



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO

**Estudo da capacidade fagocítica de celomócitos de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* submetidos a estresse salino**

Thaís Bezerra Mangeon Honorato

Prof. Dr. Luis Fernando Marques-Santos

Orientador

Profa. Dra. Patricia Mirella da Silva Scardua

Co-orientadora

João Pessoa – 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO

**Estudo da capacidade fagocítica de celomócitos do ouriços-do-mar *Echinometra lucunter*  
submetidos a estresse salino**

Thaís Bezerra Mangeon Honorato

Prof. Dr. Luis Fernando Marques-Santos

Orientador

Profa. Dra. Patricia Mirella da Silva Scardua

Co-orientadora

Trabalho - Monografia apresentada ao  
Curso de Ciências Biológicas (Trabalho  
Acadêmico de conclusão de Curso), como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas

João Pessoa – 2013



**Thaís Bezerra Mangeon Honorato**

**Estudo da capacidade fagocítica de celomócitos do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*  
submetidos a estresse salino**

Trabalho – Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial à  
obtenção do grau de Bacharel (Licenciado) em Ciências Biológicas

Data: \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luis Fernando Marques-Santos (Orientador)

Departamento de Biologia Molecular – UFPB

---

Prof. Dr. Sávio Torres de Farias

Departamento de Biologia Molecular – UFPB

---

M.Sc. Jocelmo Cássio de Araújo Leite

Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Simone Mangeon, por sempre me apoiar e acreditar em mim, pelo amor e carinho diário e por muitas vezes ter sacrificado as suas próprias vitórias pelas minhas;

Ao meu pai, Ricardo Honorato, por ser um exemplo de pai e profissional, por me guiar e mostrar o valor do estudo e dedicação e por me apresentar à paixão pela ciência desde a minha infância;

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Fernando Marques dos Santos por me ensinar a fazer ciência de forma apaixonante. Agradeço por todo o apoio e orientação em cada dúvida, erro, dificuldade e crise, além de ser um verdadeiro amigo nesses anos de convivência;

À Profa. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Mirella da Silva Scardua, por toda atenção em dúvidas e infinitos ajustes de protocolos, pela excelente co-orientação e confiança transmitida no desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus colegas de trabalho e amigos do LABID: Jocelmo, Elis, Leo, Raianna, Thyago, Thainá, Dalliane, Andrezza, Ricardo, Neto e Fernanda por serem um exemplo de trabalho em equipe e por cada momento de apoio, ajuda, companheirismo e diversão. Tem muito dessa família neste trabalho;

A todo o pessoal do LABIPI: Natan, Cairé, Lucas, Fernando, Sâmia e Paulo pela companhia diária e prontidão para ajudar sempre;

Aos técnicos do laboratório, Socorro Noronha e Antonio Bosco, pelo trabalho e atenção dia após dia;

Ao quadro docente do Curso de Ciências Biológicas, cada professor que passou pela minha vida acadêmica deixou algum aprendizado na minha vida profissional e pessoal;

Ao PIBIC/CNPq pelo apoio financeiro e à Universidade Federal da Paraíba por proporcionar uma formação acadêmica de qualidade;

Aos meus colegas de curso da turma de Bacharelado 2010.1 por dividirem esses quatro belos anos de aprendizado comigo. As minhas amigas de infância, Andrea Nunes, Bruna Nunes e Rayssa Nunes por sempre estarem presentes em minha vida. Aos amigos cariocas que mesmo

longe nunca estiveram distante e aos paraibanos por me fazerem amar ainda mais a vida nessa cidade;

Aos meus avós, Remilson, Josefina e Hermelinda, por terem me acolhido como filha e me dado todo carinho, amor, cuidado e atenção na ausência de meus pais;

Ao meu amigo e namorado Victor Lisboa, por todo o apoio emocional, paciência, amor, carinho, companheirismo, compreensão e por sempre acreditar que tudo daria certo;

A todos da minha família que de alguma forma me incentivaram e acreditaram em mim: minha madrasta Fernanda, todos os tios e tias, primos, meus padrinhos Fernando e Teresa e às minhas pequenas irmãs, Mariana e Julia que conseguem alegrar qualquer momento de dificuldade com um simples sorriso.

## RESUMO

Celomócitos são células do fluido celômico de equinodermos responsáveis pela imunidade inata, sendo constituídas por quatro subpopulações: fagócitos; células vibráteis; esferulócitos vermelhos; e esferulócitos incolores. Os fagócitos estão envolvidos nos mecanismos de migração celular e fagocitose. O objetivo do presente trabalho foi investigar a capacidade fagocítica de celomócitos de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) submetidos a estresse salino. Os animais foram coletados na costa de João Pessoa (Paraíba/Brasil) aclimatados por uma semana, sob constante fluxo de ar, a 25°C e 35‰ e posteriormente submetidos ao estresse salino: 25‰ (hipossalino) ou 45‰ (hipersalino), por até 48 horas. Os ensaios de fagocitose foram realizados 1, 6, 24 e 48 horas após o início do estresse. O fluido celômico foi obtido através de punção na membrana peristomial, utilizando uma seringa contendo ISO-EDTA. A capacidade fagocítica foi avaliada com base na fagocitose de leveduras ou microesferas. Nos ensaios de fagocitose de leveduras, as mesmas ( $1 \times 10^7$  células/mL) foram adicionadas à suspensão celular ( $5 \times 10^5$  células/mL) e incubadas por até 2h, e a análise realizada sob microscopia óptica comum. Para os ensaios de fagocitose, microesferas de Fluoresbrite® Yellow Green foram adicionadas à suspensão celular e a capacidade fagocítica analisada por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. A capacidade fagocítica de celomócitos incubados com leveduras variou de  $25,7 \pm 1,1$  a  $35,73 \pm 1,57\%$ , uma e duas horas de incubação, respectivamente. O percentual de células fagocíticas foi maior nos ensaios com as microesferas fluorescentes, que apresentaram  $58,3 \pm 5,23\%$  das células realizando fagocitose à uma hora de incubação. O animais submetidos a estresse hipossalino por 48 horas apresentaram um aumento na capacidade fagocítica de  $33,08 \pm 4,19\%$  para  $47,08 \pm 4,35\%$ , contrastando com os animais submetidos a estresse hipersalino que apresentaram uma diminuição de  $51,71 \pm 5,11\%$  para  $26,79 \pm 3,35\%$ , na capacidade fagocítica para o mesmo período. A concentração celular populacional de esferulócitos aumentou em ambas situações de estresses, e a concentração celular total aumentou apenas em animais submetidos a estresse hipersalino de 1 a 48 horas. Os nossos dados demonstraram que o estresse salino afeta a capacidade fagocítica de celomócitos de ouriço-do-mar *E. lucunter* em estresse crônico.

Palavras-chave: celomócitos; fagocitose; estresse salino.

## ABSTRACT

Coelomocytes are cells from the coelomic fluid of echinoderms responsible for the innate immunity, being constituted by four subpopulations: fagocytes; vibratile cells; red spherulocytes; and colorless spherulocytes. The aim of the present study was to investigate phagocytosis and cellular population profile of coelomocytes from the sea urchin *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) submitted to salinity stress. Animals were collected at the João Pessoa (Paraíba/Brasil) coast and acclimated for one week, under constant air flow, at 25°C e 35‰ and posteriorly subjected to saline stress: 25‰ (hyposaline) or 45‰ (hypersaline), for until 48 hours. Phagocytosis assays were performed 1, 6, 24 and 48 hours after the beginning of the stress. The coelomic fluid was obtained through the puncturing of the peristomial membrane, using a syringe containing ISO-EDTA. The phagocytic capacity was evaluated based on the phagocytosis of yeasts and microspheres. In the yeasts phagocytosis assays, those ( $1 \times 10^7$  cells/mL) were added to cellular suspension ( $5 \times 10^5$  cells/mL) and incubated to until 2 hours, and the analysis performed under optic microscopy. To the phagocytosis assays, Fluoresbrite® Yellow Green microspheres were added to the cellular suspension and the phagocytic capacity analyzed by flow cytometry and fluorescence microscopy. The phagocytic capacity of coelomocytes incubated with yeasts ranged from  $25,7 \pm 1,1$  to  $35,73 \pm 1,57\%$ , one and two hours of incubation, respectively. The percentage of phagocytic cells was higher in the assays with the fluorescent microspheres, which presented  $58,3 \pm 5,23\%$  of the cells performing phagocytosis to an hour of incubation. The animals subjected to hyposaline stress for 48 hours presented an increase in the phagocytic capacity from  $33,08 \pm 4,19\%$  to  $47,08 \pm 4,35\%$ , contrasting with the animals subjected to a hypersaline stress that presented a decrease from  $51,71 \pm 5,11\%$  to  $26,79 \pm 3,35\%$ , in the phagocytic capacity for the same period. The cellular concentration of population spherulocytes has increased in both stress situations, and the total cellular concentration has increased only in animals subjected to hypersaline stress from 1 to 48 hours. Our data demonstrated that the saline stress affects the phagocytic capacity of *E. lucunter* sea urchin coelomocytes under chronic stress.

