

**DÉBORA ALVARES LEITE FIGUEIREDO**

**Caracterização e avaliação da atividade biológica de  
peptídeos antimicrobianos de ouriços-do-mar *Lytechinus  
variegatus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior

Versão corrigida

A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

**São Paulo  
2019**

## RESUMO

FIGUEIREDO, DAL. **Caracterização e avaliação da atividade biológica de peptídeos antimicrobianos de ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus***. 2019 156f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

Os ouriços-do-mar são animais pertencentes ao filo Echinodermata, são animais marinhos bentônicos que vivem em um ambiente agressivo expostos a uma grande diversidade de microrganismos e necessitam de uma resposta imune eficiente para lidar com potenciais patógenos, tanto no adulto, como nos processos reprodutivos e no desenvolvimento das larvas, que vivem livres na coluna d'água. As gônadas dos ouriços-do-mar, além da função reprodutiva, são também locais de armazenamento de nutrientes e os gametas contém nutrientes que podem ser explorados por outros organismos, assim é de se esperar que tanto as gônadas como os gametas apresentem mecanismos e moléculas para proteção e defesa. O estudo das moléculas relacionadas ao sistema imune nas gônadas é importante tanto para compreender os mecanismos de defesa nos processos reprodutivos como também na descoberta de novas moléculas antimicrobianas que tenham potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novos fármacos uma vez que a resistência aos antibióticos têm crescido nos últimos anos e se tornado um grave problema de saúde. O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar moléculas bioativas a partir do líquido celomático e das gônadas do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. Para isso as amostras obtidas por extração ácida foram fracionadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e testadas quanto a atividade antimicrobiana e hemolítica sendo as frações obtidas das gônadas de machos e fêmeas submetidas a análises por espectrometria de massas para caracterização e identificação dos compostos isolados. Os resultados mostraram que tanto as gônadas como líquido celomático apresentam uma grande quantidade de moléculas com atividade antimicrobiana atuando nesses tecidos indicando um importante papel na resposta à invasores. Nas gônadas essas moléculas foram encontradas nos machos e nas fêmeas, sendo as proteínas encontradas fragmentos de uma glicoproteína denominada *Major Yolk Protein (MYP)*, também conhecida como toposomo, presente em grande quantidade nas gônadas dos animais. As análises indicam que nas gônadas ocorre a proteólise da MYP gerando diferentes fragmentos proteicos com

atividade antimicrobiana. Isso indica uma forma rápida de resposta contra potenciais microrganismos invasores nas gônadas ou como proteção inicial para os gametas que são liberados na água. Juntos nossos resultados evidenciam a grande quantidade de moléculas com ação antimicrobiana presentes em ambos os sexos e em diferentes tecidos nos animais. Nas gônadas a formação dessas moléculas ocorre pela proteólise da MYP indicando uma função imune dessa proteína em *Lytechinus variegatus*. Além de proporcionar um melhor entendimento sobre a resposta imune nesses animais, o estudo e a caracterização dessas moléculas pode também contribuir para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos, especialmente em relação ao desenvolvimento de novos fármacos com ação antimicrobiana, auxiliando no tratamento contra bactérias multirresistentes.

Palavras-chave: Sistema imune inato. Produtos naturais marinhos. Diferenças entre gêneros. Proteínas antimicrobianas. Reprodução.

## ABSTRACT

FIGUEIREDO, DAL. **Characterization and evaluation of the biological activity of antimicrobial peptides of sea urchin *Lytechinus variegatus***. 2019. 156p. Thesis (Ph. D. thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Sea urchins are animals belonging to the phylum Echinodermata, they are marine benthic animals that live in an aggressive environment exposed to a wide range of microorganisms that demand an efficient immune response to deal with potential pathogens, either under normal adult conditions, or during the reproductive processes and in the development of free-living water larvae. Sea urchin gonads, in addition to reproductive function, are also sites for nutrient storage and gametes contain nutrients that can be exploited by other organisms, so it is expected that both gonads and gametes have defense mechanisms and molecules important to protect such cells and organs. The study of immune-related molecules in the gonads is important both to understand the defense mechanisms in reproductive processes and to discover new antimicrobial molecules that have biotechnological potential for the development of new drugs once antibiotic resistance has been grown in recent years and has become a serious health problem. The present study aimed to isolate and characterize bioactive molecules from the coelomic fluid and gonads of *Lytechinus variegatus* sea urchin. For this, samples obtained by acid extraction were fractionated by high performance liquid chromatography (HPLC) and tested for antimicrobial and hemolytic activity being the fractions obtained from male and female gonads submitted to mass spectrometric analysis for characterization and compound identification. The results showed that both gonads and coelomic fluid have a large amount of molecules with antimicrobial activity acting on these tissues indicating an important role in response to invaders. In the gonads these molecules were found both in males and females, and the proteins found are fragments of a glycoprotein called Major Yolk Protein (MYP), also known as toposome, present in large quantities in the gonads of animals. The analyzes indicate that in the gonads MYP proteolysis generates different protein fragments with antimicrobial activity. This indicates a rapid response against potential invasive microorganisms in the gonads or as initial protection for gametes that are released into the water. Together our results show the large amount of antimicrobial molecules present in both sexes and in different tissues in animals. The formation of

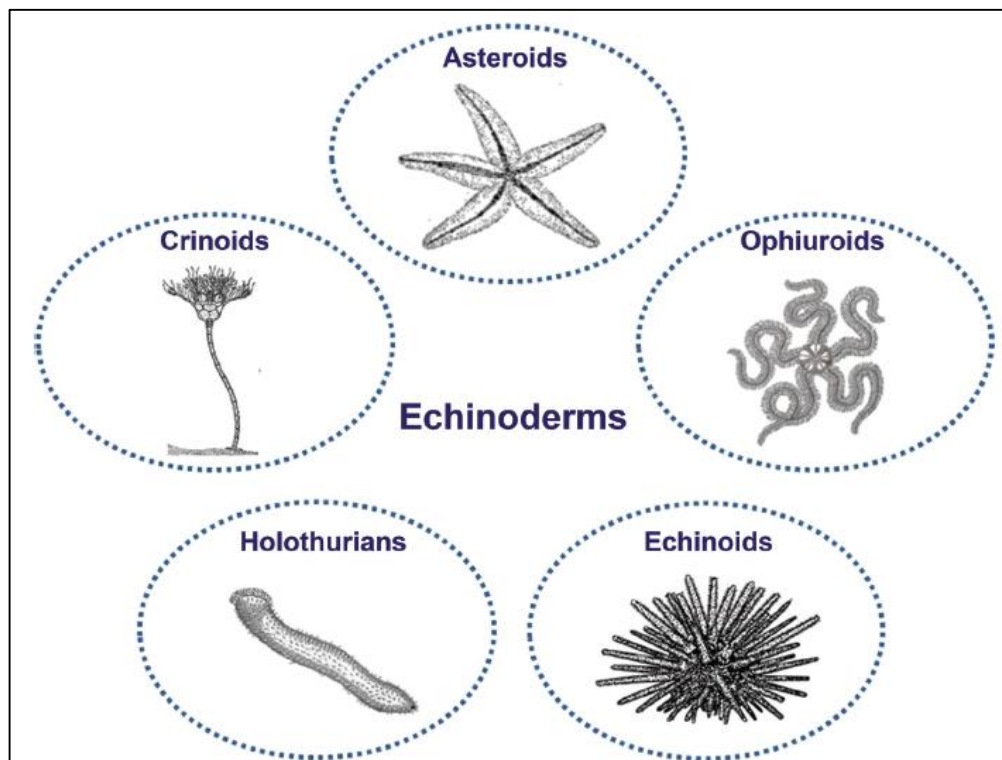
these molecules in the gonads occurs by MYP proteolysis indicating an immune function of this protein in *Lytechinus variegatus*. In addition to providing a better understanding of the immune response in these animals, the study and characterization of these molecules may also contribute to the development of new biotechnological products, especially in relation to the development of new antimicrobial drugs, assisting in the treatment against multiresistant bacteria.

Keywords: Innate immune system. Marine natural products. Gender differences. Antimicrobial proteins. Reproduction.

## 1 INTRODUÇÃO

O filo Echinodermata é bastante diverso, apresenta aproximadamente seis mil espécies divididas em cinco classes principais: Crinoidea (lírios-do-mar), Holothuroidea (pepinos-do-mar), Ophiuroidea (ofiúros), Asteroidea (estrelas-do-mar) e Echinoidea (ouriços-do-mar) (Figura 1) (BOTTJER et al., 2006; SMITH et al., 2018). Os equinodermos são animais exclusivamente marinhos, ocorrem em diferentes profundidades, tipos de solo e zonas climáticas (da região equatorial às zonas polares), podendo ser encontrados desde o litoral até as zonas mais profundas. Estes animais se destacam entre os demais invertebrados marinhos por suas características peculiares e por seus representantes, a estrela e o ouriço-do-mar, serem considerados virtualmente símbolos da vida marinha (RUPERT; BARNES, 1996). Eles desempenham um importante papel na ecologia marinha uma vez que consomem grande quantidade de detritos e plâncton e as espécies carnívoras, assim como as herbívoras, são responsáveis por controlar a distribuição de outras espécies, como moluscos, algas e peixes além de outras características ecológicas de seu habitat (BURKE et al., 1988; ZITO et al., 2005; SMITH 2018).

**Figura 1** - Principais classes do filo Echinodermata



Retirado de: Agnello 2017

Os equinodermos se distinguem notavelmente dos outros grupos animais devido a sua organização corporal (BURKE et al., 1988). Dentre as principais características do grupo podemos destacar a simetria radial, a presença de um esqueleto interno formado por ossículos calcários, a presença de espinhos na superfície do corpo (característica que deu nome ao grupo: do grego: *Echino*, espinho e *derma*, pele), e a característica mais marcante e distintiva do grupo: o sistema hidrovacular, composto por canais preenchidos por um líquido aquoso que é utilizado, principalmente, na locomoção dos animais (ZITO et al., 2005; RUPERT; BARNES, 1996; HYMAN, 1955; SUMRALL; WRAY, 2007, SMITH et al., 2018).

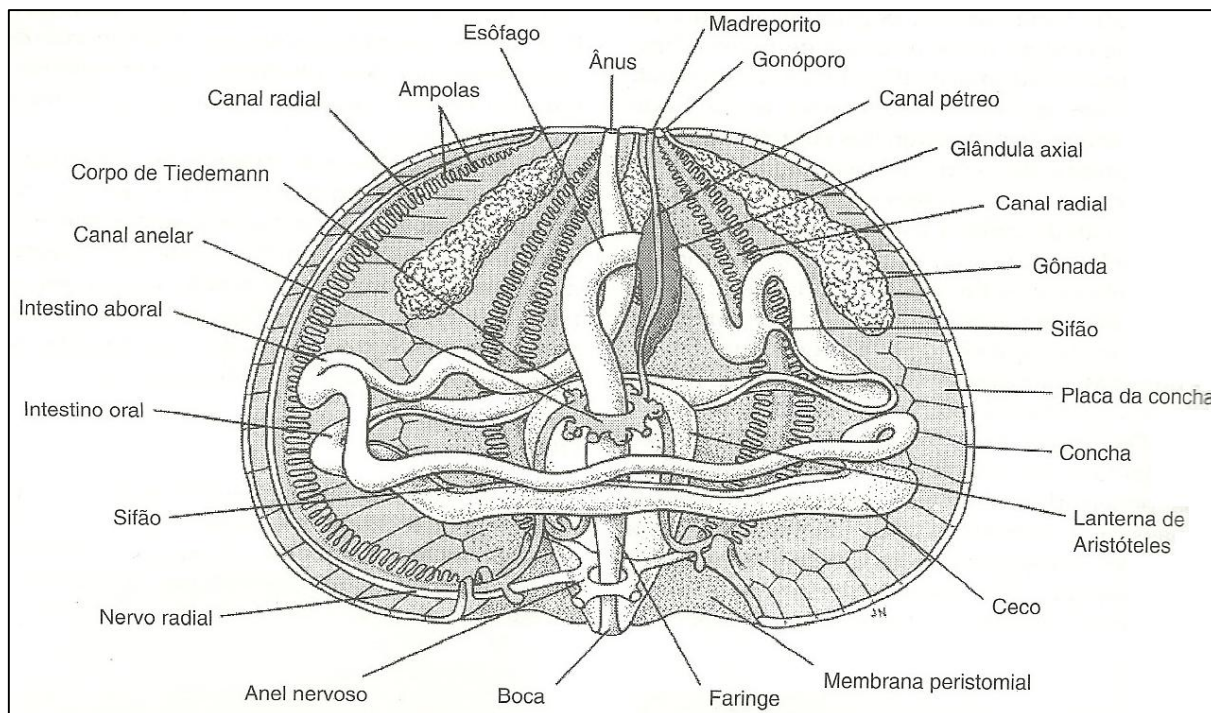
### **1.1 Ouriços-do-mar**

Os ouriços-do-mar são animais bentônicos, que vivem aderidos ao substrato, podendo ser encontrados tanto em solos arenosos como em superfícies rochosas. São animais que desempenham papel fundamental na estruturação das comunidades marinhas, atuando como herbívoros pastadores, na reciclagem de nutrientes e servindo de alimento para uma grande variedade de animais (PEARSE, 2006; VALVERDE; MEUER, 2007). Possuem um corpo ovalado recoberto por uma grande quantidade de espinhos que são utilizados na proteção, na captura de alimentos e na locomoção; entre os espinhos, na carapaça do animais, existem as pedicelárias, que são pequenos apêndices usados para defesa, captura de presas e limpeza da superfície corporal (MCBRIDE 2005). O interior da carapaça apresenta um volumoso celoma e um sistema digestivo bem desenvolvido (Figura 2). A circulação é feita através do líquido celomático, ou fluido celômico, que preenche toda a cavidade celomática e circunda os órgãos internos (RUPERT; BARNES, 1996; HYMAN, 1955; SMITH et al., 2019), a composição do líquido celomático é semelhante à da água do mar e contém populações de células livres denominadas celomócitos (CHIA; XING, 1996; HYMAN 1955).

