que este período foi o único a apresentar diferenças estatisticamente significantes em relação aos seus controles nos ensaios realizados.

Decorrido o período de exposição das células às diferentes concentrações de pigmento (50 e 100 µg/mL), 10⁵ amebócitos fagocíticos foram plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro circular por um período de uma hora para adesão e espraiamento das células e posteriormente forma fixadas em paraformaldeído salino (4%, pH 7,4) por 20 minutos em temperatura ambiente. Após fixação, as células foram lavadas três vezes com FSW por 5 minutos, permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 (sigma) em PBS (pH 7,2) por três vezes durante 5 minutos e lavadas uma vez com FSW por 5 minutos.

Para a coloração dos filamentos de actina, as células foram incubadas com faloidina (1/100) Alexa Fluor® 594 (Invitrogen[™]), a 4,0 °C overnight e posteriormente lavadas três vezes com FSW para retirar o excesso de faloidina e evitar ruídos durante a análise da fluorescência. Ao final da coloração com faloidina, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com meio de montagem contendo corante fluorescente DAPI (Vectashield - Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) para corar o DNA e mantidas a 4,0 °C até posterior análise de fluorescência.

3.12.1 Análises de fluorescência

Após realização das marcações com faloidina e DAPI (sessão 3.12) as células foram submetidas à análise da fluorescência no microscópio de fluorescência AxioVert.A1 (Carl Zeiss, German) do Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP-USP).

A aquisição das imagens foi realizada com aumento de 63x com óleo de imersão, utilizando os filtros para DAPI e Rhodamine. Para garantir que todas as imagens fossem adquiridas com o mesmo tempo de exposição nos diferentes filtros e que estas não apresentassem uma intensidade de fluorescência que ultrapassasse o limite de detecção nos diferentes grupos, os tempos de exposição da fluorescência foram determinados para os grupos expostos ao pigmento (faloidina 500 e DAPI 300)

e posteriormente todas as imagens adquiridas para todos os grupos e suas respectivas triplicatas.

Todas as imagens foram submetidas à analise de fluorescência utilizando o programa Image J software Inc. ®, onde um total de trinta células de cada réplica, que apresentavam delimitações de suas membranas bem definidas, foram circuladas individualmente, utilizando a ferramenta de seleção livre e em seguida mensuradas a intensidade de fluorescência, juntamente com a área total selecionada. Além da fluorescência da área da célula, foi selecionada e obtida a fluorescência de uma área da foto que não apresentasse células, a fim de se obter os valores de background para cada célula mesurada. Posteriormente esses valores foram utilizados para a análise da fluorescência total corrigida das células (CTCF).

Para calcular o valor de fluorescência total corrigido das células, o valor da intensidade de fluorescência, obtido de cada célula, foi subtraído do valor de área utilizado para calcular a fluorescência e multiplicado pelo valor da fluorescência obtida do background para cada célula.

3.12.2 Mensuração da área da célula espraiada

O cálculo da área de espraiamento da célula foi feito com base nas imagens e área utilizada para obtenção da fluorescência total de cada célula (sessão 3.12.1). Para avaliação da área de espraiamento dos amebócitos fagocíticos, foram analisadas um total de 30 células por replica de cada grupo exposto a 50 e 100 µg/mL de pigmento por um período de 1 hora de exposição (figura 10). O resultado foi apresentado como a média, mais o valor máximo e mínimo do total de células mensuradas (µm²).

Figura 10 - Exemplo de mensuração realizada para obtenção da fluorescência total corrigida das células (CTCF) e área de espraiamento (µm²). A: imagem de amebócito fagocítico marcado com faloidina (Alexa Fluor® 594) e DAPI. B: imagem representando a mensuração realizada na imagem da célula marca com faloidina.



3.13 Análise Estatística

Todos os dados apresentados neste trabalho foram plotados e analisados com auxílio do programa GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Sotfware, San Diego, Califórnia, USA). Parâmetros estatísticos descritivos (média, desvio padrão, erro padrão, valor máximo e mínimo) foram calculados para verificar a dispersão de dados e a tendência central. Os valores expressam a média aritmética ± desvio padrão ou valor máximo e mínimo. Para os dados com duas variáveis (tempo x tratamento), foram realizados testes com a ANOVA de duas vias (Two-way-ANOVA), seguido de pós teste de Tukey. Quando a interação não foi estatisticamente significativa, a ANOVA de uma via (One-way-ANOVA) foi aplicada para avaliar os diferentes tratamentos com relação ao controle, seguido de pós teste de Tukey para identificar as diferenças. Para os dados com uma variável (tratamento), foram aplicados testes não paramétricos, uma vez que estes não apresentaram uma curva padrão na análise por histograma. Sendo assim, estes foram submetidos à análise pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós teste de Dunn's. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando p<0,05.

4 RESULTADOS

A seguir relatamos os resultados obtidos no presente trabalho, organizados de maneira a melhor representar nossos achados.

4.1 Contagem total e diferencial dos celomócitos

Diante de perturbações ambientais temos em ouriços do mar um biomarcador bastante utilizado como ferramenta para avaliação destas em função de suas características peculiares. A contagem total e diferencial dos diferentes tipos celulares se mostra como uma excelente ferramenta que reflete o estado no qual estes organismos se encontram.

Figura 11 – Fotomicrografia de celomócitos a fresco do ouriço do mar *Sterechinus neumayeri* em contraste de fase.



Quatro tipos celulares descrito para a espécie *Sterechinus* neumayeri, sob microscopia de contraste interferencial de fase (barra de escala = $10 \mu m$). Amebócito fagocítico (AF), seta azul; Célula vibrátil (CV), seta preta; Esferulócito incolor (EI), seta branca e Esferulócito vermelho (EV), seta vermelha.

No presente trabalho foi possível identificar quatro tipos celulares (figura 11), sendo estes: Amebócitos fagocíticos (AF), células grandes dotadas de movimento ameboide e as únicas capazes de realizar fagocitose. Dentre os quatro tipos celulares encontrados, estas foram as mais abundantes presentes no líquido celomático do ouriço do mar Sterechinus neumayeri ((AF) 72,1 \pm 7,9), seguido pelas Células vibráteis ((CV) 11.9 ± 3.9), células esféricas com um longo flagelo, dotadas de movimento. Posteriormente temos os Esferulócitos incolores ((EI) 10,0 ± 4,6) e Esferulócitos \pm 2,6), células grandes, esféricas com grânulos vermelhos ((EV) 6,1 intracitoplasmáticas, que possuem movimento ameboide. Os grânulos dos esferulócitos vermelhos possuem pigmentação de cor laranja-avermelhado, o que dá nome à célula. Os quatro tipos celulares identificados foram observados em todos os animais utilizados para os ensaios, tanto de extração dos pigmentos, quanto in vivo. Ademais, não foram observadas alterações nas proporções dos tipos celulares dos animas utilizados para os ensaios in vivo, sugerindo que estes não se encontravam sob algum tipo de estresse (Tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação do número total e relativo dos diferentes tipos celulares emSterechinus neumayeri (N=6)

Nome	AF	EV	EI	CV	Total
Média	1,65E+06	1,34E+05	2,09E+05	2,56E+05	2,24E+06
DP.	5,85E+05	4,91E+04	6,24E+04	6,04E+04	6,05E+05
Média (%) / DP.	72,1 ± 7,9	6,1 ± 2,6	10,0 ± 4,6	11,9 ± 3,9	100

Os números representam a média da contagem total e diferencial por mL de 6 indivíduos seguidos pela proporção de cada tipo celular. DP: desvio padrão; AF: amebócito fagocítico; EV: esferulócito vermelho; EI: esferulócito incolor; CV: célula vibrátil.

4.2 Extração e purificação dos pigmentos

O líquido celomático do ouriço do mar Sterechinus neumayeri se mostrou como uma excelente fonte para a obtenção de pigmentos. O método empregado na

obtenção destes pigmentos se mostrou eficaz e resultou em um extrato vermelhoalaranjado, cor característica dos pigmentos naftoquinônicos polihidroxilados.