Keywords: coelomocytes; phagocytosis; saline stress.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Echinometra lucunter</i> no local de coleta	15
Figura 2: Fotomicrografia de um fagócito do ouriço-do-mar <i>Echinometra lucunter</i>	19
Figura 3. Capacidade fagocítica dos fagócitos de <i>E. lucunter</i> em ensaio com leveduras	20
Figura 4. Capacidade fagocítica dos fagócitos de <i>E. lucunter</i> submetidos ao estresse hipossalino (25‰).	22
Figura 5: Índice fagocítico dos fagócitos de <i>E. lucunter</i> submetidos ao estresse hipossalino (25‰).	23
Figura 6. Capacidade fagocítica dos fagócitos de <i>E. lucunter</i> submetidos ao estresse hipersalino (45‰).	24
Figura 7: Índice fagocítico dos fagócitos de <i>E. lucunter</i> submetidos ao estresse hipersalino (45‰).	25
Figura 8. Morfologia celular de celomócitos de ouriço-do-mar submetidos a estresse salino	26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Capacidade fagocítica dos fagócitos de *E. lucunter* em ensaio com microesferas fluorescentes. 21

Tabela 2. Concentração total e das subpopulações de celomócitos de *E. lucunter* submetidos a estresse hipossalino (25%). 28

Tabela 3. Concentração total e das subpopulações de celomócitos de *E. Lucunter* submetidos a estresse hipersalino (45%). 30

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
4. RESULTADOS	19
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO	36
8. REFERÊNCIAS	37

## 1. Introdução

A ideia da existência de um sistema imune foi impulsionada quando Pasteur e Koch propuseram "the germ theory of disease". A partir de então, diversos pesquisadores se dedicaram ao estudo da patogenicidade dos microrganismos. No entanto, a imunidade foi primeiramente descrita em 1882, no clássico trabalho de Elie Metchnikoff, e anunciada a partir da teoria celular da imunidade em 1884, onde este observou, pela primeira vez, o fenômeno da fagocitose. Os achados de Metchnikoff foram publicados pelo Instituto Pasteur, no ano de 1891, no livro "*Lectures on the comparative pathology of inflammation*", onde o autor discorre sobre patologia e inflamação. Após observar que um dos traços mais característicos entre organismos distintos era o seu sistema imune, Metchnikoff passou a estudar esse sistema em invertebrados marinhos, quando descreveu mecanismos efetores de eliminação de antígenos e cunhou o termo fagócito (do grego *fagos*, que significa comer e *kytos*, que significa célula), denominando, assim, as células com a capacidade de eliminar o não próprio. Metchnikoff demonstrou esse mecanismo através de um experimento onde inseriu pequenos espinhos em uma larva de estrela-do-mar e observou que algumas células migravam para o local, engolfando tais partículas (TAN; DEE, 2009, TAUBER, 2003). Logo depois, ele observou a resposta de fagócitos de uma pulga de água (*Daphnia*) contra uma infecção natural com levedura (KAUFMANN, 2008). Assim, os conceitos de defesa imune inata do hospedeiro por mecanismos celulares, tais como o recrutamento de fagócitos durante a inflamação aguda e crônica e a própria fagocitose, foram vigorosamente promovidos por Metchnikoff (GORDON, 2008). Em 1908, Metchnikoff, juntamente com Paul Ehrlich, ganhou o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina.

Atualmente tem-se o conhecimento de que a imunidade consiste em uma reação contra substâncias não próprias, incluindo células, macromoléculas - tais como proteínas e polissacarídeos - e substâncias químicas que podem ser reconhecidas como elementos estranhos ao organismo. O sistema imune adaptativo apresenta uma resposta imune mais rápida e mais eficiente em invasões recorrentes, o que ocorre graças a uma vasta variedade de tipos celulares e de receptores de antígenos, além da produção de anticorpos com especificidade de ligação ao antígeno. Porém, antes da evolução para um sistema imune adaptativo, mecanismos inatos de autodefesa foram adquiridos. A estratégia básica da imunidade inata é que o organismo produza, constitutivamente, receptores genéricos que reconheçam padrões conservados em diferentes patógenos, sendo assim capazes de desencadear uma resposta que limita a invasão do patógeno (COOPER; ALDER, 2006). Essas

moléculas alvo são componentes indispensáveis dos microrganismos e, por isso, não são facilmente alteradas por mutação e seleção. O reconhecimento e resposta imune ocorrem para que a interdição da infecção seja possível antes que os microrganismos possam proliferar, disseminar e dominar o hospedeiro (BEUTLER, 2004). Assim, a base da imunidade inata é a diferenciação entre o próprio e o não próprio a partir do reconhecimento de padrões conservados em patógenos.

Os organismos invertebrados desenvolveram uma variedade de reações imunológicas contra agentes externos. Diferente dos vertebrados, os invertebrados apresentam uma resposta imune inata, não adaptativa, não clonal e não antecipatória. Os mecanismos de defesa comuns, usados pela maioria dos invertebrados para proteger-se contra os agentes infecciosos, são a síntese e secreção de proteínas com atividade antibacteriana e antifúngica, a aglutinação e formação de nódulos, o encapsulamento de partículas estranhas, e a fagocitose (TAHSEEN, 2009). Em relação aos metazoários, a imunidade adaptativa está presente apenas em Agnatos e Gnatostomados, já a imunidade inata é compartilhada entre esses organismos e em grupos que tem o seu sistema imune composto exclusivamente por mecanismos inatos de defesa como os Cnidários, Artrópodes, Nematódeos, Moluscos, Anelídeos, Equinodermos, Urocordados e Cefalocordados (COOPER; ALDER, 2006). Tendo em vista a sua proximidade filogenética com os Cordados, tem-se proposto que os mecanismos efetores da imunidade inata de equinodermos, com destaque para os ouriços-do-mar, sejam conservados em organismos superiores. O ouriço-do-mar tem uma alta diversidade de receptores envolvidos na imunidade inata em relação a outras espécies de animais já caracterizados. Nestes organismos, a resposta imune é dividida em humoral (mediada por moléculas presentes nos fluidos corporais) e celular (mediada por células). O sequenciamento genômico do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* demonstrou que estes animais possuem um sistema imune bastante diversificado e mediado por um repertório surpreendente de proteínas de reconhecimento inato de patógenos (SODERGREN et al., 2006). Uma das características mais marcantes do genoma de *S. Purpuratus*, no que diz respeito a imunidade, é uma enorme expansão de três classes de proteínas de reconhecimento inato do sistema imunológico que compõem os receptores Toll-like (TLR), NACHT e proteínas contendo repetição rica em leucina (NLR) e receptor *scavenger* com domínios ricos em cisteína (SRCR). Cada uma destas classes de genes participa do reconhecimento de potenciais agentes patogênicos através de ligação direta ou indireta a padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs) (HIBINO et al., 2006). Além disso, foram identificados genes que codificam receptores com características estruturais anteriormente identificadas somente em animais protostomados.

Foram identificados, ainda, genes homólogos dos reguladores imunológicos e hematopoiéticos, muitos dos quais foram previamente identificados somente em cordados, bem como genes que são fundamentais na imunidade adaptativa de vertebrados com mandíbula (RAST et al., 2006). Acredita-se que cerca de 4 a 5% dos genes identificados no genoma do *S. Purpuratus* estejam envolvidos diretamente com o sistema imune (HIBINO et al., 2006), o que aponta estes organismos como excelentes modelos para o estudo das funções imunológicas.

Os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês “*Toll-like receptors*”) são elementos cruciais da imunidade inata que interagem com PAMPs para iniciar uma resposta antimicrobiana que envolve a fagocitose do organismo. Os TLRs são evolutivamente conservados, sendo encontrados desde o nematodeo *Caenorhabditis elegans* até os mamíferos (AKIRA e TAKEDA, 2004; BEUTLER, 2004; HOFFMAN, 2003; JANEWAY e MEDZHITOV, 2002 apud AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Os PAMPs reconhecidos pelos TLRs incluem lípidos, lipoproteínas, proteínas e ácidos nucleicos derivados de uma vasta gama de microrganismos como bactérias, vírus, parasitas e fungos. O reconhecimento de PAMPs por TLRs ocorre em diversos compartimentos celulares, incluindo a membrana plasmática, os endossomos e os lisossomos (KAWAI; AKIRA, 2010).