O sistema hidrovacular é composto por canais preenchidos por um líquido aquoso que é utilizado, principalmente, na locomoção dos animais. Os canais internos do sistema hidrovacular conectam-se com o exterior através do madreporito, na superfície aboral do animal, por onde a água penetra o corpo do animal (Figura 2) (RUPERT; BARNES, 1996; MAH 2009).

Todo o sistema ambulacral encontra-se preenchido por um fluido semelhante à água do mar, exceto por conter celomócitos, proteínas e potássio. Na locomoção, o sistema opera como um sistema hidráulico (RUPERT; BARNES, 1996).

**Figura 2 - Anatomia interna de um ouriço-do-mar**



Retirado de RUPPERT; BARNES (1996).

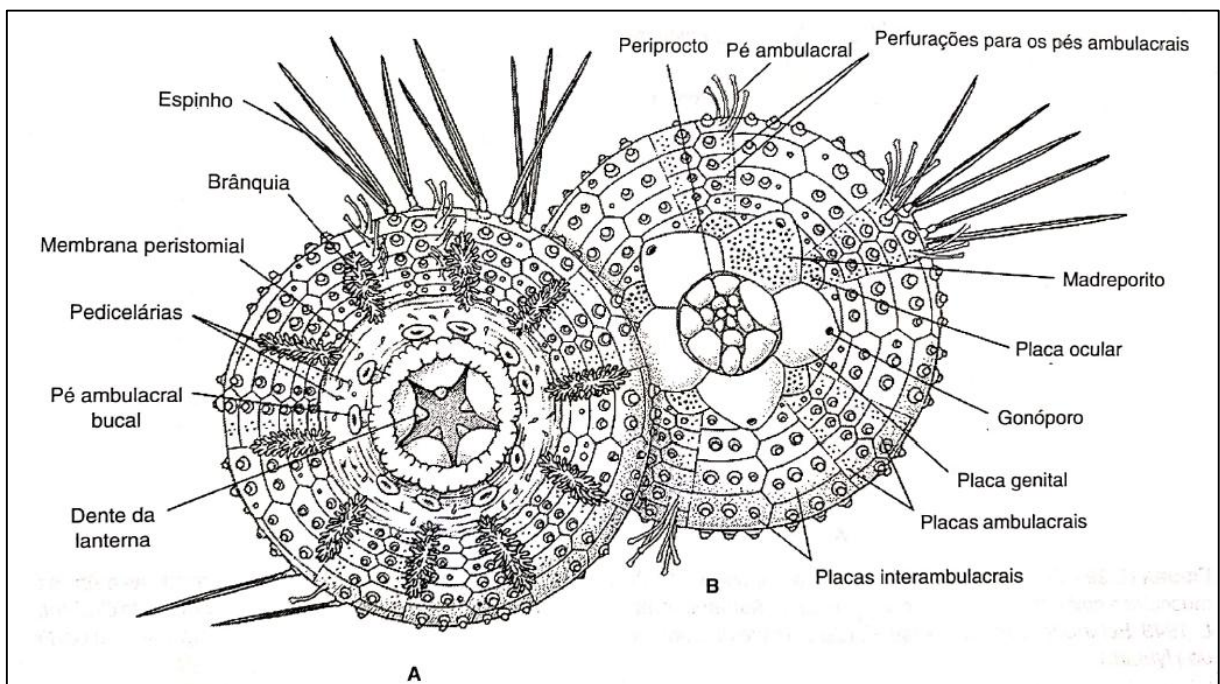
O corpo desses animais pode ser dividido em dois hemisférios: um oral, e um aboral. O polo oral contém a boca, posicionada contra o substrato e circundada pela membrana peristomial, que possui várias estruturas dispostas de modo radial. Existem cinco pares de curtos pés ambulacrais modificados e cinco pares de brânquias (projeções cerdosas). O polo aboral contém a região anal, conhecida como periprocto, ao redor deste, encontra-se uma série de placas denominadas placas genitais, sendo uma delas porosa, funcionando como madreporito. Cada placa genital contém um gonópore (Figura 3). Também na região aboral localizam-se as gônadas (RUPERT; BARNES, 1996; MCBRIDE 2005)

As trocas gasosas nesses animais são realizadas pelas brânquias e também pelos pés ambulacrais. A remoção de detritos nitrogenados é obtida por difusão através de áreas finas da superfície corporal, como os pés ambulacrais. Os celomócitos são ativos na remoção de detritos e transportam esses acúmulos para as



brânquias, pés ambulacrais e órgão axial para descarte. O sistema nervoso é formado basicamente por um anel circum-oral (centro nervoso) que envolve a faringe. A partir dele partem nervos radiais que correm ao longo do lado inferior da concha, ficando imediatamente abaixo dos canais radiais do sistema hidrovacular. O sistema sensorial é composto de numerosas células sensoriais presentes no epitélio dos espinhos, pedicelárias e pés ambulacrais (RUPERT; BARNES, 1996).

**Figura 3** - Vista oral e aboral do ouriço-do-mar regular *Arbácia punctulata*.



(A) Vista oral e (B) vista aboral

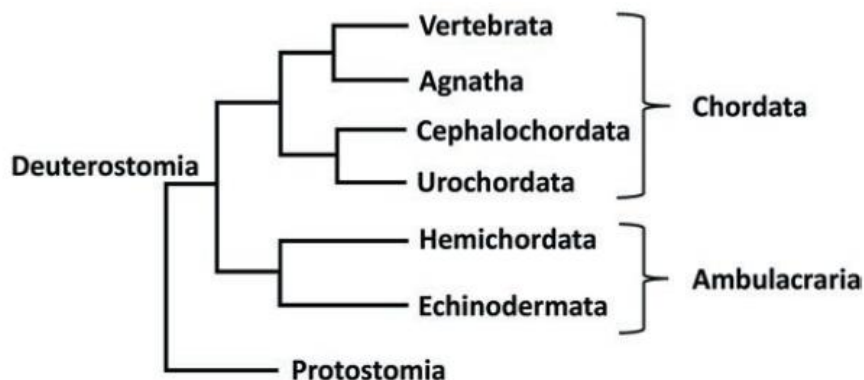
Segundo Reid, W. M. In Brown, F.A. Selected Invertebrate Types. John Wiley and Sons, New York. Retirado de: RUPPERT; BARNES (1996).

Esses animais vêm sendo muito utilizados em diversas áreas da biologia, sendo considerados excelentes modelos de estudo principalmente na biologia celular, biologia do desenvolvimento e na imunologia, além disso, são também utilizados em diversos estudos ecotoxicológicos por serem considerados ótimos bioindicadores ambientais, uma vez que são animais de pouca mobilidade, podendo refletir alterações no ambiente. (KOBAYASHI; OKAMURA, 2004; RÁMIREZ-GÓMEZ; GARCIA-ARRARÁS, 2010; BRANCO et al., 2014.a,b; FIGUEIREDO et al., 2016, GHISAURA et al., 2016).

Outra característica importante, que tem atraído a atenção para o estudo desses animais, é o fato de que equinodermos ocupam uma posição única na escala evolutiva, uma vez que são os únicos invertebrados deuterostomados (SODERGREN

et al, 2006; MI et al., 2014). De acordo com descobertas moleculares e fósseis é possível dizer que existe maior proximidade entre equinodermos e vertebrados do que entre equinodermos e os demais invertebrados (Figura 4) (ZITO et al., 2005; SMITH et al., 2006; SODERGREN et al., 2006). Devido a essa relação filogenética com os vertebrados o genoma desses animais proporciona uma ferramenta importante para o estudo dos genes humanos, por exemplo; abrindo caminho para estudos de mecanismos e processos evolutivos. Assim diversos estudos buscam nesses animais mecanismos primitivos, filogeneticamente ancestrais aos vertebrados (LOKER et al., 2004; DAVIDSON 2006; SILVA, 2013, BRANCO et al., 2014a; GOLCONDA et al., 2019; GILDOR et al., 2015).

**Figura 4** - Posição filogenética dos equinodermos em relação a outros grupos animais.



Retirado de: SMITH et al., 2018

### 1.1.1 *Lytechinus variegatus*

Ouriços-do-mar da espécie *Lytechinus variegatus* (Lamarck 1816), comumente chamados de ouriço-verde (SOUZA; OLIVEIRA; PEREIRA, 2008) (Figura 5), são encontrados em águas rasas da Carolina do Norte (EUA) até Santos (Brasil) e em todo o Caribe e Golfo do México (HILL; LAWRENCE, 2003 SERAFY, 1979). Esses animais são comumente encontrados em profundidades de menores que 50 metros, mas podem habitar regiões com profundidade variando de 0 até 250 metros e solos arenosos ou em rochas (SERAFY, 1979).

Esses animais são onívoros, alimentando-se de algas e também de organismos epibiontes que vivem associados a elas influenciando a distribuição de algas marinhas

e das comunidades animais associadas a ela. Por viverem em ambientes costeiros e estarem expostos a diferentes estresses ambientais a estimativa de vida desses animais varia entre 3 e 4 anos nessas regiões, sendo que para as espécies que vivem em regiões mais profundas esse tempo de vida não é conhecido (WATTS; MCCLINTOCK; LAWRENCE, 2013).

**Figura 5** - Ouriço-do-mar da espécie *Lytechinus variegatus*.



Foto: Débora A. L. Figueiredo

### 1.1.2 Reprodução e estrutura das gônadas

O ciclo reprodutivo de *L. variegatus* varia amplamente dependendo do local e das condições ambientais. Em algumas populações do norte do Golfo do México os picos de desova ocorrem em picos de alta temperatura no verão e na primavera. O tempo de permanência das larvas na coluna d'água ainda não é bem conhecido variando de algumas semanas até alguns meses, também dependendo das condições ambientais (WATTS; MCCLINTOCK; LAWRENCE, 2013).

Os ouriços-do-mar apresentam fecundação externa, são dioicos e não há dimorfismo sexual, a identificação dos machos e fêmeas só é possível através da observação da liberação dos gametas, ou da dissecação do animal e observação das gônadas (RAPOSO, 2017). O desenvolvimento é indireto, formando uma larva denominada plúteo (ROSA, 1973) que passa por metamorfoses até assumir a forma bentônica semelhante aos adultos (METAXAS, 2013)

Esses animais apresentam cinco gônadas suspensas ao longo dos interambulacros (locais onde os pés ambulacrais emergem), no interior da concha (Figura 6A). Um único gonoduto emerge de cada gônada e estende-se aboralmente dentro do seio celômico e abre-se através de um gonóporo localizado em uma das cinco placas genitais que circundam o ânus (Figura 6B) (WATTS; MCCLINTOCK; LAWRENCE, 2013).

**Figura 6** - Representação esquemática do sistema reprodutor (A) e detalhe da região aboral (B) de um ouriço-do-mar.

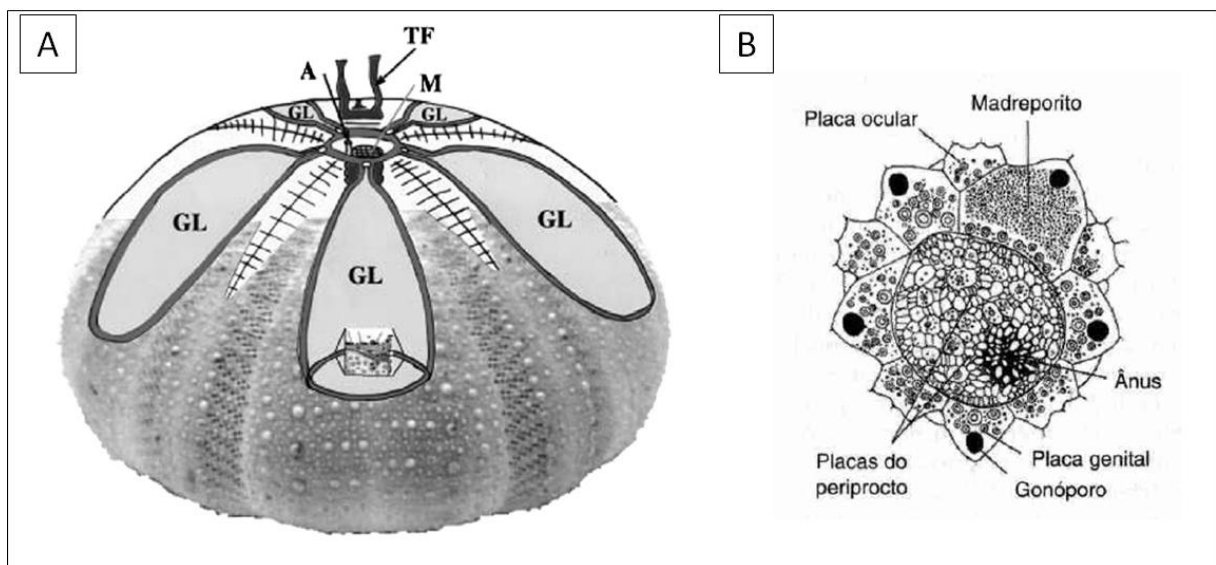
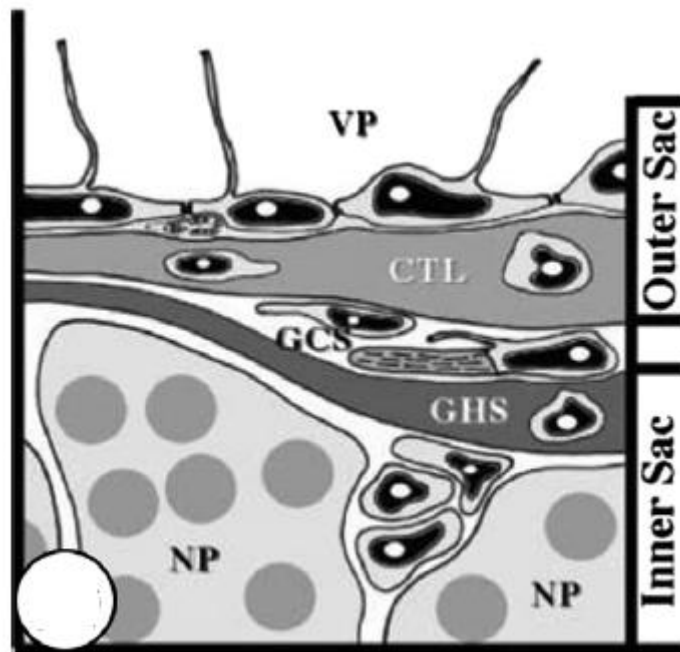


Figura A: GL: lúmen da gônada, M: madreporito, A: ânus; TF: pé ambulacral, Retirado de: Walker et al 2013. Figura B: retirada de RUPERT; BARNES, 1996.