A fração dos pigmentos obtidas das células e carapaças/espinhos foram submetidas a purificação por RP-HPLC em fase reversa e apresentaram perfil cromatográfico distintos para as frações (figura 12 A e B), sendo que a fração celular a que apresentou uma maior quantidade de picos retidos em diferentes tempos no comprimento de onda de 214 nm. Já a fração de carapaça/espinho apresentou uma menor quantidade de picos, porém, alguns com maior intensidade e por vezes picos não únicos.

Figura 12 - Cromatograma da separação inicial das frações celulares e de carapaça/espinho, por RP-HPLC, usando uma coluna C18 em 0-100% de solvente B a 214nm. A: Cromatograma do extrato obtido das células onde observa-se a presença de diferentes picos em tempos de retenção distintos. B: Cromatograma do extrato obtida a partir da carapaça/espinhos, evidenciando a menor quantidade picos presentes. Os gráficos representam a análise de um pool de pigmentos obtidos das duas frações de *S. neumayeri* após purificação em fase sólida.



Ao avaliar a fração celular em 475 nm, foi gerado apenas um único pico em todo o comprimento de onda escaneado, exceto pelo pico inicial não retido na coluna (figura 13). O pico gerado foi eluído em aproximadamente 9 minutos de corrida, sendo que após escaneamento do comprimento de onda de 200 a 500 nm, teve sua absorbância, principalmente em três comprimentos de ondas: 263, 350 e 477 nm (Figura 14 A e B). A análise da fração celular proveniente de diferentes expedições demonstrou pequenas alterações nos padrões de distribuição dos picos.

Figura 13. Cromatograma de separação da fração celular por RP-HPLC, usando uma coluna C18 em 0-100% de solvente B a 473nm. O cromatograma abaixo representa a análise de um pool de pigmento obtidos da fração celular de *S. neumayeri* após purificação em fase sólida.



De acordo com o perfil cromatográfico apresentado para as frações celulares e de carapaça/espinho (Figura X A,B), foi possível verificar que ambas frações possuem moléculas com características hidrofóbicas distintas, indo desde moléculas mais hidrofílicas, que saem primeiro nos cromatogramas, até moléculas que saem apenas após a entrada do solvente B (acetonitrila), indicando que estas possuem características mais hidrofóbicas. Diante da obtenção de um pico único da fração celular em 473 nm, este por sua vez foi coletado manualmente e submetido à análise de espectrometria de massas.

Figura 14 - Espectro de absorção no UV-Visível da fração celular de *S. neumayeri* adquirido a 473 nm. A: Escaneamento do comprimento de ondas dos pigmentos de 200 a 500nm. B: Espectro de absorção do pico obtido por RP-HPL indicando os diferentes comprimentos de onda absorvidos. O escaneamento e espectro apresentados são representações da analise de um pool de pigmento obtido da fração celular de *S. neumayeri* após purificação em fase sólida.



A análise por espectrometria de massas (ESI-IT-TOF) do extrato bruto das frações celulares e de carapaça/espinhos, apresentado na tabela 3, revelou a

presença de diferentes compostos de baixo peso molecular presentes nas frações de *S. neumayeri*.

Para a identificação dos diferentes pigmentos, a massa experimental obtida pode ser correlacionada com as massas correspondentes de pigmentos naftoquinônicos polihidroxilados descritos até o momento. Neste sentido, foi possível identificar a presença de diferentes espinocromos, tanto na fração celular, quanto na fração de carapaça/espinhos, sendo que estes foram: Espinocromo-E, Espinocromo-E sulfato derivado, Espinocromo-C, Espinocromo-D e Espinocromo-A.

Fração	Modo de	Massa	Nomo do nigmonte ^a
Flaçao	ionização	(Da)	Nome do pigmento"
		226,98	
		315,26	
		324,95	
	Negativo	358,84	
		362,94	
		379,08	
		380,82	
		397,24	
	Positivo	205,05	
Celular		261,12	
Column		268,12	
		275,36	
		300,65	
		301,17	
		307,03	
		316,21	
		327,23	
		332,88	Espinocromo-E sulfato
			derivado
		353,32	

Tabela 3 - Analise inicial das frações celulares e carapaça/espinhos de S. neumayeri.

		368,19	
		385,23	
		391,32	
	Negativo	221,01	Espinocromo-B
		237	Espinocromo-D
		253	Espinocromo-E
		255,01	
		263,02	Espinocromo-A
		301,21	
Caranaca/esninhos		307,26	
Carapaça/espinitos		324,95	
		327,23	
		387,03	
	Positivo	268,96	
		274,24	
		305,06	
		349,23	

Os valores representam as massas (Da) encontradas nas duas frações em modo de ionização negativo e positivo, seguido da sua respectiva identificação de acordo com a comparação de massas descrito em a: Shikov e colaboradores (2018), quando identificadas.

A análise do pico retido em aproximadamente 9 minutos a 473 nm da fração celular, demonstrou uma molécula com um íon majoritário monocarregado de 275 Da (figura 15). Este peso molecular encontrado para o pico absorvido em 473 nm não apresentou correspondência com outros pigmentos conhecidos. Apesar disso, o resultado do pico coletado manualmente apresentou coloração característica vermelho-alaranjado. Interessantemente, não foi identificado nas frações analisadas, celular e carapaça/espinhos, a massa molecular correspondente ao equinocromo-A (266 Da). Após análise inicial de massas da fração retida em aproximadamente 9 minutos e absorção em 473 nm, foram iniciados os ensaios *in vitro* da atividade deste pigmento no sistema imune inato de *S. neumayeri.*

Figura 15 - Perfil de massas do pigmento purificado da fração celular de *S. neumayeri*. A: Perfil total registrado para a fração. B: Aproximação evidenciando o íon majoritário encontrado (274.1450 Da). Os perfis de massas representa a análise de um pool de pigmento obtido da purificação por RP-HPLC da fração celular de *S. neumayeri*.



4.4 Análises in vitro

4.4.1 Avaliação da viabilidade celular

Após exposição dos celomócitos do ouriço do mar *S. neumayeri* a duas concentrações de pigmento (50 e 100 μ g/mL) a diferentes períodos de tempo (1, 6 e 24 horas), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (p > 0,05) dentre os diferentes grupos e seus respectivos controles ou entre as diferentes concentrações de pigmento (figura 16). Notou-se apenas uma diminuição na proporção de células vivas ao longo dos diferentes tempos de exposição, sem alterações em função do tratamento com o pigmento. A viabilidade dos celomócitos nos diferentes grupos se manteve entre 80-95%.

Figura 16 - Proporção de celomócitos viáveis de *S. neumayeri* ao longo de 0 a 24 horas de exposição as concentrações de pigmento. Cada barra representa a média de dois experimentos independentes em triplicata ± SD.



4.4.2 Avaliação da atividade fagocítica in vitro

Os ensaios de fagocitose *in vitro* demostraram que dentre os diferentes tipos celulares presentes no líquido celomático de *S. neumayeri*, apenas os amebócitos fagocíticos foram capazes de realizar a fagocitose.

Os ensaios de fagocitose demonstraram que a capacidade fagocítica (CP) foi maior quando os celomócitos de *S. neumayeri* foram expostos por uma hora à 50 μ g/mL e 100 μ g/mL de pigmento (71,50 ± 13,75 e 73,00 ± 11,24), quando comparado ao grupo controle do mesmo período (53,50 ± 7,53). As diferenças estatisticamente relevantes em uma hora apresentaram um valor de p igual a 0,03 para 50 μ g/mL e 0,02 para 100 μ g/mL, em comparação com o respectivo grupo controle (figura 17). Para os outros períodos de avaliação, 6 e 24 horas de incubação, não foram encontradas diferenças entre as médias dos grupos tratados de 6 e 24 horas com seus respectivos controles, não havendo, portanto, efeito em função do tratamento com o pigmento ao longo do tempo.

Figura 17 - Capacidade fagocítica de amebócitos fagocíticos de *S. neumayeri* expostos a 50 e 100 μ g/mL de pigmento por 1h, 6h e 24 horas. Cada barra representa a média de dois experimentos independentes em triplicata ± SD. * Indica diferenças estatísticas (* p <0,05).



A exposição ao pigmento obtido da fração celular, de modo geral, demonstrou

atuar, quando em suspensão no meio, apenas na primeira hora de exposição, uma vez que ao final de 6 e 24h de exposição, tanto os grupos tratados, quanto seus respectivos controles apresentaram médias de células realizando fagocitose de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, muito próximas.