Além dos TLRs, foi identificada uma grande família de receptor *scavenger* de proteínas ricas em cisteína (RAST et al., 2006). Mais recentemente, foi demonstrado que os receptores *scavengers* desempenham um papel importante na defesa imune inata, atuando como receptores de reconhecimento padrão (PRR). Esses receptores reconhecem vários PAMPs, incluindo lipopolissacarídeo (LPS), ácido lipoteicoico (LTA), DNA bacteriano com sítios CpG e  $\beta$ -glucano (MUKHOPADHYAY E GORDON, 2004; ARESCHOUG E GORDON, 2008 apud ARESCHOUG; GORDON, 2009), mas evidências recentes sugerem que para muitas proteínas scavengers de superfície os microrganismos são os principais ligantes (JEANIN et al., 2005; PEISER et al., 2006; ARESCHOUG et al., 2008; PLÜDDEMANN et al., 2009a apud ARESCHOUG; GORDON, 2009). A função mais conhecida dos receptores scavengers é sua atuação no reconhecimento e fagocitose, além de atuar como co-receptores para os receptores de tipo Toll (TLR), em mamíferos.

A fagocitose consiste no processo em que a célula engolfa partículas sólidas. Organismos inferiores usam a fagocitose para captação de nutrientes, porém, a fagocitose em metazoários ocorre principalmente nas células fagocíticas do sistema imune e se tornou um mecanismo de eliminação de partículas estranhas ao organismo. Uma variedade de receptores fagocíticos, como os Toll-like e *scavengers*, são responsáveis pelo aumento na taxa fagocítica

dessas células especializadas (ADEREM; UNDERHILL, 1999). Os receptores genéricos de células do sistema imune inato reconhecem estruturas que são características de patógenos e não estão presentes em suas células, os PAMPS. Esses receptores são conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões e podem ativar funções antimicrobianas e pró-inflamatórias das células em que estão expressos e também facilitar a captação dessas partículas não próprias para dentro da célula (ABBAS; LICHTMAN; PILAI, 2008).

As células responsáveis pelo reconhecimento de patógenos e pela resposta do sistema imune em ouriços-do-mar são denominadas celomócitos (do grego *koilos*, oco; e *kytos*, compartimento). Os celomócitos são classificados em quatro tipos celulares distintos: fagócitos, células vibráteis, esferulócitos vermelhos e esferulócitos incolores. Estas células estão envolvidas na resposta imune inata (humoral e celular), tendo sido descrito o envolvimento de celomócitos na fagocitose de corpos estranhos, no reparo tecidual, na coagulação, na rejeição de transplantes e na síntese e liberação de moléculas com atividade antimicrobiana (DE FARIA; DA SILVA, 2008; SMITH et al., 2006). Em equinodermos, os celomócitos ocupam a cavidade celômica perivisceral, o sistema vascular de água e o sistema hemal, além do tecido conjuntivo e de tecidos de vários órgãos (GLIŃSKI; JAROSZ, 2000).

Os fagócitos constituem a maior subpopulação dos celomócitos, sendo as células responsáveis pela fagocitose. Além disso, tem sido relatado o envolvimento dos fagócitos na rejeição de enxertos, na quimiotaxia, encapsulamento, aglutinação e nas reações de coagulação (SMITH et al., 2006). O comprometimento funcional destas células, por conseguinte, pode levar à consequências prejudiciais sobre o sistema imunológico, afetando, portanto, a resistência dos organismos à doenças. Assim, estudos sobre os fagócitos têm sido utilizados como uma ferramenta para avaliação do sistema imune de invertebrados.

Os ecossistemas marinhos têm um papel ecológico fundamental para o planeta, e os impactos causados pelas atividades humanas parecem causar alterações irreversíveis sobre sua ecologia, essas alterações incluem a diminuição na produtividade do oceano, mudança na cadeia alimentar marinha, redução do número de espécies marinhas e aumento de doenças no ambiente marinho (HOEGH-GULDBERG E BRUNO, 2010 apud BRANCO et al., 2013). *Echinometra* são comumente relatados em águas rasas entre a maré baixa e média em profundidade de aproximadamente 10m (MCCLANAHAN; MUTHIGA, 2007), a espécie *Echinometra lucunter* é encontrada em clima tropical na costa brasileira e habita cavidades em pedras, expostas ao ar e ao sol durante a baixa maré e água do mar durante a maré alta (DE FARIA; DA SILVA, 2008). Ouriços-do-mar da espécie *E. Lucunter* são animais bentônicos, com capacidade de movimentação limitada (PEARSE, 2006), desta forma,

alterações ambientais podem afetar esses organismos, tornando-os excelentes bioindicadores. Atualmente, mudanças climáticas globais tem sido alvo de preocupação mundial, por isso, o aumento da temperatura da água dos oceanos e incidência de radiação ultravioleta tem sido alvo de estudos científicos. Além disso, a salinidade do oceano pode variar tanto geograficamente quanto temporalmente. A entrada da água que ocorre na superfície do oceano, devido à precipitação ou aporte fluvial, pode levar à redução temporal e local da salinidade. Por outro lado, a salinidade pode ser aumentada pela evaporação da água (TALLEY et al., 2002).

Os ouriços-do-mar da espécie *E. lucunter* (Linnaeus, 1758) habitam áreas rasas e por isso estão sujeitos a variações diárias de temperatura e salinidade, conseqüentemente, são excelentes organismos para o estudo e a compreensão do efeito de estressores ambientais sobre o sistema imunológico de invertebrados. O estudo da ação de estressores químicos e físicos sobre a fisiologia das células somáticas de equinodermos pode contribuir para a compreensão dos efeitos das mudanças climáticas sobre as populações de invertebrados marinhos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar a capacidade fagocítica de celomócitos do ouriço-do-mar *E. lucunter* submetidos ao estresse salino.



## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar a capacidade fagocítica de celomócitos do ouriços-do-mar *E. lucunter* submetidos ao estresse salino.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a capacidade fagocítica de celomócitos de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter*;
- Analisar a capacidade fagocítica de celomócitos de ouriços-do-mar *E. lucunter* submetidos a estresse salino;
- Analisar as concentrações celulares totais e subpopulacionais de celomócitos de ouriços-do-mar *E. lucunter* submetidos a estresse salino.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Coleta de Animais

Ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* foram coletados na Praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba – Brasil ( $7^{\circ}08'54''S$  e  $34^{\circ}47'44''O$ ) (Figura 1). Os animais foram armazenados em caixa de plástico com água do local e transportados até o laboratório. As coletas foram realizadas em maré baixa entre 0,1 e 0,5 m. O presente projeto é cadastrado e autorizado pelo Instituto Chico Mendes e Conservação da Biodiversidade - ICMBio (Processos 11545-1 e 32105-1).

No laboratório, os animais foram lavados com FSW (do inglês, *Filtered Sea Water*) e mantidos por 2 horas em caixa de plástico com FSW até metade da altura de sua carapaça. Após isso, foram transferidos e mantidos em aquário sob fluxo de ar constante e com o nível de água ajustado para 3,7 L FSW/indivíduo. A oxigenação foi feita através de bombas de aeração e a água era trocada sempre que necessária. A água do mar utilizada no laboratório foi coletada na Praia do Seixas, município de João Pessoa, Paraíba-Brasil ( $7^{\circ}09'S$ ,  $34^{\circ}47'O$ ) e filtrada no LABID (Laboratório de Biologia do Desenvolvimento) com uma rede de malha de 50  $\mu m$ . A água apresentava salinidade de 35‰, pH 8,0 e temperatura em torno dos 25°C.



**Figura 1:** *Echinometra lucunter* no local de coleta.

### 3.2 Obtenção das células

Os celomócitos foram obtidos através de uma punção na membrana peristomial do animal com uma seringa contendo solução anticoagulante ISO-EDTA (20 mM Tris, 0.5 M NaCl, 70 mM EDTA, pH 7.5) na proporção de 1:1 (ISO-EDTA:Fluido Celômico).

### 3.3 Determinação da concentração total de celomócitos

A concentração total de celomócitos foi determinada a partir da contagem do número total de células presentes no fluido celômico em câmara de Neubauer.

### 3.4 Determinação das subpopulações de celomócitos

O percentual das subpopulações de celomócitos (fagócitos, células vibráteis, esferulócitos vermelhos e esferulócitos incolores) foi analisado através de contagem diferencial dessas populações celulares em todos os tempos de estresse avaliados.

### 3.5 Avaliação da capacidade fagocítica com leveduras

Após a contagem celular total e populacional, a concentração de fagócitos foi ajustada para  $5 \times 10^5$  céls/mL em ISO-EDTA. As células foram, então, centrifugadas a 600g por 20 minutos. O pellet foi ressuscitado em fluido celômico, previamente centrifugado à 5000 rpm por 20 minutos, e esterilizado, sob fluxo laminar, com filtro de 0,22  $\mu$ m. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Fermento biológico fresco *Fleischmann*;  $1 \times 10^7$  cels/mL) foram adicionadas à cultura de celomócitos na proporção de 1:1 e a análise da fagocitose realizada em microscopia óptica comum, após duas horas de incubação, por meio da contagem diferencial do número de leveduras por fagócito.