Nos ouriços-do-mar de ambos os sexos, a parede das gônadas é formada por dois sacos teciduais (um interno e um externo) que compõem a parede das gônadas, cada um é composto por diferentes camadas. Em toda a gônada, o seio genital celômico (SGC) separa o saco externo do saco interno. O saco externo inclui um peritônio visceral (PV) que está voltado para o celoma perivisceral e que está ligado a uma camada de tecido conjuntivo (CTC). As células epiteliais não musculares também alinham o CTC na sua superfície oposta em direção ao SGC. O saco interno é um seio genital hemal (SGH) que apresenta na membrana basal externa células mioepiteliais ciliadas (Figura 7). Os nervos interconectados são responsáveis por sincronizar a atividade das gônadas durante a desova (WALKER; LESSER; UNUMA, 2013).

O SGH suporta o epitélio germinativo na sua face luminal. As principais funções do saco interno são a gametogênese, o armazenamento de nutrientes, muito limitado no SGH, e o armazenamento extensivo de nutrientes nas células somáticas chamadas fagócitos nutritivos (FNs). O conteúdo do SGH varia ligeiramente em quantidade durante a gametogênese (WALKER; LESSER; UNUMA, 2013).

**Figura 7-** Representação dos tecidos da parede das gônadas de ouriços-do-mar.



VP: peritônio visceral; CTL: camada de tecido conjuntivo; NP: fagócito nutritivo; GCS: seio genital celômico; GHS: seio genital hemal.  
Retirado de: WALKER; LESSER; UNUMA, 2013

O epitélio germinativo é composto por dois tipos celulares principais: as células germinativas (oogônia e espermatogônias até o desenvolvimento em oócito e espermatozoide respectivamente), e as células somáticas chamadas de fagócitos nutritivos (FN) (UNUMA, 2002). Durante o ciclo gametogênico anual as gônadas passam por mudanças estruturais que ocorrem de acordo com a atividade das células germinativas e FNs (WALKER; LESSER; UNUMA, 2013). Mudanças no conteúdo bioquímico também ocorrem durante as diferentes fases do ciclo (UNUMA et al., 2003, VERACHIA et al., 2012). Os FNs acumulam as oogônias e espermatogônias e também nutrientes, que são utilizados durante a gametogênese. Essas células formam câmaras de incubação próxima à parede das gônadas promovendo um microambiente

estrutural e nutricional onde as células germinativas e os nutrientes ficam armazenados (WALKER; LESSER; UNUMA, 2013).

Antes do início da gametogênese ocorre um aumento no volume das gônadas devido ao acúmulo de nutrientes como proteínas, carboidratos e lipídios nos FNs. Após o início da gametogênese os FNs diminuem gradualmente de tamanho ao fornecer nutrientes para o processo de formação dos gametas até que seu lúmen fica ocupado pelos óvulos ou espermatozoides (UNUMA et al., 2003,). A principal proteína acumulada nos FNs é uma glicoproteína originalmente identificada como o principal componente dos grânulos do vitelo e foi denominada *Major Yolk protein (MYP)* (WALKER; LESSER; UNUMA, 2013) ou toposomo (UNUMA et al., 2003; SHANG et al., 2018; NOLL et al., 2007; DEV; ROBINSON, 2014; GUISAURA et al., 2016)

A MYP é a glicoproteína encontrada em maior concentração nas gônadas de ouriços-do-mar machos e fêmeas, ela é armazenada em grânulos durante a gametogênese (UNUMA et al., 2003; MIGLIACCIO et al., 2016; WALKER; LESSER; UNUMA, 2013; SHANG et al., 2018) e sua concentração se altera durante o processo de formação dos gametas (UNUMA et al., 2003; GUISAURA et al., 2016). Além disso essa glicoproteína está presente também em grânulos no citoplasma dos óvulos, embriões e na larva (DEV; ROBINSSON, 2014). No embrião ela está relacionada também com a adesão célula-célula (ZITO et al., 2005) sendo um importante componente da maquinaria necessária para facilitar as interações membrana-membrana no embrião e nos óvulos (DEV; ROBINSSON, 2014).

A síntese da MYP ocorre principalmente no epitélio do trato digestivo (estômago, intestino e reto), e nos FNs das gônadas (UNUMA et.al., 2010; WALKER; LESSER; UNUMA, 2013), ela apresenta duas isoformas com massas moleculares diferentes, uma de 170 kDa e uma de 180 kDa. Os ovos contêm a MYP de 170 kDa, o líquido celomático contém a MYP de 180kDa e o FNs contém ambos os tipos. Inicialmente essa proteína foi chamada de vitelogenina do ouriço-do-mar, como a vitelogenina presente em vertebrados, entretanto estudos verificaram que a MYP não é homologa das vitelogeninas dos vertebrados, mas sim homologa à proteínas transferrinas, da família das proteínas ligantes de ferro (WALKER; LESSER; UNUMA, 2013)

As gônadas dos ouriços-do-mar são comercializadas, muito utilizadas na culinária, sendo consideradas como iguarias e possuem um alto valor comercial (MCBRIDE, 2004; MCBRIDE, 2005; UNUMA, 2002; SEWELL; ERIKSEN;

MIDDLEDICH, 2008, ARAFA et al., 2012; ZHAO et al., 2013). O aumento da demanda comercial nesse produto aumentou o interesse na aquicultura desses animais (PHILLIPS et al., 2010; ZHAO et al., 2013). Muitos estudos tem sido direcionados para a identificação e melhora do conteúdo nutricional, do sabor das gônadas para o mercado e sobre o desenvolvimento da aquicultura para obtenção das gônadas (MCBRIDE, 2004). Com isso o estudo desses órgãos e, conseqüentemente, dos processos reprodutivos desses animais estão crescendo.

### 1.1.3 Sistema imune

O conceito de imunidade foi inicialmente utilizado como uma forma de indicar que o Papa não estava sujeito às leis dos homens, ele era “imune”. Posteriormente, esse termo passou a ser utilizado para se referir aos esforços de um organismo para manter a sua homeostase após uma injúria ou infecção por microrganismos ou como o mecanismo pelo qual o organismo consegue resistir à doenças (SILVA, 2013).

O sistema imune reconhece as diferenças entre o “próprio” e o “não-próprio”, na tentativa de manter um ambiente interno equilibrado. Em animais multicelulares esse sistema é formado por diferentes tipos de células, tecidos, órgãos e seus produtos moleculares que protegem todo o organismo contra patógenos (COOPER, 2007).

O ambiente marinho pode ser considerado como um agente agressivo, e competitivo, que exige dos animais o desenvolvimento de respostas eficientes e potentes aos desafios ambientais e estressores bióticos e abióticos (ANEIROS; GARATEIX, 2004), não apenas nos animais adultos, mas, principalmente, durante as fases iniciais do desenvolvimento uma vez que a maioria das espécies aquáticas apresenta fecundação externa e desenvolvimento indireto, onde as larvas permanecem livres na coluna d'água.

Assim como os demais organismos marinhos, os ouriços estão constantemente expostos a um grande número de bactérias, fungos e vírus e evoluíram em grande proximidade a esses microrganismos (LI et al., 2010; SPERSTAD et al., 2011). Para sobreviver às ameaças os invertebrados marinhos dependem exclusivamente de um sistema de defesa inato, que é caracterizado por responder a antígenos comuns na superfície de células de agentes patogênicos como bactérias, fungos e vírus (BEUTLER, 2004; TINCU; TAYLOR, 2004). Considerada o mecanismo de defesa



filogeneticamente mais antigo, a imunidade inata é universal e está presente em todos os organismos, sendo a primeira a agir quando o organismo é desafiado (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Diferente do sistema imune adaptativo, presente nos vertebrados, o sistema imune inato não possui uma capacidade discriminativa que inclui linfócitos, entre outros fatores, que conferem especificidade e memória (RATCLIFFE, 1989; TINCU; TAYLOR, 2004). Os invertebrados não apresentam sistema imune adaptativo e, portanto, são completamente dependentes da imunidade inata para a proteção do organismo contra infecções (KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018). Ainda assim, mesmo sem a presença de anticorpos específicos bem como dos linfócitos, o sistema imune inato dos invertebrados é extremamente eficiente e efetivo no combate aos patógenos invasores, mesmo sendo mais simples que o sistema imune adaptativo (RATCLIFFE, 1989). À vista disso esse sistema relativamente simples se torna uma desafiadora área para a pesquisa e pode proporcionar modelos e informações valiosas para diversas áreas da biologia incluindo a evolução da resposta imune (SMITH, 1991, RAMÍREZ-GOMES; GARCIA ARRÁRAS, 2010).

O sequenciamento do genoma do ouriço do mar *Stroglylocentrotus purpuratus* (SODERGREN et al., 2006) foi um marco muito importante não apenas para o estudo desses organismos, mas também, para o estudo das relações filogenéticas com outros grupos. Além de possibilitar o entendimento de mecanismos que ainda não eram muito compreendidos, o sequenciamento mostrou que além das homologies encontradas com invertebrados, cerca de 23.000 genes apresentaram similaridades a genes de vertebrados, especialmente no que diz respeito ao sistema imune desses animais. Somado a isso, reguladores imunes e hematopoiéticos que foram identificados apenas a partir do grupo dos cordados também foram encontrados no ouriço-do-mar. muitas delas, como descrito anteriormente, homologas às encontradas nos vertebrados, como a SpC3, SpBf, presentes no sistema complemento. Ainda com relação ao sistema imune, o estudo mostrou que cerca de 4 a 5% dos genes identificados em *S. purpuratus* estão relacionados às funções imunes (RAST et al., 2006; SODERGREN et al., 2006). Os estudos no sobre o sistema imune dos equinodermos têm demonstrado que esse é um sistema complexo, sofisticado e robusto respondendo a uma grande variedade de patógenos (HIBINO et al., 2006; SMITH et al., 2018), evidenciando a importância do estudo desse sistema nesses animais.



Os estudos do genoma abriram um campo imenso de investigação desse sistema na busca por compreender como a resposta imune pode ser simples e tão complexa ao mesmo tempo, simples pelo fato de os animais apresentarem apenas a resposta imune inata e complexa devido à grande diversidade de receptores e outras moléculas atuantes reportadas (BRANCO et al., 2014a). Após o sequenciamento do genoma do ouriço-do-mar *S. purpuratus*, outros estudos genômicos foram desenvolvidos, transcriptomas de diferentes espécies foram realizados e uma base de dados foi desenvolvida com o objetivo de conectar informações genômicas e dados experimentais acelerando a pesquisa nas diferentes áreas da biologia, não apenas de ouriços-do-mar, mas também de outros equinodermos: a echinobase ([www.echinobase.org](http://www.echinobase.org), CAMERON et al., 2009; KUDTARKAR; CAMERON, 2017). Os estudos de expressão gênica estão também promovendo valiosas informações no estudo de processos relacionados ao desenvolvimento, aos processos reprodutivos (TU; CAMERON; DAVIDSON, 2014; SAMANTA ET AL., 2006; GAITÁN-ESPITIA et al., 2016; HOGAN et al., 2019), à biomineralização (ÁLVARES et al., 2018) assim como outros processos fisiológicos (DILLY; GAITÁN-ESPITIA; HOFMANN, 2015; PÉREZ-PORTELA; TURON; RIESGO, 2015),

Frente a uma invasão por patógenos, a primeira defesa do organismo envolve uma barreira física, promovida pelo revestimento externo do corpo, entretanto, quando os agentes infecciosos conseguem penetrar essa barreira, eles encontram uma grande quantidade de moléculas e células para restringir a infecção (MATRANGA et al., 2005, BRANCO et al., 2014a). Em ouriços-do-mar, o sistema imune age através de fatores celulares e humorais (GROSS et al., 1999; BRANCO et al. 2014a,b)

#### 1.1.3.1 Componentes celulares

Em ouriços-do-mar as células responsáveis pelo sistema defensivo são denominadas celomócitos. Três tipos básicos de celomócitos são encontrados livres no líquido celomático: (1) os amebócitos fagocíticos (AF); (2) os esferulócitos, que apresentam duas subpopulações classicamente descritas; os esferulócitos vermelhos (EV), os esferulócitos incolores (EI) e uma terceira subpopulação recém caracterizada em *Eucidaris tribuloides*, os esferulócitos granulares (EG) (Queiroz; Custodio, 2015); por fim, (3) as células vibráteis (CV) (Figura 8). (CHIA; XING, 1996; GROSS et al.,

1999; RAMÍREZ-GOMES; GARCIA-ARRÁRAS, 2010; BRANCO et al., 2014a, b; QUEIROZ; CUSTODIO, 2015).