4.4.3 <u>Expressão de genes alvos relacionados às vias de biossíntese de pigmentos,</u> <u>atividade antioxidante e estresse</u>

O aumento na concentração do pigmento extraído da fração celular de *S. neumayeri* nos ensaios celulares *in vitro*, foi capaz de induzir distintos padrões de expressão gênica nos diferentes alvos. Foram avaliados os níveis de expressão gênica de: Policetídeo sintase (PKs), Sulfotransferase (SULT), Superróxido desmutase (SOD), Catalase (CAT), Metalotioneína (MT) e Proteína de choque térmico

(Hsp-70) após exposição a duas concentrações de pigmento ao longo de 1, 6 e 24 horas. Após estes períodos de exposição às diferentes concentrações do pigmento foi possível observar transcritos de mRNA de todos os genes alvos testados nos celomócitos dos diferentes grupos.

A adição de 50 e 100 µg/mL de pigmento não foi capaz de alterar os níveis de expressão gênica de PKs, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à concentrações utilizadas e seus respectivos controles. No entanto, observa-se um aumento estatisticamente significante nos diferentes tempos (figura 18 A) na concentração de 50 µg/mL, sendo que este foi de 1h com 6h (p=0,03) e 24h (p=0,002) e de 6h com 24h (p=0,008). Além disso, foi observado também, uma diminuição da expressão de PKs em 6h na concentração de 100 µg/mL em relação a concentração de 50 µg/mL. Ademais, notase que o grupo tratado com a maior contração de pigmento demora mais para aumentar seus níveis de expressão ao longo dos períodos avaliados.

Para a expressão de SULT, não foram observadas interações estatisticamente significativas entre o tratamento e seus respectivos controles, sendo que estas foram observadas apenas nos diferentes tempos, na maior concentração, onde temos um aumento estatisticamente significante entre 1h e 24h ((p=0,02) figura 18 B).

A análise dos níveis de expressão de SOD não demonstrou interações estatisticamente significativas entre os diferentes tempos, no entanto foi possível observar uma diminuição estatisticamente significativa com p=0,02 em 1h na maior concentração com relação ao seu controle (figura 18 C). Por outro lado, com CAT, observamos uma interação, tanto em virtude do tempo, quanto decorrente do tratamento (figura 18 D). Inicialmente, após uma hora de exposição as diferentes concentrações do pigmento, foi possível observar uma diminuição estatisticamente significativa (p=0,02) nos níveis de expressão de CAT na maior concentração com seu respectivo controle. Além disso, foi observado também, que o tratamento com o pigmento nas duas concentrações 50 e 100 µg/mL foi capaz de induzir um aumento estatisticamente significativo nos níveis de expressão de CAT com relação ao seu respectivo controle (p=0,001 e p=0,02). Com relação ao tempo, foi possível observar um aumento nos grupos tratados com o pigmento nos diferentes períodos avaliados, sendo que estes aumentos foram estatisticamente significantes entre os tratamentos com 100 μ g/mL em 1h com relação a 6h e 24h (p=0,001), e com 50 μ g/mL em 1h com relação 24h (p=0,001) e 6h com relação 24h (p=0,007). Os níveis de expressão não foram dependentes da concentração, mostrando assim, que houve um aumento significativo (p = 0,014) entre os tempos de exposição no tratamento de 100 µg/mL, no entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos e seus respectivos controles (figura 18 D).

O aumento da concentração de pigmento nos ensaios *in vitro* não foi capaz de regular a expressão gênica de MT, uma vez que não se observou interações estatisticamente significativas decorrentes do tratamento com o pigmento e seus respectivos controles (figura 18 E). Entretanto, foi observado uma interação significante entre os diferentes tempos na menor concentração, sendo que tivemos um aumento de 1h para 24h com valor de p= 0,02.

Por fim, foi possível observar interações estaticamente significantes, tanto decorrentes do tratamento, quanto entre os diferentes tempos na regulação da expressão gênica de Hsp70 (figura 18 F). A adição de 100 µg/mL de pigmento induziu uma diminuição estatisticamente significativa (p=0,01) na expressão de Hsp70 em relação ao seu respectivo controle em 1h hora exposição, sendo este o único período de tratamento que apresentou diferenças em relação ao grupo controle. Por outro lado, observamos também, um aumento estatisticamente significante em decorrente do tempo, sendo que este foi mais proeminente no grupo tratado com 50 µg/mL, entre o período de 1h e 24h (p=0,001), bem como entre 6h e 24h (p=0,04), mas sem diferenças entre estes e seus respectivos controles. Ademais foi observado um aumento estatisticamente significante (p=0,002) entre o grupo de 100 µg/mL no período de 1h com o mesmo grupo no período de 24h. De modo geral, o aumento da concentração do pimento induz uma regulação negativa, principalmente na concentração de 100 µg/mL e no período de uma hora de exposição, uma vez que foram apenas estes que revelaram alterações estatisticamente significantes em relação ao respectivo controle. Porém as outras alterações observadas giram em torno destes grupos tratados com as diferentes concentrações nos diferentes períodos de exposição, onde observamos um aumento progressivo de 1h para 24h.
Figura 18 - Variação na expressão de genes-alvo em celomócitos de S. neumayeri expostos a 50 e 100 µg/mL de pigmento por 1, 6 e 24 horas. Cada barra representa a média de três análises independentes \pm SE. * Indica diferenças estatísticas entre os grupos expostos e seus respectivos controles ou entre os diferentes tempos de exposição na mesma concentração (*p <0,05) (**p<0,005).



4.4.4 <u>Avaliação da morfologia celular e organização do citoesqueleto de actina em</u> <u>amebócitos fagocíticos expostos ao pigmento</u>

Uma vez que não foram observadas grandes diferenças nos grupos expostos a 50 e 100 µg/mL de pigmento, por 6 e 24 horas de exposição, optamos por dar continuidade ao estudo utilizando uma abordagem morfológica das células, apenas no período de 1h de exposição, pois neste período foram observadas alterações dos tratamentos quando comparados ao grupo controle.

A adição do pigmento induziu alterações distintas na morfologia celular e organização da actina em amebócitos fagocíticos de *S. neumayeri* (figura 19 A-F). Quando os celomócitos de *S. neumayeri*, tratados ou não com o pigmento foram adicionados às lamínulas de vidro para adesão por 60 minutos, foi possível observar que as únicas células capazes de aderir às lamínulas foram os amebócitos fagocíticos, e que todos os grupos apresentaram grande quantidade de amebócitos fagocíticos aderidos em toda superfície das lamínulas.

Na ausência do pigmento, os AFs apresentaram um grau de propagação de seu citoplasma consideravelmente maior (figura 19 A-B), sendo possível observar a presença de grandes lamelipódios na região cortical, bem como filopódios. Apesar desse aumento da região citoplasmática de AFs, foi possível identificar uma marcação pouco acentuada para F-actina, assim como uma marcação difusa de baixa intensidade para região citoplasmática, com pontual aumento em regiões com presença de filopódios e lamelipódios. Já na presença, tanto de 50 µg/mL, quanto 100 µg/mL de pigmento, os AFs apresentaram um grau menor de propagação citoplasmática (figuras 19 C-F), porém, ainda sendo possível a observação de lamelipódios e um aumento da proporção de filopódios. Além disso, foi possível observar uma marcação intensa para F-actina com aumento gradual ao longo dos grupos, em toda região celular, com menor difusão dessa marcação na região citoplasmática, comparando com o grupo controlem sugerindo uma maior polimerização deste nos grupos tratados com o pigmentos. Em alguns casos, foi possível a identificação de uma polarização acentuada dessas células (figura 19 E), uma vez que podemos observar a presença de lamelipódios intensamente marcados para F-actina, caracterizando a borda anterior da célula, e as fibras de retração, caracterizando a regressão do citoplasma da célula.