### 3.6 Avaliação da capacidade fagocítica com microesferas fluorescentes de látex

Após a contagem celular total e populacional, a concentração de fagócitos foi ajustada para  $5 \times 10^5$  céls/mL em ISO-EDTA. As células foram, então, centrifugadas a 600g por 20 minutos. O precipitado celular foi ressuscitado em fluido celômico, previamente centrifugado à 5000 rpm por 20 minutos, e esterilizado, sob fluxo laminar, com filtro de 0,22  $\mu$ m. As células foram incubadas por uma hora com microesferas fluorescentes de látex (2,00 micrômetros, Fluoresbrite® Yellow Green, 2%) na proporção de 1:10 (células:microesferas). As amostras foram fixadas com formol 4% (1:1) e a análise realizada em citometria de fluxo

(FACSCalibur, BD Biosciences) no canal de fluorescência FL1 (verde). Os resultados obtidos em citometria foram analisados no programa Flowing Software 2 (Perttu Terho). Para a avaliação do efeito do estresse salino na capacidade fagocítica, a fagocitose foi avaliada 1, 6, 24 e 48 horas após o início do estresse.

A capacidade fagocítica e índice fagocítico foram calculados com base nas seguintes equações:

$$\text{Capacidade Fagocítica} = \frac{\text{número de fagócitos fagocitando}}{100 \text{ fagócitos}}$$

$$\text{Índice Fagocítico} = \frac{\text{número total de microesferas fagocitadas}}{\text{número de fagócitos fagocitando}}$$

### 3.7 Fotomicrografia

Microesferas fluorescentes foram adicionadas às células por 30 minutos, em seguida os celomócitos foram incubados ao corante marcador mitocondrial TMRE (75 nM) por 10 minutos e as fotos obtidas em microscopia de fluorescência (Olympus BX41, objetiva 100x). As fotomicrografias foram processadas no Photoshop versão 12.0 (Adobe Systems).

### 3.8 Ensaio de estresse salino

Os animais foram aclimatados por uma semana em aquário contendo FSW e fluxo de ar constante a 25 °C antes da submissão ao estresse hipossalino (25‰) ou hipersalino (45‰). O grupo controle foi mantido sob 35‰, a água do mar filtrada (FSW) foi diluída através de adição de água destilada até atingir 25‰ e em seguida foi adicionado 69g de sal marinho sintético (*Tetramarine salt pro*) obtendo assim a salinidade de 35‰. Para o estresse hipossalino a água do mar filtrada (FSW) foi diluída com água destilada até atingir 15‰, após isso foi adicionado 69g de sal marinho sintético (*Tetramarine salt pro*) para atingir a salinidade de 25‰. Já para o estresse hipersalino foi realizada a adição de 69g de sal marinho sintético a água do mar filtrada (35‰). Foram utilizados dois animais para cada grupo, e a temperatura foi mantida a 25°C, temperatura e salinidade foram verificadas diariamente.

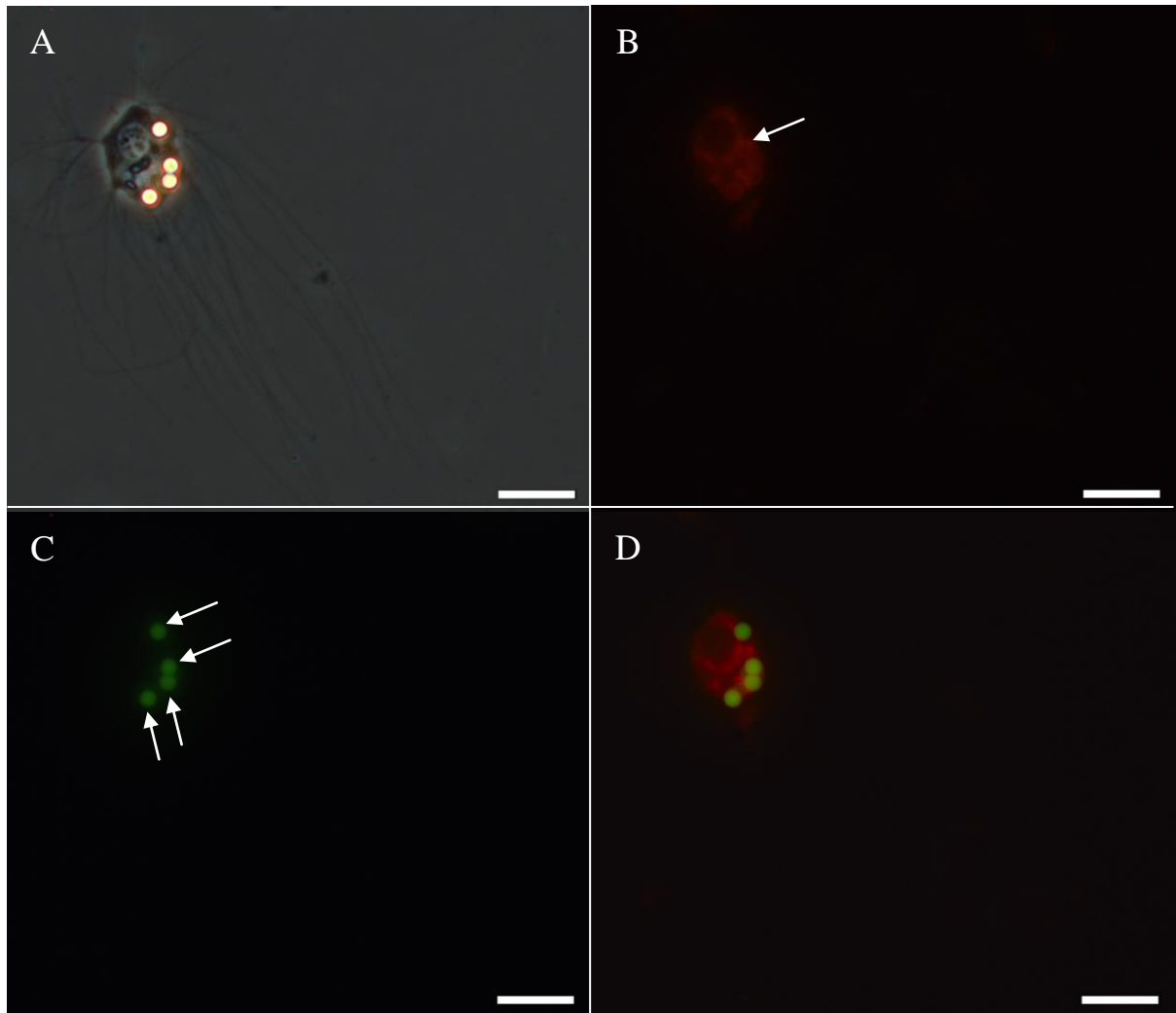
### **3.9 Análise estatística**

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Os dados foram analisados pelo teste de normalidade D'Agostino e Pearson, e as amostras com distribuição não gaussianas foram transformadas para arcosseno e analisadas através do teste *t* de student, sendo os valores expressos como média  $\pm$  erro padrão (SEM).

## 4. Resultados

### 4.1 Atividade fagocítica dos celomócitos de *E. lucunter* *in vitro*

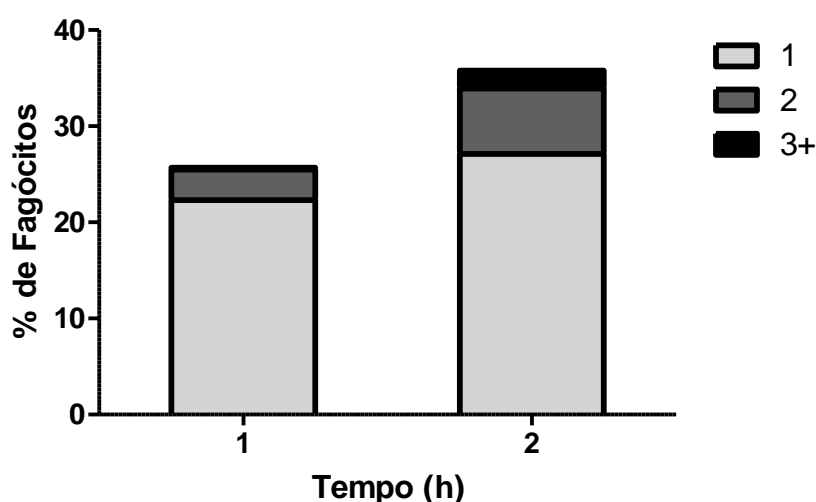
A capacidade fagocítica da população total de celomócitos, dez minutos após a adição das microesferas, foi  $19,47 \pm 2,01\%$ . O percentual de células fagocíticas após 30 minutos, foi  $15,72 \pm 1,0\%$ . Não houve alteração na capacidade fagocítica após 80 minutos da adição das microesferas. Foi observado, em microscopia de fluorescência, a fagocitose de até 13 microesferas fluorescentes uma hora após a adição das microesferas (dados não mostrados). Na Figura 2 podemos observar a fagocitose de quatro microesferas fluorescentes realizada por um fagócito após 30 minutos de incubação com as mesmas.



**Figura 2: Fotomicrografia de um fagócito do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*.** A: microscopia de contraste de fase; B: fagócito marcado com o corante fluorescente TMRE; C: microesferas fluorescentes; D: sobreposição dos campos B e C. As setas brancas indicam as mitocôndrias marcadas com TMRE (B) e as microesferas fagocitadas (C). Barra de escala =  $10\mu\text{M}$ .