O amebócito fagocítico (Figura 8 A, D e F) é a célula encontrada em maior quantidade no líquido celomático (CHIA; XING, 1996, MATRANGA 2005 et al.; RAMIREZ-GOMES; GARCIA-ARRARAS, 2010; BRANCO et al., 2014a,b). Suas principais funções são a fagocitose, encapsulação, quimiotaxia, produção de espécies reativas de oxigênio, aglutinação, rejeição a enxertos e expressão de genes imunes (MATRANGA et al, 2005; SMITH et al., 2006; RAMÍREZ-GOMES; GARCIA-ARRARAS, 2010) além da produção de peptídeos antimicrobianos (PAMs) (LI et al., 2010). Essas células apresentam subpopulações com formatos diferentes: as formas petaloide ou filopodial (CHIA; XING, 1996; SMITH et al., 2006, SMITH et al., 2018), o tamanho dessas células varia de 20 a 50  $\mu\text{m}$  (SMITH et al., 2018)

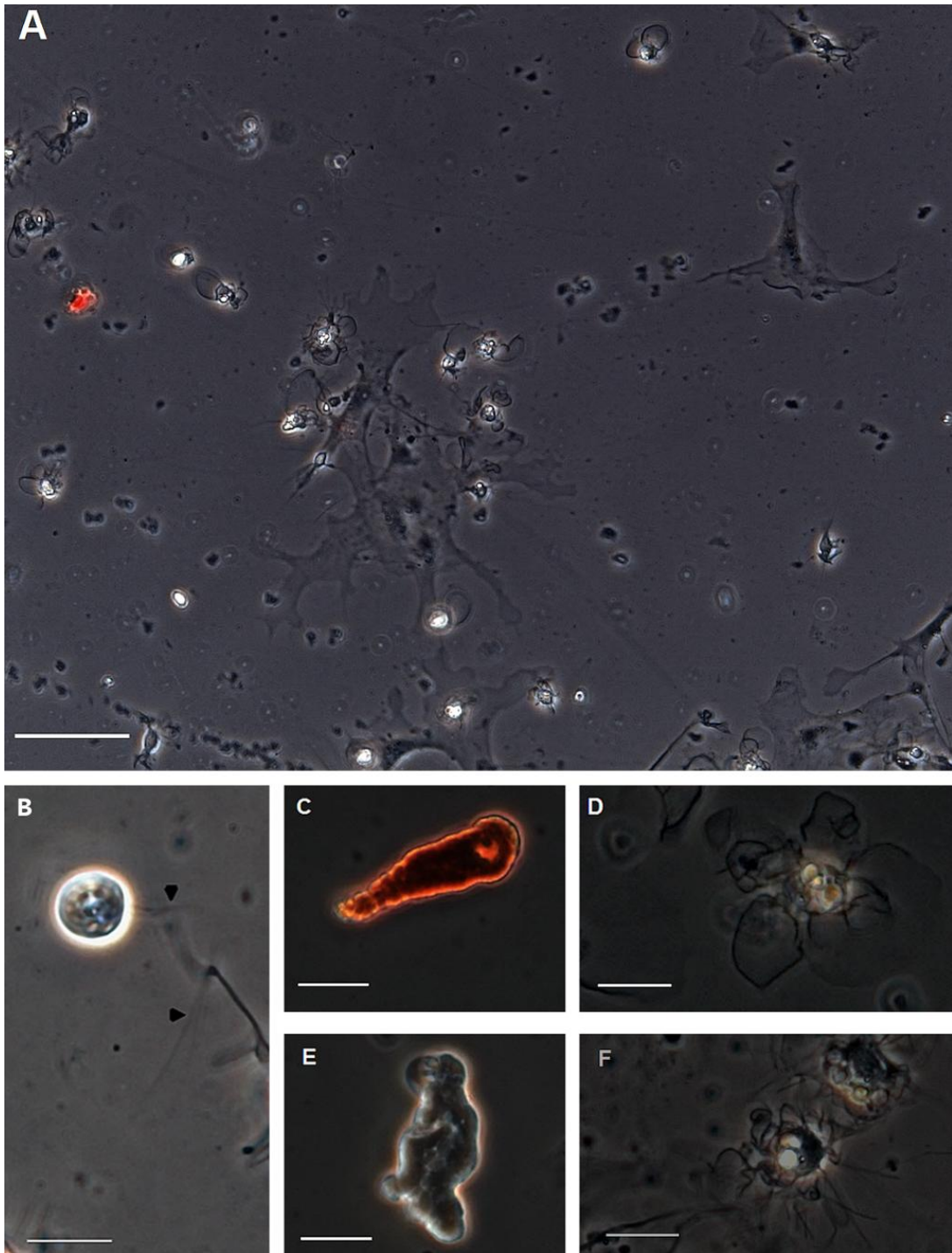
Os esferulócitos são células ameboides que apresentam grânulos em seu citoplasma. Seu tamanho varia de 8 a 20  $\mu\text{m}$  (CHIA; Xing, 1996; MATRANGA et al., 2005; SMITH et al., 2018). Classicamente essas células são divididas em dois diferentes tipos: os esferulócitos vermelhos (Figura 8-D) e os incolores (Figura 8-E) (CHIA; XING, 1996; MATRANGA et al., 2005), entretanto, em um estudo de 2015 um terceiro tipo foi identificado, denominado esferulócito granular (QUEIROZ; CUSTODIO, 2015).

As funções desempenhadas pelos esferulócitos estão relacionadas com a atividade antimicrobiana, inflamação, cicatrização de feridas, encapsulação e atividade citotóxica (GROSS et al., 1999; RAMÍREZ-GOMES; GARCIA-ARRÁRAS, 2010; SMITH et al., 2018). Os esferulócitos vermelhos apresentam um pigmento, responsável pela coloração dessas células, denominado Echinocromo A, um composto naftaquinônico que possui ação antioxidante e bactericida (CHIA; XING 1996; GROSS et al., 1999; MATRANGA et al., 2005). As funções dos esferulócitos incolores e granulares ainda não são bem conhecidas (BRANCO et al., 2014a; SMITH et al., 2006).

Por fim as células vibráteis (Figura 8-B) são células esféricas com 5-10  $\mu\text{m}$  de diâmetro que apresentam um flagelo único e longo. São células dotadas de grande mobilidade e sua função ainda é muito discutida, sendo relacionada principalmente com a circulação do fluido celômico e também com processos de coagulação, uma vez que degranulam durante esses eventos (CHIA; XING, 1996; BRANCO et al., 2014a; SMITH et al., 2018).

É importante ressaltar que a proporção dessas células pode variar entre espécies, assim como entre indivíduos da mesma espécie dependendo das suas condições fisiológicas (BORGES et al., 2005; MATRANGA et al., 2005; RAMIREZ-GOMES; GARCIA-ARRARAS, 2010).

**Figura 8** - Celomócitos do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.



A: Amebócito fagocítico espreado em lâmina de vidro com outros tipos celulares (barra de escala 50  $\mu\text{m}$ ). B: Célula vibrátil (barra de escala 10  $\mu\text{m}$ ). C: Esferulócito vermelho (barra de escala 10  $\mu\text{m}$ ). D: Amebócito fagocítico petaloide (barra de escala 10  $\mu\text{m}$ ). E: esferulócito incolor (barra de escala 10  $\mu\text{m}$ ). F: Amebócito fagocítico filopodial (barra de escala 10  $\mu\text{m}$ ). As fotos foram obtidas por microscopia de contraste de fase. Foto de: Emerenciano, A.K. Retirado de: BRANCO et al., 2014

### 1.1.3.2 Fatores humorais

Os fatores humorais são secretados pelos celomócitos e liberados no líquido celomático, incluem uma grande variedade de moléculas capazes de destruir microrganismos, reconhecer material não-próprio, aumentar as respostas celulares pela opsonização e durante o reparo de feridas (GROSS et al., 1999; RAMIREZ-GOMES; GARCIA-ARRARAS, 2010; BRANCO et al., 2014b).

Dentre os fatores humorais presentes em ouriços-do-mar as hemolisinas são moléculas com capacidade de se ligar a partículas não-próprias, contribuindo para a sua destruição (RYOYAMA, 1973; CANICATTI, 1991; GROSS et al., 1999) e as aglutininas (RYOYAMA, 1974) promovem a coagulação e encapsulação de invasores (CANICATTI, 1992; GROSS et al., 1999). As lectinas são também moléculas importantes atuando na identificação e opsonização de material estranho, *C-type lectins* foram encontradas no ouriço-do-mar *Stroglyocentrotus purpuratus* expressas em resposta a desafios imunológicos (GROSS et al., 1999; SMITH et al., 2006).

Outro componente humoral do sistema imune de ouriços-do-mar é a família de proteínas do sistema complemento, que está relacionado principalmente com a opsonização. Componentes desse sistema, da via alternativa e da via das lectinas já foi identificada em ouriços-do-mar (RAMIREZ-GOMES; GARCIA-ARRARAS, 2010, BRANCO et al 2014b). A SpC3, homóloga à proteína C3 dos vertebrados foi identificada por AL-SHARIF et al., (1998) a descoberta foi importante pois foi o primeiro componente do sistema complemento encontrado em um invertebrado, sugerindo uma homologia entre o sistema imune inato no grupo dos deuterostomios. O segundo membro do sistema complemento identificado foi uma proteína homóloga ao Fator B (Bf), denominada SpBf sendo expressa pelos celomócitos, indicando a presença de um sistema complemento simples que é homólogo à via alternativa dos vertebrados superiores (SMITH; SHIH; DACHENHAUSEN, 1998).

Ainda nos fatores humorais uma outra classe de moléculas extremamente importante no sistema imune são os peptídios antimicrobianos (PAMs). Essas moléculas são produzidas por todos os organismos (KUMAR et al., 2018) e são efetores cruciais da imunidade inata, possuindo uma ação rápida e um amplo espectro de atividade antimicrobiana (MARÓTI et al 2011; LE; FANG; SEKARAN, 2017).

Os PAM's são descritos como moléculas geralmente catiônicas, anfipáticas, termicamente estáveis e de tamanho pequeno, geralmente entre 11 e 60 aminoácidos

(HANCOCK, 199; KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018), os genes que codificam os PAMs são expressos em diversos tecidos e tipos celulares e são encontrados em praticamente todos os seres vivos (LI et al., 2012; PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012; MAHLAPUU et al., 2016); sua presença ao longo da escala evolutiva demonstra sua efetividade e significância no combate a patógenos (PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012), em invertebrados, por exemplo, os PAM's representam o principal mecanismo de defesa humoral (OTERO-GONZÁLEZ et al., 2010).

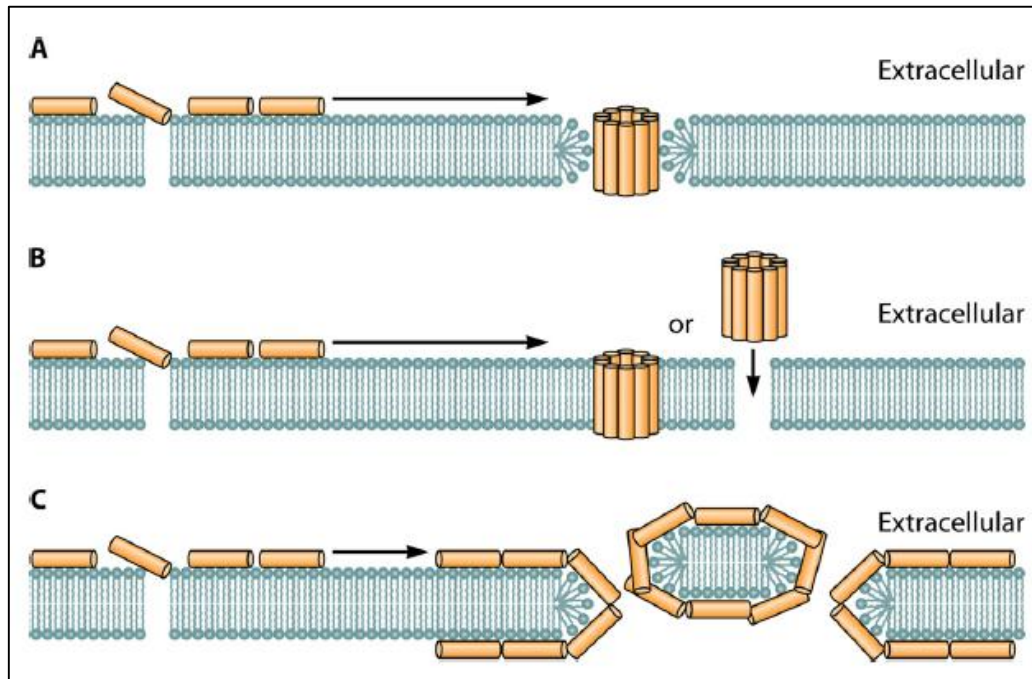
Essas moléculas desempenham um papel chave na modulação da resposta imune, pois além das funções antimicrobianas descritas, parecem atuar também na quimiotaxia, na cicatrização de feridas (BACHÈRE et al., 2004; LI et al., 2012), na qualidade e na efetividade da resposta imune (HANCOCK; DIAMOND, 2000). Além disso, por possuírem um tamanho pequeno são facilmente sintetizados pelo organismo (TINCU; TAYLOR, 2004).