Figura 19 - Alterações na marcação do citoesqueleto de actina em amebócitos fagocíticos de *S. neumayeri*, induzidas pelo tratamento com o pigmento. A-B, células do grupo controle. C-D, células tratadas com 50 µg/mL de pigmento. E-F, células tratadas com 100 µg/mL de pigmento. As células foram fixadas e coradas com faloidina (Alexa Fluor® 594) para revelar os filamentos de actina e DAPI (Vectashield) para marcação do núcleo, após uma hora de incubação com o pigmento.



A intensa marcação para F-actina apresentada pelos AFs em virtude do tratamento dessas células com diferentes concentrações de pigmento, foi então quantificada e demonstrou que o aumento na concentração de pigmento foi capaz de aumentar significativamente a intensidade da marcação de F-actina no grupo de 50 µg/ml de pigmento em relação ao controle (P<0,001), bem como no grupo de 100 µg/mL (p<0,001), em relação ao controle (figura 20). Ademais, foi possível verificar um aumento significativo (p=0,04) entre os dois grupos tratados com pigmento. Interessantemente, foi possível observar uma correlação positiva (R= 0,9621), entre o aumento da fagocitose descrito anteriormente, com o aumento da marcação de F-actina aqui demostrado (figura 21).

Figura 20 - Valores representam a Fluorescência Total Corrigida das Células (CTCF) de AFs de *S. neumayeri* expostos a 50 e 100 μ g/mL de pigmento por 1 hora. Cada diagrama de caixa representa a mediana, seguido dos valores mínimos e máximos de uma triplicata experimental. * Indica diferenças estatisticamente significantes entre os grupos expostos e o controle, ou entre eles. (*p <0,05) ***p<0,001.



Figura 21 - Correlação positiva entre capacidade fagocítica e intensidade de fluorescência após uma hora de exposição de AFs a 50 e 100 µg/mL de pigmento. Cada ponto representa um grupo experimental e a linha vermelha tracejada representa o coeficiente de regressão linear, juntamente com os valores de R².



Correlação CF/Fluorescência

Por ultimo avaliamos a área de AFs após o tratamento com as diferentes concentrações do pigmento. A adição de pigmento foi capaz de induzir uma diminuição estatisticamente significante (p<0,001) na área de espraiamento dos AFs após o período de uma hora de exposição na concentração de 50µg/mL em relação ao grupo controle, sendo que estes apresentaram médias de $321,1 \pm 159,7$ e $478,3 \pm 289,3 \mu$ m, respectivamente (figura 22). Além dessa diferença, observou-se também uma diferença estatisticamente significante (p=0,01) entre os dois grupos tratados com pigmento, onde podemos observar um pequeno aumento entre 50 e 100 µg/mL, com médias de $321,1 \pm 159,7$ e $407,5 \pm 196,4 \mu$ m. Apesar dessa diferença encontrada entre os grupos, a maior concentração de pigmento não induziu diferenças com relação ao seu controle.

Figura 22 - Área de espraiamento de AFs de *S. neumayeri* expostos a 50 e 100 µg/mL de pigmento por 1 hora. Cada diagrama de caixa representa a mediana, seguido dos valores mínimos e máximos de uma triplicata experimental. * Indica diferenças estatisticamente significantes entre os grupos expostos e o controle, ou entre eles. (*p <0,05) ***p<0,001.



5 DISCUSSÃO

Sabe-se que o ouriço do mar antártico, S. neumayeri, apresenta em seu líquido celomático quatro tipos celulares distintos assim como descrito na literatura para outras espécies de ouriços do mar. Os resultados apresentados relatam o isolamento do pigmento presente nos esferulócitos vermelhos de S. neumayeri, e a resposta celular, bem como possíveis mecanismos de atuação do pigmento em seus celomócitos. Os resultados mostram que os esferulócitos vermelhos do ouriço do mar antártico apresentam um novo pigmento em seus grânulos, até então desconhecido cuja atividade parece estar diretamente relacionada à resposta imune inata fagocítica. Ele atua como um possível estimulador desta resposta, uma vez que o aumento da concentração de pigmento nos ensaios in vitro foi capaz de induzir a um aumento imediato da capacidade fagocítica dos amebócitos de S. neumaveri. Além disso, assim como para o equinocromo-A, pigmento conhecido na literatura por estar presente nos esferulócitos vermelhos de outras espécies de ouriços do mar, sua biossíntese parece ser regulada pelas enzimas PKs e Sult, como demonstrado por Calestani e colaboradores (2003). O aumento da concentração do pigmento de S. neumayeri no meio extracelular pode estar relacionado com a ativação de mecanismos antioxidantes endógenos e de componentes do citoesqueleto de células responsáveis pela resposta imune fagocítica.

Os esferulócitos vermelhos são células conhecidas por apresentarem grânulos intracitoplasmáticos contendo um pigmento vermelho, o equinocromo-A, que está intimamente relacionado com à resposta imunológica em ouriços. Sabe-se que tal resposta está relacionada à grande atividade bactericida e antioxidante apresentada pelo equinocromo-A (SERVICE; WARDLAW, 1984; LEBEDEV *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2010). Além disso, os esferulócitos vermelhos são encontrados ao redor de feridas e lesões na carapaça de ouriços, onde formam uma borda ao redor, reforçando assim seu importante papel na resposta imune contra infecções (SMITH *et al.*, 2010). Embora o equinocromo-A seja um dos pigmentos mais comuns em ouriços do mar (SHIKOV *et al.*, 2018), nossos resultados demonstraram que o ouriço do mar antártico *S. neumayeri* não o apresenta em sua composição, seja nos celomócitos ou na carapaça/espinhos.

Anderson e colaboradores (1969) descrevem que encontraram o equinocromo-A como um dos seis pigmentos naftoquinônicos polihidroxilados mais amplamente distribuídos em carapaças e espinhos de ouriços-do-mar, porém podemos observar com os dados apresentados que está ausente na espécie antártica de ouriço do mar. Este dado sugere que esta espécie possa ter passado por uma pressão do ambiente em que habita, propiciando a produção de novas moléculas bioativas em *S. neumayeri.*

Pigmentos distintos podem ser encontrados em diferentes espécies de ouriços do mar a partir de células ou carapaças e espinhos. Estes são compostos de variações de naftoquinonas polihidroxiladas, com 4-6 grupos hidroxila em sua estrutura, comumente conhecidas como equinocromo ou espinocromos, compreendendo uma classe separada de compostos quinoides naturais (ANDERSON 1969; KUWAHARA *et al.*, 2009, 2010; POWELL *et al.*, 2014; BRASSEUR *et al.*, 2018). Para a espécie antártica, identificamos a presença de diferentes compostos de baixo peso molecular presentes nas duas frações analisadas inicialmente. Dentre os diferentes compostos pela literatura, como: espinocromo-E, espinocromo-E sulfato derivado, espinocromo-C, espinocromo-D e Espinocromo-A, sendo que três desses, espinocromos A,C e D, fazem parte dos pigmentos mais comuns encontrados em ouriços (SHIKOV *et al.*, 2018). Isso nos leva a acreditar e sugerir que esses pigmentos possam ser essenciais na pigmentação desses animais e possivelmente não desempenham um papel biológico crucial (GROWNS; RITZ, 1994).

A partir da análise por espectrometria de massas, verificamos que o extrato de pigmento proveniente dos celomócitos de *S. neumayeri* possui um novo pigmento naftoquinônico polihidroxilado, o qual poderia ser um derivado ou até mesmo um composto análogo aos espinocromos ou ao equinocromo A. Características físico-químicas como a coloração, comprimento de onda de absorção e peso molecular (274,1450 Da), são características compartilhadas com outros pigmentos naftoquinônicos polihidroxilados descritos na literatura para ouriços do mar (KUWAHARA *et al.*, 2010, POWELL *et al.*, 2014, HOU *et al.*, 2018).