## 4.2 Capacidade fagocítica de celomócitos de ouriços-do-mar *E. lucunter* em ensaio com leveduras

O ensaio de fagocitose com leveduras, após 1 hora, revelou uma capacidade fagocítica de  $25,7 \pm 1,1$  %, com uma média de  $22,3 \pm 0,98$ % das células realizando fagocitose de uma levedura;  $3,16 \pm 0,38$ % de duas leveduras; e  $0,2 \pm 0,07$ % de 3 leveduras ou mais (Figura 3). Após 2 horas de incubação na presença de leveduras, a capacidade fagocítica aumentou para  $35,73 \pm 1,57$ %, onde  $27,13 \pm 1,22$ % das células fagocitaram apenas uma levedura;  $6,8 \pm 0,68$ % realizaram a fagocitose de duas leveduras; e  $1,8 \pm 0,3$ % apresentaram três ou mais leveduras fagocitadas.



**Figura 3. Capacidade fagocítica dos fagócitos de *E. lucunter* em ensaio com leveduras.** 1: células que fagocitaram 1 microesfera; 2: células que fagocitaram 2 microesferas; 3+: células que fagocitaram 3 ou mais microesferas. Os valores representam a média de dez experimentos realizados em triplicata.

## 4.3 Capacidade fagocítica de celomócitos de ouriços-do-mar *E. lucunter* em ensaio com microesferas fluorescentes

Na avaliação da fagocitose de microesferas fluorescentes foi observado uma capacidade fagocítica de  $58,3 \pm 5,23$ %, com uma média de  $14,27 \pm 0,73$ % das células realizando fagocitose de apenas uma microesfera;  $9,45 \pm 0,32$ % de duas microesferas; e  $34,58 \pm 5,38$ % de três microesferas ou mais após uma hora de incubação com as microesferas (Tabela 1).

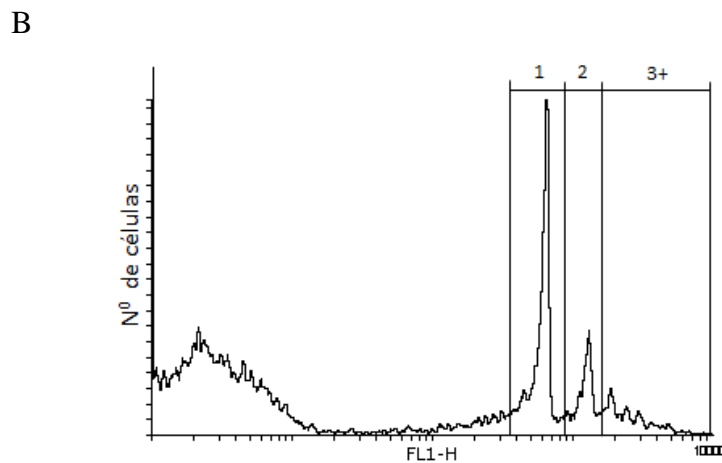
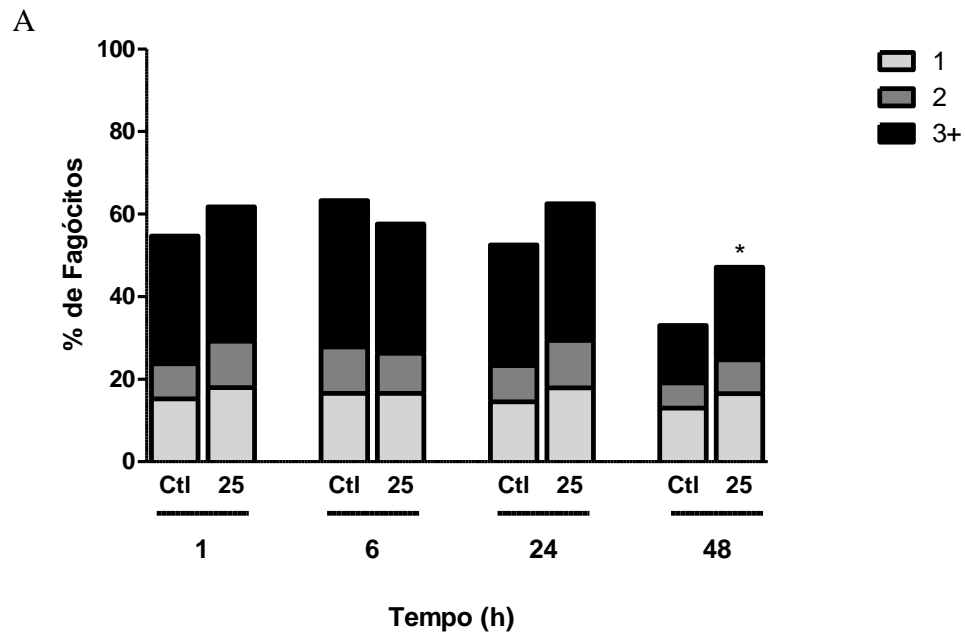
**Tabela 1. Capacidade fagocítica dos fagócitos de *E. lucunter* em ensaio com microesferas fluorescentes.** 1: células que fagocitaram 1 microesfera; 2: células que fagocitaram 2 microesferas; 3+: células que fagocitaram 3 ou mais microesferas. Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (SEM) de quatro experimentos realizados em triplicata.

Nº de microesferas fagocitadas	Capacidade Fagocítica	SEM
0	41,70	5,23
1	14,27	0,73
2	9,45	0,32
3 ou mais	34,58	5,38

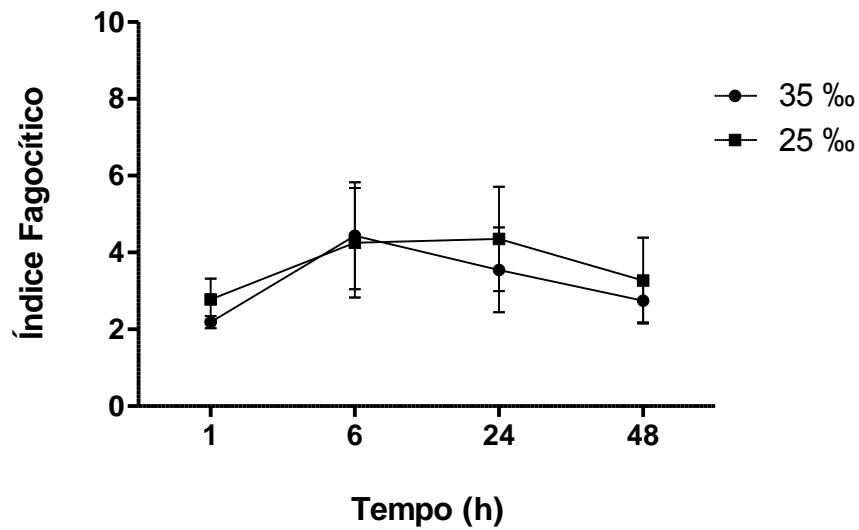
#### 4.4 Capacidade fagocítica de celomócitos de ouriços-do-mar *E. lucunter* submetidos a estresse hipossalino

A análise da resposta das células fagocíticas de animais submetidos a estresse hipossalino (25‰, Figura 4) revelou que a capacidade fagocítica manteve-se estável 1, 6 e 24 horas após o estresse, com uma média de  $58,71 \pm 1,71\%$  ( $15,4 \pm 0,4\%$  das células realizando fagocitose de uma microesfera;  $9,5 \pm 0,4\%$  de duas microesferas; e  $31,8 \pm 2,3\%$  de 3 microesferas ou mais). A capacidade fagocítica aumentou 42,62%, 48 horas após o estresse ( $33,01 \pm 4,19\%$  no grupo controle contra  $47,08 \pm 4,35\%$  no estresse hipossalino). A análise do índice fagocítico (IF, Figura 5) não revelou alteração entre o grupo controle e o tratamento submetido ao estresse hipossalino em nenhum dos intervalos de tempo monitorados.