A grande vantagem no uso dos PAM's está no seu mecanismo de ação, que é diferente dos antibióticos, por exemplo. Sua ação baseia-se principalmente na sua interação com as membranas celulares. Muitos peptídeos são catiônicos interagindo seletivamente com as membranas das células bacterianas, que são aniônicas. Essa interação eletrostática promove um aumento na permeabilidade e um rápido rompimento dessas células (SHAI, 1999; MATSUZAKI, 1999; POWERS; Hancock, 2003; LE et al., 2017). Após a interação com a membrana os PAMs se acumulam até atingir uma determinada concentração, a partir deste ponto eles podem atuar de duas formas: através da formação de poros transmembrana ou sem a formação de poros.

Dependendo do tipo de interação a formação dos poros pode ainda ocorrer de duas formas distintas, através do poro em barril ou do poro toroidal. A formação do poro em barril ocorre por interações hidrofóbicas sem uma significativa curvatura da membrana, os monômeros peptídicos inseridos na membrana estão dispostos paralelamente às moléculas fosfolipídicas. No poro toroidal a agregação em cascata dos faz com que as porções lipídicas da membrana externa e interna se dobrem para o interior da membrana, formando um canal de peptídeos (Figura 9). No modelo sem a formação de poros os peptídeos atuam no modelo carpete, neste caso os peptídeos cobrem a membrana formando um "carpete" e através das interações entre os peptídeos e a membrana, a integridade desta é prejudicada, promovendo um "efeito similar ao detergente" que desintegra a membrana formando micelas (Figura 9)

(BROGDEN, 2005; BAHAR; REN, 2013; LI et al., 2017; LE; FANG; SEKARAN, 2017; KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018).

**Figura 9** - Modelos de ação dos peptídeos antimicrobianos em membranas

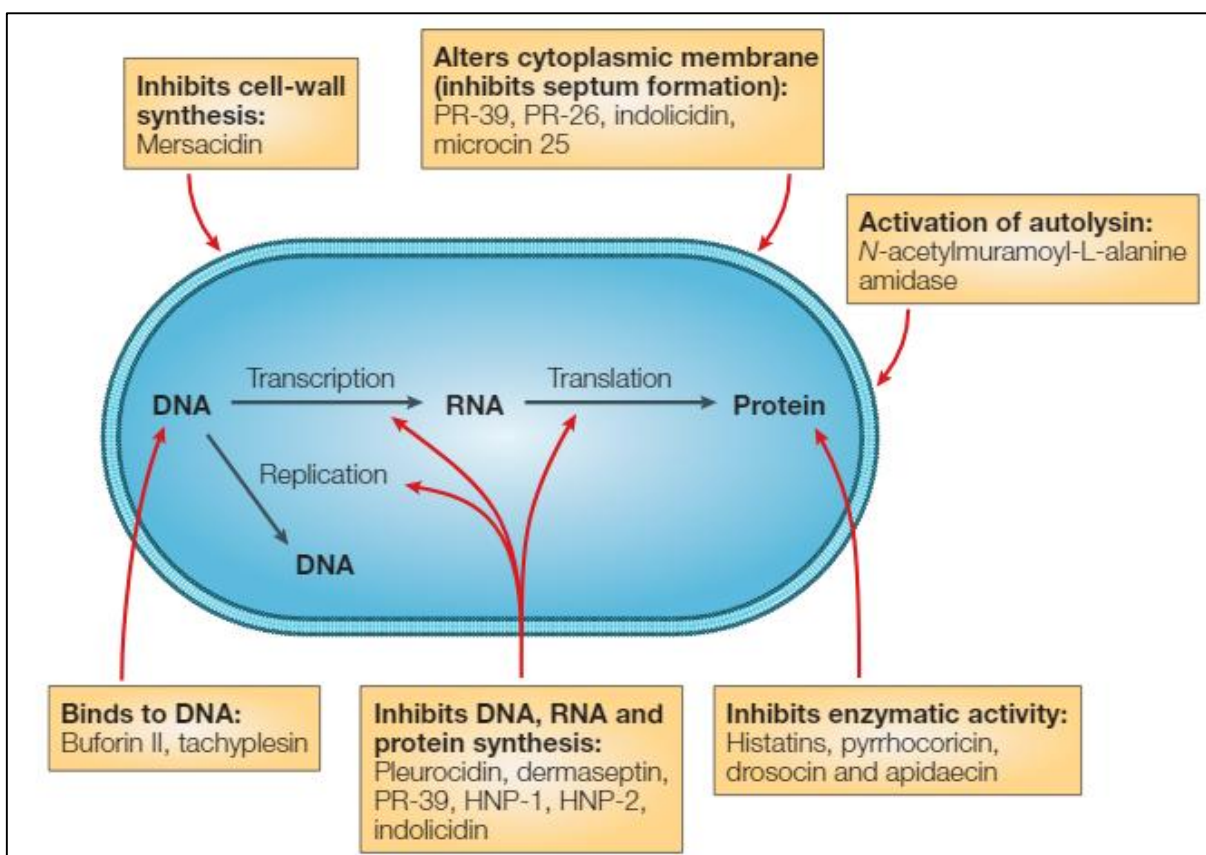


(A) Modelo do poro toroidal, (B) modelo do poro em barril e (C) modelo carpete  
Retirado de: LE et al., 2017

Além disso, podem também agir em moléculas alvo intracelulares (LI et al., 2012; HANCOCK; SAHL, 2006; REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004; POWERS; HANCOCK, 2003; SILVA JR, 2000). Uma vez no citoplasma os PAMs podem alterar a formação da membrana, inibir a síntese de componentes da parede celular, inibir a síntese de ácidos nucleicos ou a atividade enzimática (Figura 10) (BROGDEN, 2005, SEMREEN et al., 2018; BAHAR; REN, 2013; LE; FANG; SEKARAN, 2017).



**Figura 10** - Mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos com alvos intracelulares.



Retirado de: BROGDEN 2005

Os PAMs são altamente eficazes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de funcionarem contra fungos e protozoários, somado a isso muitos peptídeos demonstram serem eficazes contra procariontos e com baixa toxicidade para células eucarióticas. Alguns peptídeos são descritos atuando na resposta imune não através de uma ação antimicrobiana, mas agindo como imunomoduladores de diversos processos (HANCOCK; SAHL, 2006; HANCOCK; BROWN; MOOKHERJEE, 2006, KUMAR; KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser classificados de várias formas diferentes, que podem ser baseadas na sua estrutura (Figura 11), sequência ou nos mecanismo de ação (Tabela 1) (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011; KUMAR KIZHAKKEDATHU; STRAUS, 2018).

Essas moléculas foram inicialmente identificadas em invertebrados e os artrópodes correspondem ao grupo com o maior número de moléculas caracterizadas (DINAMARCQ; BULET; HOFFMAN, 1998), dentre elas podemos citar a drosomicina, isolada de *Drosophila melanogaster* (FEHLBAUM et al., 1994), a tachypleisina, isolada



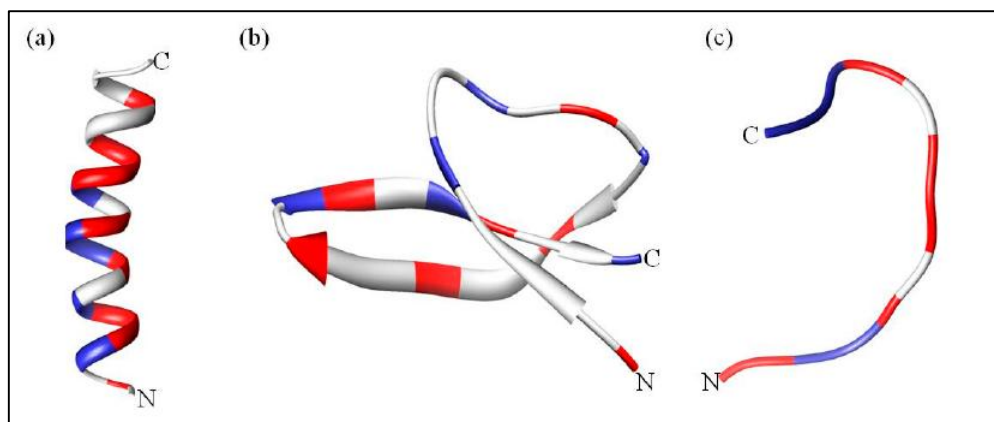
do caranguejo-ferradura *Tachypleus tridentatus* (NAKAMURA et al., 1988), a gomesina e a rondonina isoladas de aranhas *Acanthoscurria gomesiana* (SILVA, 2000) e *Acanthoscurria rondoniae* (RICILUCA et al., 2012) respectivamente, a longipina isolada do opilião *Acutisoma longipes* (SAYEGH et al., 2016), a lacraína isolada de miriápodes *Scolopendra viridicornis* (CHAPARRO; SILVA JR, 2016) e *Scolopendra subspinipes subspinipes* (CHAPARRO-AGUIRRE et al., 2019), a serrulina, isolada do escorpião *Tityus serrulatus* (OLIVEIRA et al., 2019) e as sarconesinas I e II isoladas da mosca *Sarconesiopsis magellanica* (DIAZ-ROA et al., 2018, 2019).

**Tabela 1** - Classificação dos peptídeos antimicrobianos de acordo com a estrutura da molécula.

Estrutura	Características	Exemplos
<b><math>\alpha</math>-hélice</b>	Formam estruturas anfipáticas em modelo $\alpha$ -hélice	Cecropina Magainina
<b>Folha <math>\beta</math></b>	Contêm resíduos de cisteína que são conservados e formam ligações dissulfeto.	Lactoferricina Tachyplecina
<b>Forma estendida</b>	Não se dobras em elementos estruturais secundários regulares	Indolicidina

Baseado em NGUYEN et al., 2011 e KUMAR., et al 2018.

**Figura 11** - Diversidade estrutural dos peptídeos antimicrobianos



(a) Magainina: estrutura em  $\alpha$ -hélice, (b) Defensina 5: estrutura em folha  $\beta$  e (c) Indolicidina: forma estendida.

Retirado de: KUMAR et al., 2018.

A maior parte dos PAM's descritos foram identificados a partir da hemolinfa (plasma e hemócitos) dos animais (LEE et al., 1997; SHIGENAGA et al., 1993; SAITO et al., 1995; RICILUCA et al., 2012; CHAPARRO; SILVA JR, 2016, OLIVEIRA et al., 2019). Entre os invertebrados marinhos, os poríferos são o grupo com maior número de AMPs descritos (LEAL et al., 2012a,b; MUNRO et al., 1999), e existem relativamente poucos estudos sobre os PAM's em equinodermos (LEAL et al., 2012 a,b). Neste último, a presença de moléculas antimicrobianas já foi descrita em Asterozoa, Holoturozoa e Echinozoa (RIDZWAN et al., 1995; BRYAN; RITTSCHO; MCCLINTOCK, 1996; BEAUGERARD et al., 2001; LI et al., 2008; LI et al., 2010; SCHILLACI et al., 2010; HAUG et al., 2002).

O perfil peptidômico do líquido celomático e dos espinhos de três espécies de ouriços-do-mar incluindo *L. variegatus* foi realizado por SCIANI e colaboradores (2016). No estudo uma grande quantidade de peptídeos foi identificada e as análises apontaram para peptídeos com diferentes funções como a atividade antimicrobiana, atividade antiviral e atividade inibidora de fosfolipase A<sub>2</sub>, mostrando o importante papel dessas moléculas no sistema imune e na biologia dos animais. Além disso o estudo aponta, também, o potencial farmacêutico dessas moléculas.

Dentre os peptídeos já caracterizados em ouriços-do-mar, podemos citar a strongilocina (LI et al., 2008) e a centrocina (LI et al., 2010), isoladas de *Strongylocentrotus droebachiensis*, a echinometrina, isolada do ouriço *Echinometra lucunter* (SCIANI et al., 2014) além de outras moléculas com atividade antimicrobiana ainda não caracterizadas (ABUBAKAR et al., 2012; SALAS-ROJAS et al., 2014; ZHOU et al., 2012); poucos estudos foram feitos analisando outras possíveis fontes de PAM's como as gônadas.

Estudos que avaliaram a produção de moléculas antimicrobianas nos órgãos reprodutores ou nos processos reprodutivos em invertebrados relatam, por exemplo, a ação antimicrobiana no plasma seminal de ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* (STABILLI; CANICATTI 1994), assim como uma atividade *lisozima-like* nos óvulos da estrela-do-mar *Marthasterias glaciaris* (STABILLI; PAGLIARA 1994). Em crustáceos a scygonadina, uma proteína antimicrobiana, foi isolada do plasma seminal do siri *Scylla serrata* (HUANG et al., 2006). Assim o trato reprodutivo parece ser uma fonte de moléculas antimicrobianas e essas moléculas devem desempenhar um papel importante nos processos reprodutivos.

#### 1.1.4 Sistema imune em machos e fêmeas

Apesar do funcionamento semelhante, a efetividade da resposta imune pode apresentar diferenças quando machos e fêmeas são comparados. Em vertebrados as fêmeas parecem apresentar uma resposta mais efetiva, tanto humoral quanto celular, do que os machos sendo uma das razões para essas diferenças os hormônios do sistema endócrino (GROSSMAN, 1989; GAILLARD; SPINEDI, 1998; KURTZ et al., 2000) e a outra por diferenças inatas entre machos e fêmeas (MCCLELLAND-GREEN; ROMANO; OBERDÖRSTER, 2011).