Ao longo de mais de 100 anos vários pigmentos diferentes, conhecidos como naftoquinonas já foram isolados e identificados a partir de diferentes espécies de ouriços do mar (SHIKOV *et al.*, *2018*). Entretanto a espécie *Echinothrix* diadema foi a única a apresentar um espinocromo vermelho conhecido como piranonafitazarina (8-Hydroxy-2-methyl-2H-pyrano(2,3-g) naphthazarin) com peso molecular de 274,04773 Da (MOORE *et al.*, 1968). Levando em consideração o peso molecular

encontrado para o pigmento de *S. neumayeri* e outras características, como a coloração vermelha e o espectro de absorção no UV podemos sugerir uma possível semelhança dele com o pigmento descrito por Moore e colaboradores (1968). Parece ser consenso que estes pigmentos sejam ionizados em modo negativo durante análises de espectrometria de massas (KUWAHARA *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013; POWELL *et al.*, 2014), no entanto, observamos que para o Espinocromo-E sulfato derivado e o pigmento presente no extrato purificado das células a ionização ocorreu em modo positivo. O fato do pigmento que encontramos não apresentar esse padrão de ionização reforça nossa hipótese de que este poderia ser uma piranonaftazarina, uma vez que Cui e colaboradores (2017) utilizaram o mesmo modo de ionização para outro pigmento (piranonaftazarina-A), um análogo da piranonaftazarina derivado de fungos endofíticos *Leptosphaerulina sp* de mangue.

Um dos resultados que nos chamou a atenção neste trabalho foi verificar que o ouriço antártico *S. neumayeri* não possui o equinocromo-A como parte dos pigmentos que o compõe. Sabendo-se que este é o pigmento mais comum encontrado em ouriços, uma possível explicação para esse achado poderia ser a adaptação em resposta a ambientes extremos, neste caso, a baixas temperaturas e alta concentração de oxigênio dissolvido na água do mar da antártica. Acreditamos que tais condições ambientais levam ao aumento da pressão seletiva para privilegiar a produção de metabólitos secundários mais adaptados às condições. Processos semelhantes foram observados por exemplo em peixes antárticos, que desenvolveram enzimas anticongelantes em resposta ao ambiente extremo (CHEN *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 2009).

O papel do equinocromo-A como antioxidante e bactericida já foi bem estabelecido na literatura para equinoides (JOHNSON 1969b; KUWAHARA *et al.*, 2009, 2010; SHANKARLAL *et al.*, 2011), entre outras atividades de relevância farmacológica a presença de várias hidroxilas na estrutura molecular deste pigmento confere atividades anti-inflamatória e cardioprotetora (SHIKOV *et al.*, 2018). Estas funções são utilizadas para justificar a participação deste pigmento e das células que o biossintezam na resposta imune inata de ouriços do mar (SMITH *et al.*, 2010). Com relação ao pigmento (piranonafitazarina), descrito por Moore e colaboradores (1968), sua atividade biológica não foi descrita no trabalho, o qual identificou e elucidou sua estrutura molecular. Esse foi o primeiro pigmento a apresentar quatro carbonos ligados a estrutura do anel naftoquinônico (HOU *et al.*, 2018). A atividade do

composto da mesma classe, mesma coloração e massa molecular aproximada (piranonafitazarina-A) obtido de fungos endofíticos de Mangue por Cui e colaboradores (2017) foi avaliada como bactericida. Este dado nos leva a hipótese de que este pigmento mantenha as atividades apresentadas por outros pigmentos em ouriços. Contudo, nossas hipóteses são baseadas na semelhança de peso molecular e outras características semelhantes entre esses dois compostos, necessitando assim, de novos estudos que elucidem a real estrutura química apresentada pelo pigmento presente nos celomócitos do ouriço do mar antártico *S. neumayeri.*

Apresentamos aqui uma nova função do pigmento de esferulócito vermelhos do ouriço-do-mar antártico, que está diretamente relacionada ao sistema imune inato. Este trabalho demonstra que o tratamento de celomócitos com diferentes concentrações do pigmento, em ensaios de fagocitose in vitro, induziu um aumento significativo da capacidade fagocítica em todas as concentrações utilizadas, porém este efeito ocorreu apenas em 1 hora de tratamento, isto indica que o pigmento estaria agindo imediatamente após ser liberado. Johnson (1969) observou a liberação de equinocromo-A pelos esferulócitos vermelhos de Strongylocentrotus purpuratus e franciscanus em contato com bactérias gram-negativas. Smith e colaboradores (1985) efetivamente observaram a atividade bactericida do equinocromo após atrair quimiotaticamente os esferulócitos vermelhos para bactérias, e posteriormente induzindo sua degranulação no meio. Coates e colaboradores (2017) demonstraram in vitro para Paracentrotus lividus e Psammechinus miliaris que a degranulação dos esferulócitos vermelhos e sua detecção no fluido aumentam em contato com ligantes microbianos como o LPS, e micróbios intactos. Dito isso, acreditamos que o aumento imediato na fagocitose observado em 1 hora de exposição ao pigmento é uma resposta ao aumento da concentração de pigmento no meio extracelular. No entanto, tal aumento não permanece nos outros períodos avaliados, 6 e 24 horas, corroborando com os achados de Coates e colaboradores (2017), que observaram um aumento na proporção de esferulócitos vermelhos e na concentração de equinocromo livre após 30 minutos e 1 hora de inoculação do LPS, seguido por um restabelecimento nas horas seguintes, até 24 horas após a inoculação. Estas observações nos permitem formular que logo após a liberação pelos esferulócitos vermelhos, o pigmento desempenhará suas funções já conhecidas e paralelamente induzirá a "ativação ou imunoestimulação" da fagocitose. A fagocitose é um mecanismo eficiente de limpeza, desta forma o aumento do equinocromo por

mecanismos externos induz a um desequilíbrio na homeostase do organismo levando à morte dessas bactérias (LEBEDEVE *et al.*, 2005; COATES *et al.*, 2017) e também ao aumento de detritos celulares, provocando o aumento da atividade de clearence dos amebócitos fagocíticos. Este processo constitui-se um importante mecanismo de defesa inato.

Alguns estudos utilizam células de diferentes espécies de ouriços do mar como biomarcadores para avaliação de stress ambiental, uma vez que o aumento dos esferulócitos vermelhos é a principal alteração em resposta ao estresse (PINSINO et al. 2008; BRANCO et al. 2012, 2013; PINSINO; MATRANGA 2015; FIGUEIREDO *et al.*, 2016). O aumento de células esféricas vermelhas em *S. neumayeri* foi observado após estresse térmico (BRANCO *et al.*, 2012) e injeção de LPS (GONZALEZ-ARAVENA *et al.*, 2015). Em ambos os estudos a capacidade fagocítica também aumentou. Esses resultados conectam-se ao apresentado neste trabalho. Desta forma, acreditamos que o aumento dos esferulócitos fagocíticos por meio do aumento da concentração de pigmento extracelular.. Este mecanismo parece ocorrer de forma mais acentuada na espécie antártica *S. neumayeri*, uma vez que o estresse térmico (BRANCO *et al.*, 2013) e acidificação (FIGUEIREDO *et al.*, 2016) de duas espécies tropicais de ouriços do mar levaram ao aumento da concentração de esferulócitos vermelhos sem a ativação de resposta mediada pelos amebócitos fagocíticos.

O englobamento e destruição de partículas e microorganismos estranhos por fagocitose são componentes críticos e essenciais da resposta imune inata para manter a homeostase do hospedeiro (FLANNAGAN *et al.*, 2012). Para que seja possível a migração celular, o rearranjo de forma dinâmica do citoesqueleto de actina é um aspecto fundamental do processo de formação de protrusões e geração de força intracelular capaz de promover a locomoção. As células polarizadas conseguem emitir protrusões distintas na direção de um alvo ou de seu caminho de migração (LAMBRECHTS *et al.*, 2004). As redes de f-actina são produzidas por meio de ação coordenada de diferentes conjuntos de proteínas de ligação sobrepostos à actina que atuarão facilitando processos fundamentais e específicos como motilidade, polarização, divisão celular ou endocitose (BLANCHOIN *et al.*, 2014). O processo de remodelamento é essencial para produzir distintas membranas ricas em f-actina capazes de executarem o processo de fagocitose (ROUGERIE *et al.*, 2013). Assim, podemos hipotetizar que o aumento da fagocitose observado em 1 hora ocorreu pela

atuação do pigmento na polimerização dos filamentos de f-actina em amebócitos fagocíticos. Para testar esta hipótese, os celomócitos de *S. neumayeri* foram avaliados quanto a polimerização do citoesqueleto de f-actina após a exposição às duas concentrações avaliadas. Foi possível observar que a exposição em ambas as concentrações induziu a polimerização do citoesqueleto de f-actina dos amebócitos fagocíticos, reforçando assim nossa proposta de atuação deste pigmento.