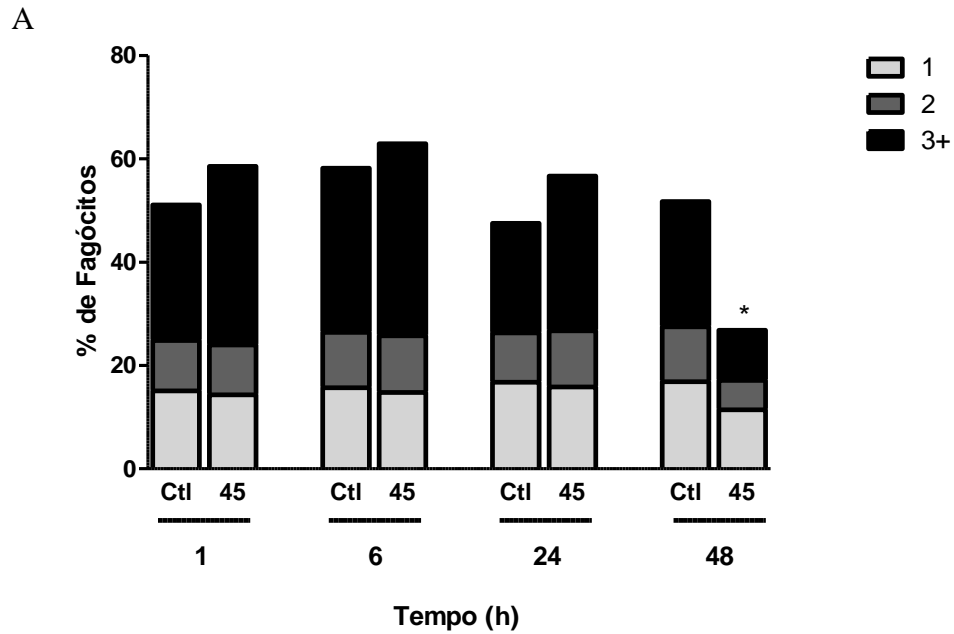
**Figura 4. Capacidade fagocítica dos fagócitos de *E. lucunter* submetidos ao estresse hipossalino (25%).** (A) Capacidade fagocítica. Os valores representam a média de dois experimentos realizados em triplicata. (B) Histograma de um experimento representativo de dois experimentos; 1: células que fagocitaram 1 microesfera; 2: células que fagocitaram 2 microesferas; 3+: células que fagocitaram 3 microesferas ou mais; FLH-1: intensidade de fluorescência. Asterisco indica diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).



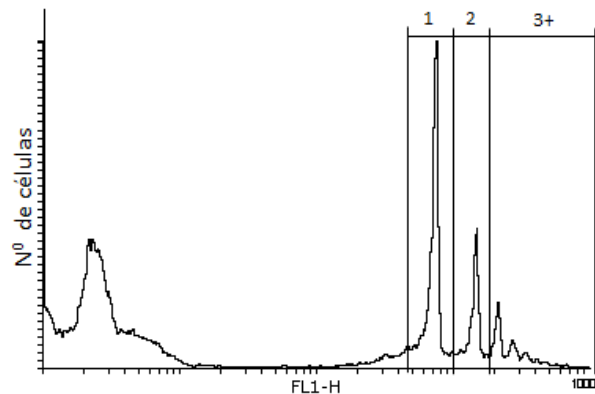
**Figura 5:** Índice fagocítico dos fagócitos de *E. lucunter* submetidos ao estresse hipossalino (25‰). Os valores representam a média de dois experimentos realizados em triplicata.

#### 4.5 Capacidade fagocítica de celomócitos de ouriços-do-mar *E. lucunter* submetidos a estresse hipersalino

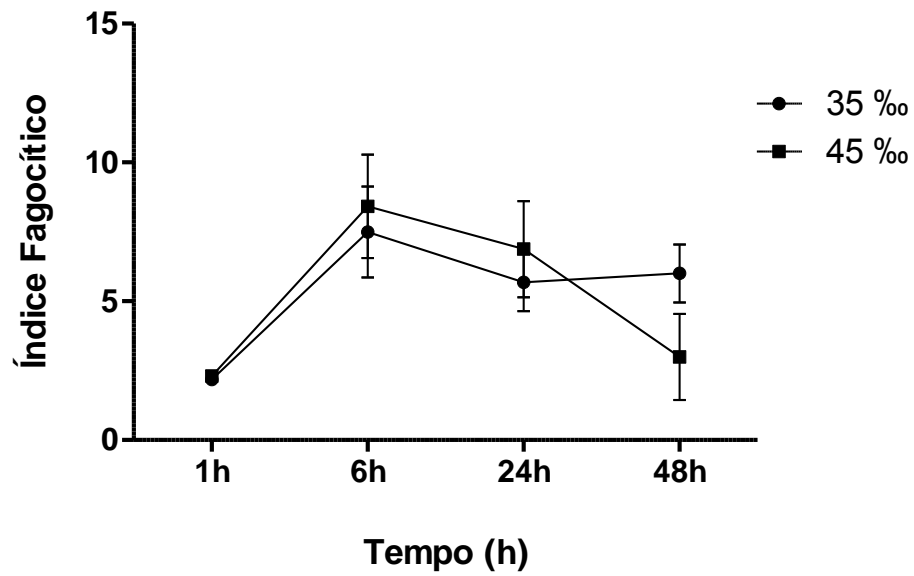
A avaliação da fagocitose em animais submetidos a estresse hipersalino (45‰, Figura 6) revelou uma diminuição de 48,19% na capacidade fagocítica apenas nos animais submetidos ao estresse por 48 horas ( $51,71 \pm 5,11\%$  contra  $26,79 \pm 3,35\%$ ). Não foi observada alteração na capacidade fagocítica até o período de 24 horas de estresse ( $55,79 \pm 1,93\%$ ; onde  $15,4 \pm 0,36\%$  das células fagocitaram uma microesfera;  $10,26 \pm 0,31\%$  fagocitaram duas microesfera;  $30,13 \pm 1,54$  dos celomócitos fagocitaram três microesferas ou mais). Foi observada uma redução do índice fagocítico (IF, Figura 7) quando os animais foram submetidos ao estresse por 48 horas, onde o valor do IF do grupo controle foi de  $6 \pm 1,0$  contra  $2,99 \pm 1,55$  para o IF dos celomócitos dos animais submetidos ao estresse hipersalino.



B



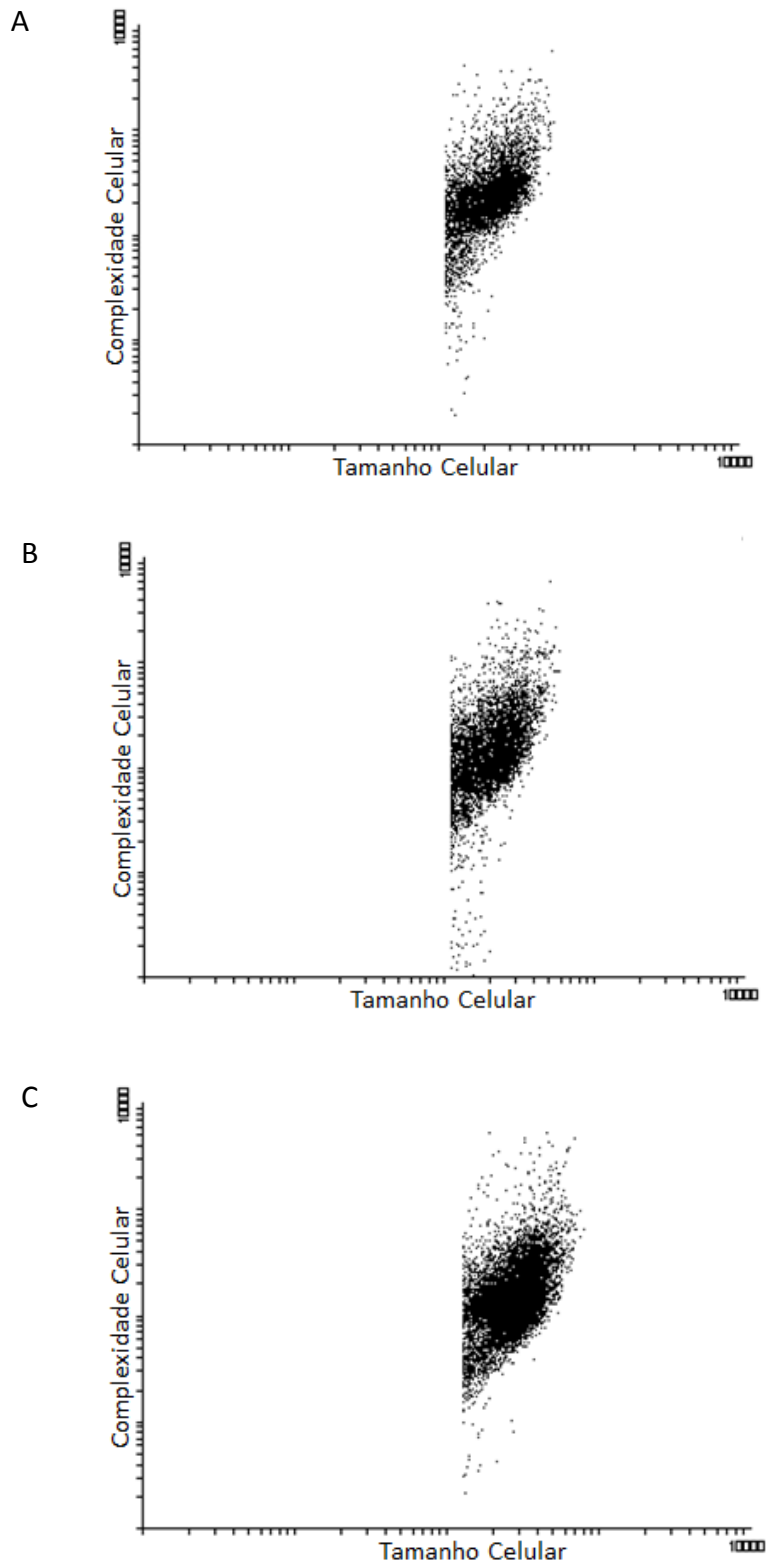
**Figura 6. Capacidade fagocítica dos fagócitos de *E. lucunter* submetidos ao estresse hipersalino (45%).** (A) Capacidade fagocítica. Os valores representam a média de dois experimentos realizados em triplicata. (B) Histograma de um experimento representativo de dois experimentos; 1: células que fagocitaram 1 microesferas; 2: células que fagocitaram 2 microesferas; 3+: células que fagocitaram 3 microesferas ou mais; FLH-1: intensidade de fluorescência. Asterisco indica diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).