Hormônios esteroides, estrogênio, progesterona e testosterona, influenciam as diferentes células efectoras do sistema imunológico, modulando sua resposta coordenada. Esses hormônios funcionam através da ligação a receptores específicos, nucleares e não nucleares (OERTELT-PRIGIONE, 2011). As interações hormonais baseadas na falta de estrogênio e na elevação de andrógenos, hormônios que estimulam o desenvolvimento das características masculinas usadas na seleção sexual, levam a uma menor resposta imunológica nos homens, assim no desenvolvimento dos traços de sinais sexuais, os homens podem ser forçados a retirar recursos do sistema imunológico (KURTZ ET AL., 2000). ALEXANDER E STIMSON (1988) também apontam uma função supressora da testosterona na resposta imune.

Apesar da influência dos hormônios na resposta estudos tem indicado que diferenças sexuais na resposta imune ou infecção por parasitas, como muitas outras características da história de vida, é altamente dependente do contexto. Essa variação na resposta imune sob diferentes circunstâncias sociais ou ambientais dificulta a generalização sobre as diferenças sexuais na imunidade e sugere que é importante estudar a resposta imune em uma variedade de espécies com diferentes histórias de vida e sob várias condições (ZUK et al., 2004).

As diferenças nas respostas entre os gêneros parecem não ser restritas aos vertebrados, entretanto estudos na variação individual e na imunocompetência de invertebrados ainda é escassa (KURTZ et al., 2000; COTEUR, 2004).

Em insetos, uma superior atividade de moléculas semelhante à lisozima (*lisozima-like*) e da capacidade fagocítica foi verificada em fêmeas de Mecoptera (KURTZ et al., 2000), na barata *Periplaneta americana*, imunizadas com veneno de abelha, a resposta das fêmeas não apenas foi superior a dos machos como também

foi prolongada (RHEINS; KARP, 1985). Em contrapartida, uma resposta mais eficiente foi observada nos machos em espécies de carrapato (ZUK et al., 2004). Em um estudo realizado com estrelas-do-mar *Asterias rubens* o gênero dos animais não foi um fator que influenciou a resposta imune (COTEUR, 2004). Esses diferentes resultados reforçam a necessidade de investigação desses processos para melhor compreender a relação entre o sistema imune e os diferentes gêneros em invertebrados.

Uma vez que as gônadas são os órgãos responsáveis pela formação e maturação dos gametas, processo responsável pela perpetuação da espécie é de se esperar que esses órgãos contenham mecanismos de defesa para proteger tais células e garantir o sucesso reprodutivo.

Sabe-se que as gônadas possuem uma grande quantidade de carotenoides (GRIFFITHS; PERROT, 1976), que são importantes na maturação dos ovos e também na defesa, uma vez que estão envolvidos na eliminação de espécies reativas de oxigênio, assim como induzindo um aumento na população de fagócitos. Além disso, analisando o potencial farmacológico das gônadas, já foi descrito a presença de metabólitos ativos com atividade anti-inflamatória e antitumoral no ouriço-do-mar *Heliocidaris erythrogramma* (SHEEAN et al., 2007).

A caracterização de moléculas bioativas em organismos marinhos têm sido reportada na literatura (SOTTORFF et al., 2013; SCHILLACI et al., 2014; TINCU; TAYLOR, 2004; MUNRO et al., 1999; JO et al., 2017); as pesquisas relacionadas a esse tema cresceram desde a década de 1940. Destacando a importância desses estudos uma base de dados foi criada e dedicada exclusivamente aos produtos naturais marinhos: a *MarinLit database* (MUNRO et al., 1999). Os peptídeos bioativos obtidos da biodiversidade marinha, por exemplo, apresentam grande variedade de alvos farmacológicos (ANEIROS; GARATEIX, 2004; NGO et al., 2012; SOTTORFF et al., 2013; JO et al., 2017), dentre eles estão a ação antioxidante (TAKAMATSU et al., 2003; MENDIS; RAJAPAKSE; KIM, 2005; KIM, 2007), antitumoral (FELING et al., 2003; FERREIRA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2015), anti-inflamatória (MATSUI et al., 2003) e antimicrobiana (GUNASEKERA; POMPONI; MCCARTHY, 1994; STENSVAG et al., 2008; SPERSTAD et al., 2011; SEMREEN et al., 2018).

O desenvolvimento e descoberta de novos agentes antimicrobianos tem se tornado cada vez mais urgente; o crescente aumento da resistência antimicrobiana aos antibióticos é um grave problema de saúde que cresce globalmente ameaçando o tratamento de doenças infecciosas comuns, resultando em doenças prolongadas e

morte. Além disso devido à falta de medicamentos eficazes para combater tais organismos, procedimentos médicos como cirurgias de grande porte tornam-se um grande risco para os pacientes sem contar com o aumento dos custos com a saúde devido aos cuidados intensivos e prolongados nos hospitais (World Health Organization 2018(<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>)).

A resistência crescente aos antibióticos convencionais sugere que, sem uma ação urgente, estamos caminhando para uma "era pós-antibiótica", na qual as estratégias terapêuticas anteriormente eficazes não são mais relevantes (MAHLAPUU et al., 2016).

Além da questão da resistência aos antibióticos, a necessidade de investigar as proteínas de defesa do hospedeiro, particularmente nos sistemas reprodutivos, é enfatizada pela disseminação de infecções sexualmente transmissíveis. Melhores formas de prevenção e controle de outras infecções do trato geniturinário também podem ter um efeito importante na saúde pública (HALL; HAMIL; FRENCH, 2002).

Assim, o estudo e caracterização de moléculas antimicrobianas nas gônadas de ouriços-do mar *Lytechinus variegatus* pode contribuir para um melhor entendimento da biologia da espécie, principalmente em relação ao sistema imune e sua possível participação em processos reprodutivos, assim como no entendimento de mecanismos filogeneticamente relacionados aos vertebrados e, por fim, contribuir para a descoberta de novas moléculas com potencial aplicação biotecnológica para o combate a microrganismos multirresistentes assim como para outras doenças.

## 6 CONCLUSÃO

Moléculas com atividade antimicrobiana são produzidas no líquido celomático e nas gônadas de machos e fêmeas do ouriços-do-mar *L. variegatus*. Essas moléculas são produzidas de forma constitutiva e, nas gônadas, elas são formadas pela proteólise de uma glicoproteína denominada toposomo, também conhecida como a principal proteína do vitelo (*Major Yolk Protein – MYP*). Dentre os fragmentos encontrados duas massas, uma de 7167 e outra de 8294 Da foram identificadas. A formação dessas moléculas e sua ação antimicrobiana parece ter papel importante nos processos reprodutivos e foi descrita pela primeira vez nesta espécie. Somado a importância da elucidação de processos biológicos em *L. variegatus*, a caracterização dessas moléculas proporciona novos pontos de estudo, uma vez que as moléculas apresentam potencial uso biotecnológico no desenvolvimento de novos fármacos.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 564p. 2008.

ABUBAKAR, L. et al. Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinoidea). **J. Pharmacol. Ther**, v. 1, n. 1, p. 19–23, 2012.

AGNELLO, M. **Sea Urchin from environment to aquaculture and biomedicine**. IntechOpen, 144p. 2017

ALEXANDER, J. Sex differences and cross immunity in DBA/2 mice infected with *L. Mexicana* and *L. Major*. **Parasitology**, v. 96, n. 2, p. 297–302, 1988.

AL-SHARIF, W. Z. et al. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 6, p. 2983–2997, 1998.

ALVARES, K. et al. The unique biomineralization transcriptome and proteome of *Lytechinus variegatus* teeth. **Connective Tissue Research**, v. 59, p. 20–29, 8 nov. 2018.

ANEIROS, A.; GARATEIX, A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. **Journal of Chromatography B**, v. 803, n. 1, p. 41–53, 15 abr. 2004.

ANTIMICROBIAL PEPTIDE DATABASE. Produzido por Wang, G e Wang, Z. Disponível em: <<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>>. Acesso em: 07 jul. 2019.

AOKI, W.; UEDA, M. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 8, p. 1055–1081, 21 ago. 2013.

---

<sup>1</sup> De acordo com a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

ARAFI, S. et al. The Influence of Season on the Gonad Index and Biochemical Composition of the Sea Urchin *Paracentrotus lividus* from the Gulf of Tunis. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

ARIZZA, V. et al. Gender differences in the immune system activities of sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 164, p. 447–455, 2013.

AUTELITANO, D. J. et al. The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities **Drug Discovery Today**, abr. 2006.

BACHERE, E. et al. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 149–168, abr. 2004.

BAHAR, A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 28 nov. 2013.

BANDARANAYAKE, W. M.; ROCHER, A. D. Role of secondary metabolites and pigments in the epidermal tissues, ripe ovaries, viscera, gut contents and diet of the sea cucumber *Holothuria atra*. **Marine Biology**, v. 133, n. 1, p. 163–169, 28 jan. 1999.

BEAUREGARD, K. A. et al. The Detection and Isolation of a Novel Antimicrobial Peptide From the Echinoderm Cucumaria Frondosa. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]. v. 484p. 55–62.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 12, p. 845–859, fev. 2004.

BORGES, J. C. S. et al. 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*, v. 303, n. 3, p. 241–248. dez. 2005.

BOTTJER, D. J. et al. Paleogenomics of Echinoderms. **Science**, v. 314, n. 5801, p. 956–960, 10 nov. 2006.



BRANCO, P. C.; FIGUEIREDO, D. A. L.; SILVA, J. R. M. C. **New insights into innate immune system of sea urchin: coelomocytes as biosensors for environmental stress.** *OA Biology*. v. 18; 2(1):2014b.

BRANCO, P. C.; FIGUEIREDO, D. A. L.; EMERENCIANO, A. K.; SANTOS, D. A.; GONZÁLEZ-AVARENA, M.; SILVA, J. R. M. C. Sea urchin immune system: from basic concepts to environmental biomonitoring. In: BANKS, E. R. (Ed.). **Sea urchins habitat, embryonic development and importance in the environment.** New York: Nova Science Publishers. 2014a. cap. 4, p. 85-133.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, mar. 2005.

BRYAN, P. J.; RITTSCHOF, D.; MCCLINTOCK, J. B. Bioactivity of echinoderm ethanolic body-wall extracts: an assessment of marine bacterial attachment and macroinvertebrate larval settlement. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 196, n. 1–2, p. 79–96, mar. 1996.

BULET P, et al. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. **Journal of Biological Chemistry**. v. 268, n. 20, p. 14893-14897. 1993

BURKE, R. D. et al. **Echinoderm biology**. Victoria. Balkema, 1988.

CAMERON, R. A. et al. SpBase: the sea urchin genome database and web site. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. Database, p. D750–D754, 1 jan. 2009.

CANICATTI, C. binding properties of *Paracentrotus lividus* (Echinoidea) hemolysin. **Comparative and Biochemistry Physiology**. v. 98, p. 463–468, 1991.

CANICATTI, C. The echinoderm lytic system. **Bolletino di zoologia**, v. 59, n. 2, p. 159–166, jan. 1992.

CERVELLO, M.; MATRANGA, V. Evidence of a precursor-product relationship between vitellogenin and toposome, a glycoprotein complex mediating cell adhesion. **Cell Differentiation and Development**, v. 26, n. 1, p. 67–76, jan. 1989.

CHAPARRO, E.; DA SILVA, P. I. Lacrain: the first antimicrobial peptide from the body extract of the Brazilian centipede *Scolopendra viridicornis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 3, p. 277–285, set. 2016.

CHAPARRO-AGUIRRE, E. et al. Antimicrobial activity and mechanism of action of a novel peptide present in the ecdysis process of centipede *Scolopendra subspinipes*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 13631, 20 set. 2019.

CHIA, F.; XING, J. Echinoderm coelomocytes. **Zoological Studies**. v 35, n 4, p. 231-254. out. 1996.

CHIARAMONTE, M. et al. Stress and immune response to bacterial LPS in the sea urchin *Paracentrous lividus* (Lamarck, 1816). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 92, p. 384–394, 1 set. 2019.

CLUSTAL OMEGA. Disponível em <<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>. Acesso em: 06 set. 2019.

COOPER, E. L. Immune response: evolution. **Encyclopedia of life sciences**. 2007.

COTEUR, G. Environmental factors influencing the immune responses of the common European starfish (*Asterias rubens*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 16, n. 1, p. 51–63, jan. 2004.

DAVIDSON, E. H. The Sea Urchin Genome: Where Will It Lead Us? **Science**, v. 314, n. 5801, p. 939–940, 10 nov. 2006.

DE JESUS OLIVEIRA, T.; OLIVEIRA, U. C. DE; DA SILVA JUNIOR, P. I. Serrulin: A Glycine-Rich Bioactive Peptide from the Hemolymph of the Yellow *Tityus serrulatus* Scorpion. **Toxins**, v. 11, n. 9, p. 1–13, 2019.

DEV, S.; ROBINSON, J. J. Comparative biochemical analysis of the major yolk protein in the sea urchin egg and coelomic fluid. **Development, growth & differentiation**, v. 56, n. 6, p. 480–490, 1 ago. 2014.

DÍAZ-ROA, A. et al. Sarconesin II, a New Antimicrobial Peptide Isolated from *Sarconesiopsis magellanica*. Excretions and Secretions. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 1–27, 2019.

DÍAZ-ROA, A. et al. Sarconesin: *Sarconesiopsis magellanica* Blowfly Larval Excretions and Secretions With Antibacterial Properties. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. September, p. 1–13, 2018.

DILLY, G. F.; GAITÁN-ESPITIA, J. D.; HOFMANN, G. E. Characterization of the Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) transcriptome and mitogenome: A molecular resource for phylogenetics, ecophysiology and global change biology. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 2, p. 425–436, 1 mar. 2015.

DINAMARCQ, J. L.; BULET, P.; HOFFMAN, J. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. **Peptide Science**. v. 47, n. 6, p. 465-477. 1998.

ECHINOBASE. Disponível em <[www.wchinobase.org](http://www.wchinobase.org)>. Acesso em 24 nov. 2019.