Algumas questões ainda precisam de mais esclarecimento. Primeiro, qual o mecanismo molecular de ativação da polimerização observada? A fagocitose é orquestrada pelas GTPases Rac e Cdc42, que por sua vez, durante este processo promovem a reorganização do citoesqueleto de actina (CHIMINI; CHAVRIER. 2000). Este mecanismo é um alvo interessante para elucidar o mecanismo de ativação do citoesqueleto promovido pelo pigmento. Spector e colaboradores (1999) apresentaram alguns compostos naturais marinhos capazes de alterar o citoesqueleto de actina, em sua maioria são provenientes de esponjas do mar. O mecanismo de ação destes compostos se dá por meio do sequestro dos monômeros de actina, impedindo a polimerização dos filamentos e os desestabilizando, também pode ocorrer o contrário como no caso da Jaspamida um peptídeo de espoja capaz de induzir a polimerização da actina, que estabiliza tais filamentos.

Interessantemente foi observada uma correlação positiva (r=0,96) entre a fagocitose e a polimerização, evidenciando a forte relação entre estes dois mecanismos. Isto reforça nossa hipótese de atuação do pigmento na imunidade celular de ouriços. Arizza e colaboradores (2007) observaram uma potente atividade citolítica de esferulócitos incolores que foi aumentada na presença dos amebócitos fagocíticos, sugerindo também a necessidade de uma atuação em conjunto destas células para apresentar este efeito.

A alteração da área total das células após uma hora de exposição a diferentes concentrações do pigmento pode está relacionada à rearranjos do citoesqueleto de actina. Resultado igual foi observado por Figueiredo e colaboradores (2016) em duas espécies de ouriço tropical, o estresse provocado pela diminuição do pH da água causou a diminuição da área dos amebócitos fagocíticos destes animais. Esta diminuição pode estar relacionada ao efeito do pH na dinâmica dos filamentos de actina, como sugerido pela autora. No entanto, a polimerização do citoesqueleto de actina nestas células não foi avaliada neste trabalho. Abraçamos a hipótese de que o aumento da polimerização do citoesqueleto de f-actina induza aumento na

capacidade de fagocitose. A elevada taxa de remodelamento do citoesqueleto durante a alta atividade fagocítica poderia impactar na área superficial ocupada pelas células, e consequentemente observa-se uma área de espraiamento menor.

Os efeitos bactericidas apresentados pelo equinocromo-A têm atividade máxima em 24 a 48 horas (SERVICE WARDLAW, 1984). Tal efeito está associado a capacidade do pigmento de seguestrar íons férricos (Fe³⁺) do ambiente, formando complexos inativos na fase aquosa (LEBEDEV et al., 2001). Foi visto que a degranulação do equinocromo-A está diretamente associada ao influxo de cálcio (Ca²⁺) nos esferulócitos vermelhos, uma vez que o uso de inibidores impediu a degranulação deste tipo celular, mesmo na presença de bactérias (COATES et al., 2017). Adicionalmente, o mesmo autor demonstra que as concentrações extracelulares de equinocromo-A aumentam em até 1 hora após exposição a microorganismos, com níveis restabelecidos em até 24 horas pós exposição. Diferentemente, nossos resultados demostraram que a atuação deste pigmento sobre o sistema imune celular de S. neumayeri parece estar associada apenas ao primeiro momento de exposição (1 hora), uma vez que nos períodos de 6 e 24 horas, para ambas as concentrações, não identificamos resposta fagocítica. Como não foram observadas diferenças com relação ao tempo na fagocitose, partimos para avaliar mecanismos moleculares possivelmente associados ao aumento da concentração do pigmento, como por exemplo a via de biossíntese.

Durante a biossíntese do equinocromo, tem-se a ativação, dentre outras, das enzimas policetídeo sintase (PKs) e sulfotransferase (SULT), ambas requeridas durante esse processo. Também foram identificadas nos estágios iniciais do desenvolvimento de células pigmentadas em embriões de ouriços (CALESTANI *et al.*, 2003). Adicionalmente, os autores demonstraram que SULT é expressa apenas em células pigmentadas e não é essencial para a biossíntese do equinocromo, sugerindo que ela desempenhe um papel específico no processo de biossíntese do pigmento nas células pigmentadas. A diferença encontrada na expressão do gene PKs foi apenas em relação ao tempo de exposição, não havendo diferenças nos respectivos controles. Adicionalmente, foi observado regulação dessa expressão ao longo do tempo quando tratado com 50 µg do pigmento, o que poderia estar associado a recuperação do estado basal de expressão, uma vez que não observamos diferenças em relação aos controles nos diferentes tempos avaliados. Nossos resultados demonstram que PKs não seria capaz de uma autorregulação com base no aumento

da concentração de pigmento, sugerindo a necessidade de uma indução extracelular. Como demonstrado por Coates e colaboradores (2017), após inoculação de LPS na cavidade celômica de duas espécie de ouriço, observou-se um aumento dos esferulócitos vermelhos e do equinocromo em 30 e 60 minutos. Entretanto, este estudo não avaliou a expressão de genes relacionados à biossíntese do equinocromo. Seguindo os mesmos padrões de expressão de PKs, o aumento da concentração de pigmento não foi capaz de regular positivamente a expressão de SULT, que teve um aumento de expressão significativo apenas na maior concentração com relação tempo de exposição.

Adicionalmente a estes dados, Kiselev e colaboradores (2013) demonstraram uma regulação positiva na expressão de PKs e SULT, bem como o aumento no número de células pigmentadas e da viabilidade de embriões de *Strongylocentrotus intermedius* estimulados por bactéria, reforçando nossa hipótese de que o aumento da expressão de PKs ou Sult ocorrerá apenas como mecanismo de resposta ao estresse, uma vez que paralelamente este leva ao aumento da proporção de esferulócitos vermelhos. Ademais, estes dados nos levam a sugerir que não apenas o aumento dos esferulócitos vermelhos, mas também da expressão desses genes são úteis como biossensores de estresse ambiental.

Dentre as funções do equinocromo-A e de outros pigmentos polihidroxilados semelhantes, como os espinocromos, destaca-se a atividade antioxidante (SHANKARLAL et al., 2011; LI et al., 2013). Muitos dos efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio já são conhecidos. Tais efeitos podem ser controlados por antioxidantes endógenos específicos, parte da primeira linha de defesa antioxidante do organismo, como as enzimas SOD e CAT (IGHODARO et al., 2018). Verificamos que o aumento da concentração de pigmento pode atuar em sistemas antioxidantes endógenos, constatando que a expressão tanto de SOD, quanto de CAT foram regulados negativamente guando as células foram expostas à concentração de 100 µg/mL de pigmento. Com relação a SOD, esta foi regulada apenas no primeiro período de exposição sem posterior alteração. No entanto, a expressão de CAT foi regulada em 1 e 24 horas após exposição, sendo que em 24 horas as duas concentrações foram capazes de regular positivamente sua expressão. Além desse aumento, foi visto que a expressão ao longo do tempo também foi regulada positivamente. A enzima CAT está relacionada com a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio (O_2), reduzindo os danos induzidos por radicais livre, seguindo um processo colaborativo entre SOD e CAT neste processo (IGHODARO *et al.*, 2018). Dirks e colaboradores (1982) sugerem que a formação de radicais livres pode ser mais fácil em águas frias devido às altas concentrações de oxigênio dissolvido. Assim, nossos dados sugerem que esse aumento de CAT, observado em 24 hora após exposição, poderia atuar como uma resposta adicional às altas concentrações de oxigênio dissolvido presentes em águas do mar frias.

Metalotioneínas são conhecidas como proteínas intracelulares ricas em cisteínas que se ligam a metais, exercendo funções tanto em processos de detoxificação, quanto antioxidante (RUTTKAY-NEDECKY *et al.*, 2013). No presente trabalho esta não encontrou-se alterada com base no tratamento com as diferentes concentrações de pigmento, tendo apenas um aumento induzido pelo tempo de tratamento no período de 1 hora para 24. Metalotioneínas também são de estresse, principalmente os induzidos por metais, como demonstrado por Figueira e colaboradores (2012). No mesmo trabalho, os autores ainda sugerem que as MTs são excelentes marcadores de estresse por metal, mas não para estresse oxidativo, uma vez que não observaram uma resposta em relação à indução desse estresse com peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Desta forma, podemos sugerir que o pigmento em si não causou estresse, já que não foram observadas alterações nos diferentes grupos com seus respectivos controles.