**Figura 7:** Índice fagocítico dos fagócitos de *E. lucunter* submetidos ao estresse hipersalino (45‰). Os valores representam a média de dois experimentos realizados em triplicata.

#### 4.6 Análise morfológica de celomócitos de ouriços-do-mar *E. lucunter* submetidos a estresse salino

A análise dos celomócitos sob citometria de fluxo não demonstrou diferença entre a morfologia das células dos animais do grupo controle e daqueles submetidos a estresse hipossalino ou hipersalino (Figura 8).



**Figura 8. Morfologia celular de celomócitos de ouriço-do-mar submetidos a estresse salino. A:** controle (35‰); **B:** estresse hipossalino (25‰); **C:** estresse hipersalino (45‰). *Dot plot* de um experimento representativo de quatro experimentos.

#### **4.7 Determinação da concentração total e populacional de celomócitos de *E. lucunter* submetidos a estresse hipossalino**

A concentração total de celomócitos, assim como as populações de fagócitos, células vibráteis e esferulócitos incolores, não se alteraram após uma hora de acondicionamento dos animais sob estresse hipossalino (ASW 25‰). No entanto, foi observado um aumento de 100% na população de esferulócitos vermelhos (Tabela 2). A concentração total de celomócitos, assim como o percentual de fagócitos e células vibráteis, mantiveram-se estáveis após 6 horas de acondicionamento, porém foi observado um aumento nas populações de esferulócitos vermelhos (190%) e esferulócitos incolores (100%) (Tabela 2). Vinte e quatro horas após o início do estresse, não foi observado aumento na concentração total de celomócitos e nem nas populações de fagócitos e células vibráteis. Contudo, neste intervalo de tempo também foi observado um aumento populacional dos esferulócitos vermelhos (400%) e dos esferulócitos incolores (600%). Verificou-se, ainda, um aumento de 150% e 125% nas populações de esferulócitos incolores e esferulócitos vermelhos, respectivamente, após 48 horas de acondicionamento, enquanto que não houve alteração nas demais populações celulares e nem na concentração total de celomócitos (Tabela 2).

**Tabela 2. Concentração total e das subpopulações de celomócitos de *E. lucunter* submetidos a estresse hipossalino (25‰). ASW: Água do mar artificial; SEM = Erro padrão da média.**

Tratamento	Células/mL (x10 <sup>4</sup> )		Fagócitos/mL (%)		Vibrátil/mL (%)		Esferulócito Vermelho/mL (%)		Esferulócito Incolor/mL (%)	
	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM
<b>1h</b>										
<b>Controle</b>	652,6	70,16	50,5	3,753	47	4,203	4	2,415	1	1
<b>ASW 25‰</b>	672,1	58,64	45,25	9,393	45,75	7,609	8	3,697	1	0,7071
<b>6h</b>										
<b>Controle</b>	1355	144,3	61,25	2,462	35,25	2,016	2,5	0,5	1	0,4082
<b>ASW 25‰</b>	816,5	123,6	55,75	11,21	34,25	8,459	7,25	3,119	2,5	0,6455
<b>24h</b>										
<b>Controle</b>	1290	183,7	65,25	10,32	31,5	8,5	3	1,915	0,25	0,25
<b>ASW 25‰</b>	1495	247,6	50	2,38	34,75	2,175	15	2,449	1,75	0,75
<b>48h</b>										
<b>Controle</b>	1593	258,2	60,75	7,064	34,75	6,169	3,5	1,5	1	1
<b>ASW 25‰</b>	1027	226,5	57,5	4,252	31,5	2,784	8,75	2,529	2,25	1,031

#### **4.8 Determinação da concentração total e populacional de celomócitos de *E. lucunter* submetidos a estresse hipersalino**

A concentração total de celomócitos, após uma hora de acondicionamento dos animais sob estresse hipersalino (ASW 45‰), aumentou em 28,26% (Tabela 3). No entanto, a população de fagócitos, assim como células vibráteis e esferulócitos vermelhos e incolores não se alteraram. A concentração total de celomócitos após 6 horas de estresse hipersalino aumentou em 61,55%, assim como o percentual de esferulócitos vermelhos (72,72%) (Tabela 3). Porém, neste intervalo de tempo, as populações de fagócitos, células vibráteis e esferulócitos vermelhos mantiveram-se estáveis. A concentração total de celomócitos às 24 horas de estresse aumentou em 59,54%. Neste mesmo período, foi observado um aumento a população de esferulócitos vermelhos (133,33%) e esferulócitos incolores (700%) (Tabela 3). No entanto, as populações de fagócitos e células vibráteis não se alteraram. Quarenta e oito horas após o acondicionamento em estresse hipersalino houve um aumento na concentração total de celomócitos (66,72%), bem como no percentual de esferulócitos vermelhos (250%) e esferulócitos incolores (566,8%), não havendo, no entanto, alteração nas demais populações (Tabela 3).



**Tabela 3. Concentração total e das subpopulações de celomócitos de *E. Lucunter* submetidos a estresse hipersalino (45‰). ASW: Água do mar artificial; SEM = Erro padrão da média.**

Tratamento	Células/mL (x10 <sup>4</sup> )		Fagócitos/mL (%)		Vibrátil/mL (%)		Esferulócito Vermelho/mL (%)		Esferulócito Incolor/mL (%)	
	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM
<b>1h</b>										
<b>Controle</b>	1432	2,658	52,75	3,568	40	2,041	5	3,786	2,25	0,4787
<b>ASW 45‰</b>	1980	296,2	54,5	7,053	35,5	4,272	6,5	2,5	3,5	1,555
<b>6h</b>										
<b>Controle</b>	1173	114	62,25	4,644	33,75	4,871	2,75	0,75	1,75	0,75
<b>ASW 45‰</b>	1895	174,9	58,75	8,25	37,75	7,204	4,75	1,887	1,5	0,6455
<b>24h</b>										
<b>Controle</b>	1436	263,6	52	7,382	44	6,124	3,75	1,25	0,25	0,25
<b>ASW 45‰</b>	2291	392,2	53	8,727	36,25	7,33	8,75	1,931	2	0,7071
<b>48h</b>										
<b>Controle</b>	1163	180,8	62,5	8,665	35,5	8,15	2	2	0,25	0,25
<b>ASW 45‰</b>	1939	152,6	54	1,732	37,33	4,702	7	3,512	1,667	0,3333

## 5. Discussão

Os organismos marinhos, em especial os bentônicos, podem atuar como excelentes biosensores no monitoramento das condições do ecossistema aquático frente à estressores químicos ou físicos. Os ouriços-do-mar *E. Lucunter*, por habitarem zonas entremarés, estão sujeitos a variações ambientais, tais como temperatura e salinidade, sendo, portanto, um excelente organismo modelo para o estudo do efeito de agentes estressores sobre a fisiologia destes organismos. No presente trabalho foi avaliado o efeito do estresse salino na fagocitose de celomócitos de *E. lucunter*. Os nossos resultados demonstraram que o estresse salino crônico (48h) afetou a fagocitose mediada pelos celomócitos, apresentando um aumento na capacidade fagocítica em estresse hipossalino (Figura 4), alterações nas subpopulações celulares em estresse hipossalino (Tabela 2), diminuição na capacidade fagocítica (Figura 6) e índice fagocítico em estresse hipersalino as 48h (Figura 7), além de alterações nas concentrações celulares totais e subpopulacionais em condições de estresse hipersalino (Tabela 3).