FEHLBAUM, P. et al. Insect immunity. Septic injury of drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 269, n. 52, p. 33159-33163, dez. 1994

FELING, R. H. et al. Salinosporamide A: A Highly Cytotoxic Proteasome Inhibitor from a Novel Microbial Source, a Marine Bacterium of the New Genus Salinospira. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 42, n. 3, p. 355–357, 20 jan. 2003.

FERREIRA, E. G. et al. Prospecting Anticancer Compounds in Actinomycetes Recovered from the Sediments of Saint Peter and Saint Paul's Archipelago, Brazil. **Chemistry and Biodiversity**, v. 13, n. 9, p. 1149–1157, set. 2016.

FIGUEIREDO, D. A. L. et al. Ocean acidification affects parameters of immune response and extracellular pH in tropical sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Echinometra luccunter*. **Aquatic Toxicology**, v. 180, p. 84–94, nov. 2016.

GAILLARD, R. C.; SPINEDI, E. Sex- and stress-steroids interactions and the immune system: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 345–352, set. 1998.

GAITÁN-ESPITIA, J. D. et al. Functional insights into the testis transcriptome of the edible sea urchin *Loxechinus albus*. **Scientific Reports**, v. 6, 2 nov. 2016.

GHISAURA, S. et al. Proteomic changes occurring along gonad maturation in the edible sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Journal of Proteomics**, v. 144, p. 63–72, jul. 2016.

GILDOR, T. et al. Quantitative developmental transcriptomes of the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Marine Genomics**, v. 25, p. 89–94, 1 fev. 2016.

GOLCONDA, P. et al. The Axial Organ and the Pharynx Are Sites of Hematopoiesis in the Sea Urchin. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 25 abr. 2019.

GRAY D. A. Sex Differences in Susceptibility of House Crickets, *Acheta domesticus*, to Experimental Infection with *Serratia liquefaciens*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 1, n. 71, p. 477–484, 1984.

GRIFFITHS, M.; PERROTT, P. Seasonal changes in the carotenoids of the sea urchin *Strongylocentrotus dröbachiensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 55, n. 3, p. 435–441, jan. 1976.

GROSS, P. S. et al. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. **Developmental and comparative immunology**, v. 23, n. 4–5, p. 429–442, 1999.

GROSSMAN, C. J. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. **Science**, v. 227, n. 4684, p. 257–261, 1985.

GROSSMAN, C. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 34, n. 1–6, p. 241–251, jan. 1989.

GUNASEKERA, S. P.; POMPONI, S. A.; MCCARTHY, P. J. Discobahamins A and B, New Peptides from the Bahamian Deep Water Marine Sponge *Discodermia sp.* **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 79–83, jan. 1994.

HALL, S. H.; HAMIL, K. G.; FRENCH, F. S. Host defense proteins of the male reproductive tract *Journal of Andrology*, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12185087>

HANCOCK, R. E. W. Peptide antibiotics. **Lancet**, v. 349, n. 9049, p. 418–422, 1997.

HANCOCK, R. E. W.; BROWN, K. L.; MOOKHERJEE, N. Host defence peptides from invertebrates - emerging antimicrobial strategies. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 315–322, 2006.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551–1557, 2006.

HANCOCK, R. E.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 402–410, set. 2000.

HAO, G. et al. The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2. **Peptides**. v.30, n. 8, p. 1421-1427. 2009.

HAUG, T. et al. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 81, n. 2, p. 94–102, out. 2002.

HIBINO, T. et al. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. **Developmental biology**, v. 300, n. 1, p. 349–65, 1 dez. 2006.

HILL, S. K.; LAWRENCE, J. M. Habitats and characteristics of the sea urchin *Lytechinus variegatus* and *Arbacia punctulata* (Echinodermata) on the Florida-Gulf-Coast shelf. **Marine Ecology**. v. 24, n. 1, p. 15-30. 2003.

HOGAN, J. D. et al. The developmental transcriptome for *Lytechinus variegatus* exhibits temporally punctuated gene expression genes. **Biorxiv**. 2019

HUANG, W. S. et al. Purification and part characterization of a novel antibacterial protein Scygonadin, isolated from the seminal plasma of mud crab, *Scylla serrata* (Forskål, 1775). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 339, n. 1, p. 37–42, nov. 2006.

HUGHES, A. D. et al. The dual functions of sea urchin gonads are reflected in the temporal variations of their biochemistry. **Marine Biology**, v. 148, n. 4, p. 789–798, 21 fev. 2006.

HYMAN, L. H. The invertebrates: Echinodermata, the coelomate bilateria. Vol. 6. New York: McGraw-Hill Book Company, INC. 1955.

JIANG, J. et al. Comparative analysis of immunocompetence between females and males in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 63, p. 438–443, 2017.

JO, C. et al. Marine bioactive peptides: Types, structures, and physiological functions. **Food Reviews International**, v. 33, n. 1, p. 44–61, 2 jan. 2017.

KHAZIGALEEVA, R. A. et al. Antimicrobial activity of endogenous peptides of the moss *Physcomitrella patens*. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**. v. 43, n. 3, p. 248-254. jun. 2017.

KIM, S. Y. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 31–38, 2007.

KOBAYASHI, N.; OKAMURA, H. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. Part 2. Interactive toxic effects of heavy metals in synthetic mine effluents. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p. 1198–203, dez. 2005.

KUDTARKAR, P.; CAMERON, R. A. Echinobase: an expanding resource for echinoderm genomic information. Database **The journal of biological databases and curation**, v. 2017, 1 jan. 2017.

KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. **Biomolecules**, v. 8, n. 1, 2018.

KURTZ, J. et al. Gender differences and individual variation in the immune system of the scorpionfly *Panorpa vulgaris* (Insecta: Mecoptera). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, n. 1, p. 1–12, jan. 2000.

LE, C.-F.; FANG, C.-M.; SEKARAN, S. D. Intracellular Targeting Mechanisms by Antimicrobial Peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, abr. 2017.

LEAL, M. C. et al. Bioprospecting of marine invertebrates for new natural products - A chemical and zoogeographical perspective. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9842–9854, 2012.

LEAL, M. C. et al. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades - where and what are we bioprospecting? **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

LEE, I. H. et al. Clavanins,  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. **FEBS Letters**, v. 400, n. 2, p. 158–162, 3 jan. 1997.

LI, C. et al. Antimicrobial peptides in echinoderm host defense. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 49, p. 190–197, 2015.

LI, C. et al. Centrocins: Isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, p. 959–968, 2010.

LI, C. et al. Expression of antimicrobial peptides in coelomocytes and embryos of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 43, p. 106–113, 2014.

LI, C. et al. Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 12, p. 1430–1440, jan. 2008.

LI, J. et al. Membrane active antimicrobial peptides: Translating mechanistic insights to design. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. FEB, p. 1–18, 2017.

LI, Y. et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207–15, out. 2012.

LOKER, E. S. et al. Invertebrate immune systems--not homogeneous, not simple, not well understood. **Immunological reviews**, v. 198, p. 10–24, abr. 2004.

LYAPINA, I.; FILIPPOVA, A.; FESENKO, I. The Role of Peptide Signals Hidden in the Structure of Functional Proteins in Plant Immune Responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4343, 5 set. 2019.

MADEIRA, F. et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W636–W641, 2019.

MAH, C. L. Phylum Echinodermata sea stars, brittle stars sea urchins, sea cucumbers, sea lilies In: **GORDON, D. P. (Ed.) New Zealand inventory of biodiversity 1. Kingdom Animalia: Radiata, Lophotrochozoa, Deuterostomia**. cap 21. p. 371-400. 2009.

MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1–12, 2016.

MALLYA, S. K. Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. **The Journal of Cell Biology**, v. 117, n. 6, p. 1211–1221, 1 jun. 1992.

MARÓTI GERGELY, G. et al. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4, p. 363–374, maio 2011.

MARÓTI, G. et al. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research in Microbiology**. v. 162, p. 363-374, fev. 2011.

MATRANGA, V. et al. Monitoring chemical and physical stress using sea urchin immune cells. **Progress in molecular and subcellular biology**, v. 39, p. 85–110, 2005.

MATSUI, M. S. et al. Sulfated Polysaccharides from Red Microalgae Have Antiinflammatory Properties In Vitro and In Vivo. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104. 2003.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1462, n. 1–2, p. 1–10, dez. 1999.

MCBRIDE, S. C. Sea Urchin Aquaculture. **American Fisheries Society Symposium**, v. 46, p. 179–208, 2005.



MCBRIDE, S. Comparison of gonad quality factors: color, hardness and resilience, of *Strongylocentrotus franciscanus* between sea urchins fed prepared feed or algal diets and sea urchins harvested from the Northern California fishery. **Aquaculture**, v. 233, n. 1–4, p. 405–422, 26 abr. 2004.

MCCLELLAN-GREEN, P.; ROMANO, J.; OBERDÖRSTER, E. Does gender really matter in contaminant exposure? A case study using invertebrate models. **Environmental Research**, v. 104, n. 1, p. 183–191, maio 2007.

MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; KIM, S. K. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 581–587, 2005.

METAXAS, A. Larval ecology of echinoids. In LAWRENCE, J. M. (Ed.). **Sea urchins: biology and ecology**. 3<sup>rd</sup>. ed. Academic Press. San Diego.. 2013. cap. 6. p. 69-81.

MI, X. et al. Identification and profiling of sex-biased microRNAs from sea urchin *Strongylocentrotus nudus* gonad by Solexa deep sequencing. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 10, n. 1, p. 1–8, jun. 2014.

MIDDLEDITCH, M. J. Identification of protein components from the mature ovary of the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata: Echinoidea). **Proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2531–2542, jun. 2008.

MIGLIACCIO, O. et al. Subtle reproductive impairment through nitric oxide-mediated mechanisms in sea urchins from an area affected by harmful algal blooms. **Scientific Reports**, v. 6, 19 maio 2016.

MUNRO, M. H. G. et al. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 15–25, 1999.

NAKAMURA, T. et al. Tachyplesin, a classe of antimicrobial peptide from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). **The Journal of Biological Chemistry**. v. 263, n. 32, p. 16709-16713, 1988.

NCBI-BLASTp. Disponível em: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

NGO, D.-H. et al. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 378–383, nov. 2012.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, set. 2011.

NOLL, H. et al. Characterization of toposomes from sea urchin blastula cells: A cell organelle mediating cell adhesion and expressing positional information (monoclonal antibodies/noncytolytic extraction with butanol/glycoprotein complex/cell membrane/morphogenesis). **Cell Biology**, v. 82, p. 8062–8066, 1985.

NOLL, H. et al. The toposome, essential for sea urchin cell adhesion and development, is a modified iron-less calcium-binding transferrin. **Developmental Biology**, v. 310, n. 1, p. 54–70, out. 2007.

OERTELT-PRIGIONE, S. The influence of sex and gender on the immune response. **Autoimmunity Reviews**, v. 11, n. 6–7, p. A479–A485, maio 2012.

OTERO-GONZÁLEZ, A. J. et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 5, p. 1320–1334, maio 2010.

PAGLIARA, P.; ROCH, P. Antibacterial activity in the coelomocytes of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 113, n. 3, p. 639–644, mar. 1996.

PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 143–171, 11 jun. 2012.

PEARSE, J. S. Ecological role of purple sea urchins. **Science** (New York, N.Y.), v. 314, n. 5801, p. 940–941, 10 nov. 2006.

PÉREZ-PORTELA, R.; TURON, X.; RIESGO, A. Characterization of the transcriptome and gene expression of four different tissues in the ecologically relevant sea urchin *Arbacia lixula* using RNA-seq. *Molecular Ecology Resources*, v. 16, n. 3, p. 794–808, 1 maio 2016.

PÉREZ-PORTELA, R.; TURON, X.; RIESGO, A. Characterization of the transcriptome and gene expression of four different tissues in the ecologically relevant sea urchin *Arbacia lixula* using RNA-Seq. *Molecular Ecology Resources*. v. 16, p. 794-808, nov. 2016.

PHILLIPS, K et al. Effect of manufactured diets on the yield, biochemical composition and sensory quality of *Evechinus chloroticus* sea urchin gonads. *Aquaculture*. v.308, p.49-59, jul. 2010.

POWERS, J. P. S.; HANCOCK, R. E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, v. 24, n. 11, p. 1681–1691, nov. 2003.

QUEIROZ, V.; CUSTÓDIO, M. R. Characterisation of the spherulocyte subpopulations in *Eucidaris tribuloides* (Cidaroida: Echinoidea). *Italian Journal of Zoology*, v. 82, n. 3, p. 338–348, 3 jul. 2015.

RAMÍREZ-GÓMEZ, F. et al. LPS-induced genes in intestinal tissue of the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *PLoS ONE*, v. 4, n. 7, 8 jul. 2009.

RAMIREZ-GOMEZ, F. J.; GARCÍA-ARRARÁS, J. E. *Echinoderm immunity*. p. 211–220, 2010.

RAPOSO, A. I. G. Biologia reprodutiva do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) e o efeito de três dietas no desenvolvimento das suas gónadas. **Leiria: Instituto Politécnico de Leiria**. 2017.

RAST, J. P. et al. Genomic insights into the immune system of the sea urchin. *Science*. v. 314, p. 952-956, nov. 2006.

RATCLIFFE, N. A. The biological significance of immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 13, n. 4, p. 273–283, set. 1989.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 24, p. 536-547. 2004.

RHEINS, L. A.; KARP, R. D. Effect of gender on the inducible humoral immune response to honeybee venom in the american cockroach (*Periplaneta americana*). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 9, n. 1, p. 41–49, 1985.

RICILUCA, K. C. T. et al. Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. **Results in Immunology**, v. 2, p. 66–71, 2012.