Proteínas Hsp70 são consideradas biomarcadores de estresse ambiental, químico e físico para celomócitos de ouriços (MATRANGA *et al.*, 2000; MÜLLER; MATRANGA, 2005). Nosso trabalho observou uma regulação negativa da expressão deste marcador apenas na primeira hora de tratamento com 100 µg/mL do pigmento, sendo que após 6 e 24 horas os níveis de expressão foram restabelecidos a níveis basais. Algumas HSPs desempenham papéis essenciais, por exemplo, durante o dobramento e desdobramento de proteínas, além de participarem do transporte, endereçamento de proteínas para compartimentos subcelulares, sinalização e proteção das células contra o estresse e apoptose (LI; SRIVASTAVA, 2004). Interessantemente, observamos uma diminuição da expressão desta na maior concentração de pigmento, o que nos leva a pensar se essa resposta, não apenas para Hsp70, mas também para SOD e CAT seria apenas uma diminuição das necessidades metabólicas da célula em resposta a alta concentração de pigmento utilizada no primeiro momento. Apesar dessa diminuição na expressão, quando as células foram desafiadas com levedura *S. cerevisiae*, as mesmas foram capazes de responder a este estímulo de maneira eficaz, o que por sua vez nos leva refutar a hipótese de estresse. Ademais, quando estão sob estresse, os ouriços do mar, normalmente respondem com uma aumento da expressão proteica e genica de Hsp70 (MATRANGA *et al.*, 2002; RAGUSA *et al.*, 2017).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudou-se pela primeira vez os pigmentos presentes no ouriço do mar antártico *Sterechinus neumayeri* e sua correlação com mecanismos da resposta imune inata.

Encontramos pigmentos naftoquinônicos polihidroxilados tanto nas células quanto na carapaça/espinhos de *S. neumayeri*.f. Na carapaça/espinhos foi onde conseguimos identificar o maior número de pigmentos conhecidos. Por outro lado, tanto nas células, quanto na carapaça/espinho não foi encontrado equinocromo-A, pigmento mais conhecido de ouriços do mar. A análise do extrato celular apresentou um novo pigmento de massa molecular 274,1450 Da, possivelmente uma piranonafitazarina devido às semelhanças, como espectro de absorção no UV, coloração e massa molecular.

A avaliação deste novo composto sobre a resposta imune inata, demonstrou que nas concentrações de 50 e 100 µg/mL ele é capaz de induzir um aumento na resposta imune fagocítica do amebócitos fagocíticos após 1 hora de exposição.

A exposição dos celomócitos de *S. neumayeri* a diferentes concentrações do pigmento induziu uma aumento na polimerização do citoesqueleto de actina dos amebócitos fagocítico após 1 hora de tratamento.

A exposição dos celomócitos de *S. neumayeri* a diferentes concentrações do pigmento induziu uma diminuição da área da célula dos amebócitos fagocíticos após 1 hora de tratamento na concentração de 100µg/mL.

O tratamento com o pigmento em ambas as concentrações foi capaz de modular de diferentes maneiras os níveis de expressão dos genes avaliados.

A expressão de PKs, SULT e MT não foi alterada após a incubação com o pigmento (50 e 100 µg/mL).

A exposição dos celomócitos de *S. neumayeri* a diferentes concentrações induziu uma diminuição na expressão de SOD, CAT e Hsp70 em 1 hora de exposição na concentração de 100µg/mL. Além disso, foi capaz de modular positivamente, após 24 horas de exposição nas duas concentrações testadas, a expressão de CAT.

Nossos dados indicam que o pigmento presente nos esferulócitos vermelhos de *S. neumayeri* desempenha um papel importante na resposta imune inata, por meio da modulação da atividade dos amebócitos fagocíticos, estimulando o aumento da

resposta fagocítica e alterando a expressão gênica de enzimas antioxidante e proteínas de choque térmico.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON H, MATHIESON J, THOMSON R. Distribution of spinochrome pigments in echinoids. *Biochemistry and Physiology*. 28.1969.
- ARIZZA, V., GIARAMITA, F. T., PARRINELLO, D., CAMMARATA, M., PARRINELLO, N. Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 147(2):389–394. 2007. doi:10.1016/j.cbpa.2007.01.022
- BLANCHOIN, L., BOUJEMAA-PATERSKI, R., SYKES, C., PLASTINO, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* 94:235–263. 2014. <u>http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00018.2013</u>
- BORGES JCS, JENSCH J, BERNARD EG, PAULA AG, MANGIATERRA MBB, CEPELLOS D, SILVA JRMC. Phagocytic amoebocyte sub populations in the perivisceral coelom of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). *Journal of experimental zoology. Part A, Comparative Experimental Biology.* 303:241–8. 2005.
- BRANCO, P. C.; PRESSINOTTI, L. N.; BORGES, J. C. S.; IUNES, R. S.; KFOURY, J. R.; SILVA, M. O.; GONZALEZ, M.; SANTOS, M.F.; PECK, L. S.; COOPER, E. L.; SILVA, J. R. M. C. Cellular biomarkers to elucidate global warming effects on Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri. Polar Biol.* 35:221-9. 2012.
- BRANCO, P. C.; PRESSINOTTI, L. N.; BORGES, J. C. S.; Celular biomarkers to elucidate global warming effects on Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Polar Biol*. 35:221–229. 2012. doi: 10.1007/s00300-011-1063-5
- BRANCO, P. C., BORGES, J. C. S., SANTOS, M. F., JENSCH JUNIOR, B. E., DA SILVA, J. R. M. C. 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*. *Marine Environmental Research*. 92:95– 101. 2013.
- BRASSEUR, L.; DEMEYER, M.; DECROO, C.; CAULIER, G.; FLAMMANG, P.; GERBAUX, P.; EECKHAUT, I. Identification and quantification of spinochromes in body compartments of *Echinometra mathaei's* coloured types. *Royal society open science*. 5 (171213):1-15. 2018.
- CALESTANI, C.; RAST, J. P.; DAVIDSON, E. H. Isolation of pigment cell specific genes in the sea urchin embryo by differential macroarray screening. *Development* (Cambridge, England). 130(19):4587–96. 2003.
- CHEN, G.; SHAW, M. H.; KIM, Y.; NUÑES, G. NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 4: 365-398. 2009.
- CHIA, F.; XING, J. Echinoderm Coelomocytes. Zool. Stud. 35(4):231-54. 1996.

- CHIMINI, G.; CHAVRIER, P. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat. Cell Biol.* 2:191–196. 2000.
- COATES, C. J.; McCULLOCH, C.; BETTS, J.; WHALLEY, T. Echinochrome A release by red spherule cells is an iron-withholding strategy of sea urchin innate immunity. *Journal of innate immunity*. 10:119-130. 2018.
- CUI, H.; LIU, Y.; DING, M.; ZHANG, Z.; LIU, H.; HUANG, X.; SHE, Z. New pyranonaphthazarin and 2-naphthoic acid derivatives from the mangrove endophytic fungus *Leptosphaerulina* sp. SKS032. *Phytochemistry letters*. 20: 214-217. 2017.
- Dirks, R.C.; Faiman, M.D.; Huyser, E.S. (1982) The role of lipid free radical initiator, and oxygen on the kinetics of lipid peroxidation. Toxic. appl. Pharmac. 63, 21-28. 1982.
- FIGUEIRA, E.; BRANCO, D.; ANTUNES, S.C.; GONÇALVES, F.; FREITAS, R. Are metallothioneins equally good biomarkers of metal and oxidative stress? Ecotoxicology and Environmental Safety, 84, 185–190. 2012.
- FIGUEIREDO, D.A.L.; BRANCO, P.C.; DOS SANTOS, D.A.; EMERENCIANO, A.K.; IUNES, R.S.; BORGES, J.C.S.; SILVA, J.R.M.C.S. (2016). Ocean acidification affects parameters of immune response and extracellular pH in tropical sea urchins Lytechinus variegatus and Echinometra luccunter. Aquatic Toxicology, 180, 84–94. 2016.
- FLANNAGAN, R. S.; JAUMOUILLÉ, V.; GRINSTEIN, S. The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology*.7:61–98. 2012.
- FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 2nd edn. New York. 1987.
- Gonzalez-Aravena, M.; Perez-troncoso, C.; Urtubia, R.; Branco, C.P.; Silva, J.R.M.C.S.; Mercado, L.; De Lorgeril, J.; Bethke, J. Immune response of the Antarctic sea urchin Sterechinus neumayeri: cellular, molecular and physiological approach, Rev. Biol. Trop. 63 309–320. 2015. https://doi.org/10.15517/rbt.v63i2.23165.
- Growns, J.E.; Ritz, D.A. Colour variation in southern Tasmania populations of Heliocidaris erythrogramma (Echinometridae: Echinoidea). Aust. J. Mar. Freshw. Res., 45 pp. 233-242. 1994.
- HOU, Y.; VASILEVA, E. A., CARNE, A.; McCONNELL, M.; BEKHIT, A. E. A.; MISHCHENKO, N. P. Naphthoquinones of the spinochrome class: occurrence, isolation, biosynthesis and biomedical applications. *The royal society of chemistry*. 8:32637-32650. 2018.

- HUXLEY, T. H. On the Classification of the Animal Kingdom. *Journal of the Linnean Society of London*, Zoology, v.12, n.59, p.199–226, 1875. doi:10.1111/j.1096-3642.1875.tb02582.x
- IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*. 54:287-293. 2018.
- JOHNSON, P. T. The coelomic elements of sea urchins (Strongylocentrotus).III. In vitro reaction to bacteria. *Journal of Invertebrate Pathology*.62:42–62. 1969.
- KISELEV, K. V.; AGEENKO, N. V.; KURILENKO, V. V. (2013) Involvement of the cellspecific pigment genes pks and sult in bacterial defense response of sea urchins Strongylocentrotus intermedius. Dis Aquat Organ 103:121–132. 2013
- KUWAHARA, R.; HATATE, H.; CHIKAMI, A.; MURATA, H.; KIJIDANI, Y. Quantitative separation of antioxidant pigments in purple sea urchin shells using a reversed-phase high performance liquid chromatography. *LWT Food Science and Technology*. 43(8):1185–90. 2010.
- KUWAHARA, R.; HATATE, H.; YUKI, T.; MURATA, H.; TANAKA, R.; HAMA, Y. Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin Anthocidaris crassispina. *LWT - Food Science and Technology.* 42(7):1296–300. 2009.
- LAMBRECHTS, A., VAN TROYS, M., AMPE, C. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36 (10): 1890–1909. 2004.
- LEBEDEV, A. V.; LEVITSKAYA, E. L.; TIKHONOVA, E. V.; IVANOVA, M. V. Antioxidant properties, autooxidation, and mutagenic activity of echinochrome a compared with its etherified derivative. *Biochemistry*. 66:885–93. 2001.
- LEBEDEV, A.V.; IVANOVA, M.V.; LEVITSKY, D.O. Echinochrome, a naturally occurring iron chelator and free radical scavenger in artificial and natural membrane systems. Life Sciences, 76(8), 863–875. 2005.
- LI, Z., SRIVASTAVA, P. Heat-Shock Proteins. *Current Protocols in Immunology,* 2004. doi:10.1002/0471142735.ima01ts58
- LI, D.M.; ZHOU. D.Y.; ZHU, B.W. Extraction, structural characterization and antioxidant activity of polyhydroxylated 1,4-naphthoquinone pigments from spines of sea urchin Glyptocidaris crenularis and Strongylocentrotus intermedius. Eur Food Res Technol 237:331–339. 2013.

- MATRANGA, V.; TOIA, G.; BONAVENTURA, R.; MULLER, W. E. G. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. Cell Stress e Chaperones. 5(2):113-20. 2000.
- 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) 48:345–349. 2002.
- MATRANGA, V.; PINSINO A, CELI, M. Monitoring chemical and physical stress using sea urchin immune cells. Prog Mol Subcell Biol 39:85–110. 2005
- MOORE, R.E.; SINGH, H.; SCHEUER, P. J. A pyranonaphthazarin pigment from the sea urchin *Echinothrix diadema*. *Pergamon press*. 43: 4581-4583. 1968.
- 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.* 24:541-52. 2008.
- PINSINO, A.; MATRANGA, V. Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress. Dev Comp Immunol. doi: 10.1016/j.dci.2014.11.013. 2015.
- PLYTYCS B, SELJELID R. Bacterial clearance by the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis. Dev Comp Immunol.* 17:283-9. 1993.
- Powell, C.; Hughes, A.D.; Kelly, M.S.; Conner, S.; McDougall, G.J. Extraction and identification of antioxidant polyhydroxynaphthoquinone pigments from the sea urchin, Psammechinus miliaris. LWT - Food Science and Technology, 59(1), 455– 460. 2014.
- RAGUSA, M.; NICOSIA, A.; COSTA, S. Metallothionein Gene Family in the Sea Urchin Paracentrotus lividus: Gene Structure, Differential Expression and Phylogenetic Analysis. Int J Mol Sci 18:812. 2017.
- RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In Meuer,S., Wittwer,C. and Nakagawara,K. (eds), Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. Springer Press, Heidelberg, pp. 21–34. 2001.
- ROUGERIE, P.; MISKOLCI, V.; COX, D. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: role and regulation of the actin cytoskeleton. Immunol Rev. 256 (1): 2013.
- RUTTKAY-NEDECKY, B.; NEJDL, L.; GUMULEC, J.; ZITKA, O.; MASARIK, M.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVA, M.; ADAM, V.; KIZEK, R. The role of metallotionein in oxidative stress. *International journal of molecular sciences.* 14: 6044-6066. 2013.

- SERVICE, M.; WARDLAW, A. Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 79(2):161–5. 1984.
- SHANKARLAL, S.; PRABU, K.; NATARAJAN, E. Antimicrobial and antioxidant activity of purple sea urchin shell (*Salmacis virgulata* L. Agassiz and Desor 1846). *American-Eurasian Journal of Scientific Research*. 6:178-81. 2011.
- SHIKOV, A. N.; POZHARITSKAYA, O. N.; KRISHTOPINA, A. S.; MAKAROW, V. G. Naphthoquinone pigments from sea urchins: chemistry and pharmacology. *Phytochem rev.* 17:509-534. 2018.
- Silva, J. R. M. C.; Peck, L. Induced in vitro phagocytosis of the Antarctic starfish *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 0°C. *Polar Biol*.23(4):225-230. 1999.
- SMITH, S.L.; SMITH, A.C.. Sensitization and histamine release by cells of the sand dollar, Mellita quinquiesperforata. *Developmental and comparative immunology*, 9, pp.597–603. 1985.
- SMITH, L. C.; RAST, J. P.; BROCTON, V.; TERWILLEGER, D. P.; NAIR, S. V.; BUCLEY, K. M.; MAJESTKE, A. J.The sea urchin immune system. ISJ. 3:25-9. 2006.
- SMITH, V.; DESBOIS, A.; DYRYNDA, E. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. *Marine Drugs.* 8(4):1213–62.2010.
- SMITH, L. C., GHOSH, J., BUCKLEY, K. M., CLOW, L. A., DHEILLY, N. M., HAUG, T., STENSVÅG, K. Echinoderm Immunity. *Invertebrate Immunity*. 260–301. 2010.
- SPECTOR, I., BRAET, F., SHOCHET, N. R., BUBB, M. R.. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microscopy Research and Technique*. 47 (1): 18–37. 1999. doi:10.1002/(sici)1097-0029(19991001)47:1<18::aid-jemt3>3.0.co;2-e
- ZHOU, D.; QIN, L.; ZHU, B.; WANG, X.; TAN, H.; YANG, J.; LI, D.; DONG, X.; WU, H.; SUN, L.; LI, X. MURATA, Y. Extraction an antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from spines of purple sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Food Chemistry*, 129:1591-1597. 2011.