RIDZWAN, B. H. et al. Screening for antibacterial agents in three species of sea cucumbers from coastal areas of Sabah. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 26, n. 7, p. 1539–1543, nov. 1995.

RODRIGUES, B. S. F. et al. Bioprospection of cytotoxic compounds in fungal strains recovered from sediments of the brazilian coast. **Chemistry and Biodiversity**, v. 12, n. 3, p. 432–442, mar. 2015.

ROSA, C. N. Os animais de nossas praias. 2. ed. São Paulo: **Edart**, 1973. 190p

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Roca. 1996.

RUSSELL, M. P. Resource allocation plasticity in sea urchins: rapid, diet induced, phenotypic changes in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* (Muller). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology Mar. Biol. Ecol**, v. 220, n. 220, p. 1–14, 1998.

RYOYAMA, K. Studies on the biological properties of coelomic fluid of sea urchin. **Biochimica et Biofisica Acta**. v. 320, p. 157-165. 1973.

RYOYAMA, K. Studies on the biological properties of coelomic fluid of sea urchin. II. Naturally occurring hemagglutinin in sea urchin. **Biol.Bull.**, v. 146, n. 3, p. 404–414, 1974.

SAITO, T. et al. A Novel Big Defensin Identified in Horseshoe Crab Hemocytes: Isolation, Amino Acid Sequence, and Antibacterial Activity1. **J. Biochem**, v. 117, p. 1131–1137, 1995.

SALAS-ROJAS, M. et al. The coelomic fluid of the sea urchin *Tripneustes depressus* shows antiviral activity against Suidherpesvirus type-1 (SHV-1) and rabies virus (RV). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 36, p. 158-163, nov. 2013

SAMANTA, M. P. et al. The transcriptome of the sea urchin embryo. **Science**, v. 314, n. 5801, p. 960–962, 2006.

SANTOS, S. R. Bioprospecção de novos peptídeos antimicrobianos em ovos de galinha *Gallus gallus domesticus*. São Paulo: **Escola Paulista de Medicina**. 2019.

SAYEGH, R. S. R. et al. Longipin: An Amyloid Antimicrobial Peptide from the Harvestman *Acutisoma longipes* (Arachnida: Opiliones) with Preferential Affinity for Anionic Vesicles. **Plos One**, v. 11, n. 12, p. e0167953, 20 dez. 2016.

SCHILLACI, D. et al. Antimicrobial and antistaphylococcal biofilm activity from the sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 17–24, jan. 2010.

SCHILLACI, D. et al. Paracentrin 1, a synthetic antimicrobial peptide from the sea-urchin *Paracentrotus lividus*, interferes with staphylococcal and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 78, 31 dez. 2014.

SCIANI, J. M. et al. Echinometrin: A novel mast cell degranulating peptide from the coelomic liquid of *Echinometra lucunter* sea urchin. **Peptides**, v. 53, p. 13–21, mar. 2014.

SCIANI, J. M. et al. Initial peptidomic profiling of Brazilian sea urchins: *Arbacia lixula*, *Lytechinus variegatus* and *Echinometra lucunter*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 17, 4 dez. 2016.

SCOTT, L. B. et al. Loss of yolk platelets and yolk glycoproteins during larval development of the sea urchin embryo. **Developmental Biology**, v. 137, n. 2, p. 368–377, fev. 1990.

SEMREEN, M. H. et al. Recent updates of marine antimicrobial peptides. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 3, p. 396–409, mar. 2018.

SERAFY, D. K. Echinoids (Echinodermata: Echinoidea). **Memoirs of the Hourglass Cruises**, v. V, n. Part III, p. 1–120, 1979.

SEWELL, M. A.; ERIKSEN, S.; MIDDLEDICH, M. J. Identification of protein components from the mature ovary of the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata: Echinoidea). *Proteomics*. v. 8, p. 2531-2542.2008.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1462, n. 1–2, p. 55–70, dez. 1999.

SHANG, W. H. et al. In silico assessment and structural characterization of antioxidant peptides from major yolk protein of sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. **Food and Function**, v. 9, n. 12, p. 6435–6443, 2018.

SHEEAN, P. D. et al. Bioactivity of extracts from gonadal tissue of the edible Australian purple sea urchin *Heliocidaris erythrogramma*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 4, p. 694–701, mar. 2007.

SHIGENAGA, T. et al. Separation of Large and Small Granules from Horseshoe Crab (*Tachypleus tridentatus*) Hemocytes and Characterization of Their Components<sup>1</sup>. **J. Biochem**, v. 114, p. 307–316, 1993.

SILVA JR, P. I. Sistema immune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*. São Paulo: **Universidade de São Paulo**. 2000.

SILVA, J. R. M. C. Immunology in sea urchins. In LAWRENCE, J. M. (Ed.). **Sea urchins: biology and ecology**. 3<sup>rd</sup>. ed. Academic Press. San Diego.. 2013. Cap. 13, p. 187-195.

SMITH, L. C. et al. Correction to: Echinodermata: The Complex Immune System in Echinoderms. In: *Advances in Comparative Immunology*. Cham: **Springer International Publishing**, 2018. p. E1–E1.

SMITH, L. C. et al. Methods for collection, handling, and analysis of sea urchin coelomocytes. In: **Methods in Cell Biology**. [s.l.] Academic Press Inc., v. 150p. 357–389. 2019.

SMITH, L. C. et al. The sea urchin immune system. **Invertebrate Survival Journal**, v. 3, n. 1, p. 25-39. 2006.

SMITH, L. C.; SHIH, C.; DACHENHAUSEN, S. G. Coelomocytes express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system. **The Journal of Immunology**. v. 161, p. 6784-6793, ago. 1998.

SMITH, L.C.; BRITTEN, J.; DAVIDSON, E. H. Lipopolysaccharide activates the sea urchin immune system. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 19, n. 3, p. 217-224. 1995

SMITH, V. J. Invertebrate immunology: Phylogenetic, ecotoxicological and biomedical implications. **Comparative Haematology International**, v. 1, n. 2, p. 61–76, 1991.

SODERGREN, E. et al. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. **Science** (New York, N.Y.), v. 314, n. 5801, p. 941–952, 10 nov. 2006.

SOTTORFF, I. et al. Characterization of bioactive molecules isolated from sea cucumber *Athyonidium chilensis*. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 48, n. 1, p. 23-35. 2013.

SOUZA, C. F.; OLIVEIRA, A. S. DE; PEREIRA, R. C. Feeding preference of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) on seaweeds. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 56, n. 3, p. 239–247, set. 2008.

SPERSTAD, S. V. et al. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 519–530, set. 2011.

STABILI, L.; CANICATTÌ, C. Antibacterial activity of the seminal plasma of *Paracentrotus lividus*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 72, n. 7, p. 1211–1216, jul. 1994.

STABILI, L.; LICCIANO, M.; PAGLIARA, P. Evidence of antibacterial and lysozyme-like activity in different planktonic larval stages of *Paracentrotus lividus*. **Marine Biology**, v. 119, n. 4, p. 501–505, jul. 1994.

STABILI, L.; PAGLIARA, P. Antibacterial protection in *Marthasterias glacialis* eggs: characterization of lysozyme-like activity. **Comparative Biochemistry and Physiology** -- Part B: Biochemistry and, 1994.

STABILI, L.; PAGLIARA, P.; ROCH, F. Antibacterial activity in the coelomocytes of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. **Comparative Biochemistry physiology**. v. 113B, n. 3, p. 639-644, ago. 1996.

STENSVÅG, K. et al. Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 3, p. 275–285, 2008.

SUMRALL, C. D.; WRAY, G. A. Ontogeny in the fossil record: diversification of body plans and the evolution of “aberrant” symmetry in Paleozoic echinoderms. **Paleobiology**, v. 33, n. 1, p. 149–163, 8 abr. 2007.

TAJIMA, K.; SILVA, J. R. M.C. Disease in Sea Urchins. In LAWRENCE, J. M. (Ed.). **Sea urchins: biology and ecology** Academic Press. San Diego 2007. cap 9, p. 167-182

TAKAMATSU, S. et al. Marine natural products as novel antioxidant prototypes. **Journal of Natural Products**. v. 66, n. 5, p. 605-608. 2003.

TINCU, J. A.; TAYLOR, S. W. Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3645–3654, 1 out. 2004.  
UEKI, N. et al. Cryptides: Functional cryptic peptides hidden in protein structures. **Biopolymers**, v. 88, n. 2, p. 190–198, 2007.

TU, Q.; CAMERON, R. A.; DAVIDSON, E. H. Quantitative developmental transcriptomes of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. **Developmental Biology**, v. 385, n. 2, p. 160–167, 15 jan. 2014.



UEKI, N. et al. Cryptides: functional cryptic peptides hidden in protein structures. **Peptide Science**. v. 88, n. 2, p. 190-198. 2007.

UMA, B.; PARVATHAVARTHINI, R. Antibacterial effect of hexane extract of sea Urchin, *Temnopleurus alexandri* (Bell,1884). **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 3, p. 1677–1680, 2010.

UNUMA, T. et al. Quantitative changes in yolk protein and other components in the ovary and testis of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. **The Journal of Experimental Biology**. v. 206. p. 365-372. 2003.

UNUMA, T. et al. The major yolk protein is synthesized in the digestive tract and secreted into the body cavities in sea urchin larvae. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 2, p. 142–150, fev. 2009.

UNUMA, T. et al. The sea urchin major yolk protein is synthesized mainly in the gut inner epithelium and the gonadal nutritive phagocytes before and during gametogenesis. **Molecular Reproduction & Development**. v. 77, p. 59-68, ago. 2010

UNUMA, T. et al. Zinc-binding property of the major yolk protein in the sea urchin - Implications of its role as a zinc transporter for gametogenesis. **FEBS Journal**, v. 274, n. 19, p. 4985–4998, out. 2007.

UNUMA, T. Gonadal growth and its relationship to aquaculture in sea urchin. In YOKOTA, Y; MATRANGA, V.; SMOLENICKA, Z. (Eds.). **The sea urchin: From basic biology to Aquaculture**, Swets & Zeitlinger: Lisse, 2002. p. 115-127.

VALVERDE, L. C.; MEUER, B. C. Análise espacial de três espécies de echinoidea (echinodermata) em costões rochosos do litoral do Rio de Janeiro RJ - Brasil. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, p. 1–2, 2007.

VERACHIA, W. et al. Seasonal changes in the biochemical composition of *Evechinus chloroticus* gonads (Echinodermata: Echinoidea). **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 46, n. 3, p. 399–410, 1 set. 2012.

WALKER, C. W.; LESSER, M. P.; UNUMA, T. Sea urchin gametogenesis – structural, functional and molecular / genomic biology. In LAWRENCE, J. M. (Ed.). **Sea urchins: biology and ecology**. 3<sup>rd</sup>. ed. Academic Press. San Diego. 2013. cap. 3. p. 25-43.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD2: The updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 933–937, 2009.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1087–D1093, 2016.

WARDLAW, A. C.; UNKLES, S. E. Bactericidal activity of coelomic fluid from the sea urchin *Echinus Esculentus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 32, n. 1, p. 25–34, 1978.

WATTS, S. A.; MCCLINTOCK, J. B.; LAWRENCE, J. M. In LAWRENCE, J. M. (Ed.). **Sea urchins: biology and ecology**. 3<sup>rd</sup>. ed. Academic Press. San Diego. 2013. cap. 31. p. 475-490.

WHO, World Health Organization. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>>. Acesso em out. 2019

XIAO, M. et al. Identification and profiling of sex-biased microRNAs from sea urchin *Strongylocentrotus nudus* gonad by Solexa deep sequencing. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part D. v. 10, p. 1-8. 2014.

YAMAMOTO, L. G. Inhibitory and bactericidal principles (MIC & MBC). In Case Based Pediatrics For Medical Students and Residents. University of Hawaii John. 2003.

YOKOTA, Y. et al. Cleavage site of a major yolk protein (MYP) determined by cDNA isolation and amino acid sequencing in sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 135, n. 1, p. 71–81, 1 maio 2003.

YOKOTA, Y.; SAPPINGTON, T.W. Vitellogen and vitellogenin in echinoderms. In: RAIKHEL, A. S.; SAPPINGTON, T.W. (Eds.). **Reproductive Biology of**

**Invertebrates**, progress in vitellogenins. Enfield: Edenbrigde LTD. Science Publishers. P. 201-221.

YOSHIGA, T. et al. *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. **European Journal of Biochemistry**. v. 260, p. 414-420. 1999.

YUN, E. Y. et al. *Bombyx mori* transferrin: Genomic structure, expression and antimicrobial activity of recombinant protein. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 10, p. 1064–1069, 2009.

ZHAO, C. et al. Effects of continuous and diel intermittent feeding regimes on food consumption, growth and gonad production of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* of different size classes. **Aquaculture International**, v. 21, n. 3, p. 699–708, jun. 2013.

ZHOU, D. et al. Optimisation of hydrolysis of purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad by response surface methodology and evaluation of in vitro antioxidant activity of the hydrolysate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 8, p. 1694–1701, 2012.

ZITO, F. et al. Cell adhesion and communication: a lesson from echinoderms embryos for the exploitation of new therapeutic tools. In: MATRANGA, V. (Ed.). **Echinodermata, progress in molecular and subcellular biology**. Springer. Berlin Heidelberg. 2005. p. 7-44.

ZUK, M. et al. Sex differences in immunity in two species of field crickets. **Canadian Journal of Zoology**, v. 82, n. 4, p. 627–634, 2004.

ZUK, M. Reproductive strategies and disease susceptibility: an evolutionary viewpoint. **Parasitology Today**, v. 6, n. 7, p. 231–233, 1990.