Neste trabalho, demonstramos que após uma hora de incubação com as leveduras a capacidade fagocítica de celomócitos de ouriço-do-mar *E. lucunter* foi 25,7%, e após duas horas de fagocitose a capacidade fagocítica foi 35,7% (Figura 3). Corroborando com os nossos dados, Borges e colaboradores (2002) verificaram, em ensaios de fagocitose com leveduras, que a capacidade fagocítica *in vitro* de celomócitos do ouriço-do-mar *Sterechinus neumayeri* foi 22,9% e 33,2%, após uma e duas horas de incubação, respectivamente. Adicionalmente, em estudo com o ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* foi demonstrado que os celomócitos desta espécie apresentavam capacidade fagocítica de 49,6% em fagocitose de leveduras *in vitro* (1 hora de incubação) (BRANCO et al., 2003). Em ouriços-do-mar, os fagócitos são as únicas células capazes de realizar a fagocitose e em *E. lucunter* essas células correspondem a  $56 \pm 16,4\%$  dos celomócitos. Tais tipos celulares foram capazes realizar a fagocitose de microesferas de látex e leveduras, sendo a capacidade fagocítica dos celomócitos incubados com microesferas fluorescentes de 58,3% (Tabela 1) e de 25,7% em células incubadas com leveduras (Figura 3), ambos a 1 hora de incubação. A internalização de partículas inertes, como as microesferas de látex, ocorre por fagocitose inespecífica envolvendo a extensão de filopódios da superfície da célula que cerca e envolve a partícula sem participação conhecida de receptores específicos; por outro lado, a fagocitose de leveduras é mediada pelo reconhecimento de PAMPS por receptores da superfície celular (ADEREM; UNDERHILL, 1999). Sugere-se, por este motivo, que tenhamos observamos

uma maior capacidade fagocítica em células incubadas com microesferas (58,3% em fagocitose de microesferas contra 25,7% em fagocitose de leveduras), já que a fagocitose inespecífica de partículas inertes não necessita de reconhecimento pelos receptores.

Em nosso estudo observamos um aumento na capacidade fagocítica quando os animais foram submetidos ao estresse hipossalino (25‰) por 48 horas (Figura 4). No entanto, verificamos uma diminuição na capacidade fagocítica dos celomócitos de animais submetidos ao estresse hipersalino (45‰) também por 48 horas (Figura 6). Tais resultados demonstram que a salinidade é capaz de afetar a atividade fagocítica. Os nossos dados divergem dos obtidos por Wang e Liu (2008). Ao avaliar a capacidade fagocítica do pepino-do-mar *Apostichopus japonicus*, os autores observaram um aumento da capacidade fagocítica nos tempos de 0,5 e 1 hora em animais submetidos à diminuição (25‰) ou aumento da salinidade (35‰), porém não foram observadas diferenças significativas na capacidade fagocítica entre 3 e 72 horas. Sugere-se que essa diferença entre os nossos resultados e os resultados obtidos por Wang e Liu ocorre pois ouriços-do-mar *E. lucunter* estão sujeitos a variações diárias de salinidade devido ao seu habitat e por isso suportam melhor o estresse agudo e respondem apenas ao estresse crônico (48h).

Adicionalmente, observamos que não houveram modificações na morfologia dos celomócitos dos animais submetidos ao estresse salino (Figura 8), sugerindo que as alterações na capacidade fagocítica podem estar relacionadas à alterações fisiológicas nos fagócitos. Estudos adicionais precisam ser realizados para a elucidação desses mecanismos. Uma célula pode apresentar alterações de volume quando exposta a um meio hipotônico ou hipertônico. Devido ao fenômeno de osmose, que consiste no deslocamento da água do meio mais concentrado para o meio menos concentrado em soluto, a célula pode perder água, e conseqüentemente apresentar uma redução de volume, quando colocada em um meio hipertônico; assim como a entrada de água em uma célula, quando esta estiver em meio hipotônico, pode acarretar em um aumento de volume. Além deste fato, em diversas células eucarióticas ocorre a ativação de vias que são responsáveis pela produção de osmólitos compatíveis (por exemplo, mio-Inositol, taurina, N-óxido de trimetilamina (TMAO)) e antioxidantes (glutathione, vitamina C, vitamina E e enzimas como a catalase, superóxido dismutase e peroxidases) sob situações de estresse salino ou osmótico (XIONG;SCHUMAKER; ZHU, 2002). Espécies reativas de oxigênio são descritas como um marcador de estresse em situações de contaminação por metal pesado (PINSINO; THORNDYKE; MATRANGA, 2007), UVB (KULMS et al., 2002), mutagênicos químicos e calor (BRUSKOV et al., 2002). Em células de mamíferos foi identificado que o estresse

oxidativo provoca efeitos na polimerização de actina e mudanças na organização do citoesqueleto (MILZANI; DALLEDONNE; COLOMBO, 1997; FARAH et al., 2012). O citoesqueleto é importante na fagocitose, e todos os processos de fagocitose são acionados pelo rearranjo do esqueleto de actina (MAY et al., 2001 apud LI et al., 2013). Após o reconhecimento da partícula a ser fagocitada, ocorre a reorganização local do citoesqueleto de actina que fornece a força motriz para a englobamento da partícula (ADEREM; UNDERHILL, 1999). As células do sistema imune inato em vertebrados e invertebrados produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) por muitos mecanismos intracelulares (DeVeale et al. 2004), este é um mecanismo de defesa particularmente importante utilizado por organismos multicelulares (GOMEZ et al. 2005 apud MCCAUGHEY; BODNAR, 2012). O desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio sob situações de estresse pode estar relacionados com alterações na capacidade fagocítica observadas em nosso estudo. Estudos adicionais, com o objetivo de investigar a produção de espécies reativas de oxigênio durante o estresse salino podem vir a esclarecer o mecanismo responsável pela alteração na capacidade fagocítica dos celomócitos de ouriços-do-mar submetidos ao estresse salino.

Uma outra forma de analisar o efeito de um agente estressor sobre a fagocitose é a partir do cálculo do índice fagocítico, que leva em consideração o número de partículas fagocitadas por uma determinada população celular, refletindo, assim, o grau de atividade do processo de fagocitose. Os nossos dados revelaram um aumento no índice fagocítico quando os animais foram submetidos ao estresse hipersalino por 48 horas (Figura 7), porém, ainda é necessário a realização de ensaios adicionais para que seja possível uma análise estatística robusta sobre os dados obtidos. Não há na literatura estudos que avaliem o parâmetro de índice fagocítico para ouriços-do-mar submetidos a estresse salino, contudo, em estudo com animais submetidos ao aumento de temperatura, ouriços-do-mar *E. lucunter* não apresentaram alteração na capacidade fagocítica, índice fagocítico, capacidade germicida, adesão e propagação celular, (MUNARI; MATOZZO; MARIN, 2011). Os invertebrados marinhos, inclusive os equinodermos, são essencialmente isosmóticos em relação ao meio, o que significa que seus fluidos corpóreos e a água do mar possuem a mesma pressão osmótica. Equinodermos diante de variações de salinidade da água, são osmoconformadores, ou seja, animais que variam seu meio interno acompanhando a variação da água externa (CASTELLANO, 2009). Adicionalmente, são considerados animais estenohalinos, não suportando, assim, amplas variações de salinidade (FREIRE; SANTOS; VIDOLIN, 2011). Desta forma, amplas alterações na salinidade ambiental podem ser refletidas no fluido celômico e conseqüentemente influenciar na atividade dos fagócitos.

Os nossos resultados revelaram um aumento no percentual de esferulócitos vermelhos quando os animais foram submetidos ao estresse hipossalino (100,0%, 190,0%, 400,0% e 150,0%; 1, 6, 24 e 48 horas, respectivamente) (Tabela 2), ou hipersalino (30,0%, 72,72%, 133,33% e 250,0%; 1, 6, 24 e 48 horas, respectivamente) (Tabela 3), além de um aumento na concentração total de celomócitos em animais submetidos a estresse hipersalino (28,26%, 61,55%, 59,54%, 66,72%; 1, 6, 24 e 48 horas, respectivamente) (Tabela 3). Ensaio adicionais serão realizados para aumentarmos a amostragem experimental de forma que seja possível a realização de um tratamento estatístico dos dados. Outros autores, estudando o efeito de agentes estressores distintos, também verificaram alterações nas populações de esferulócitos vermelhos. Pinsino e colaboradores (2008) também observaram aumento na população de esferulócitos vermelhos em animais que habitavam áreas poluídas em comparação com animais que habitam áreas sem poluição. Em adição a esses dados, Matranga e colaboradores (2000) verificaram uma alteração na concentração de esferulócitos vermelhos em animais expostos à poluição, onde esta subpopulação celular apresentou um percentual entre 25 e 37% nos animais coletados em águas poluídas, sendo ausente em animais coletados em águas não poluídas. Matranga e colaboradores (2000) avaliaram a resposta ao estresse dos celomócitos de animais submetidos ao estresse térmico através da expressão de proteínas de choque térmico (hsp70). Os autores observaram um aumento na expressão dessas proteínas em celomócitos de *Paracentrotus lividus* submetidos a baixas temperaturas (4°C), sendo este aumento observado até 60 minutos após a indução do estresse. Munari e colaboradores (2011) também observaram que os animais responderam ao estresse térmico com um aumento na concentração de esferulócitos vermelhos e incolores nos períodos de 24 horas a 7 dias (BRANCO et al., 2013). As alterações nas concentrações celulares podem ocorrer devido a um processo de migração celular do celoma perivisceral para a membrana peristomial (DE FARIA; DA SILVA, 2008), ou devido a uma divisão celular rápida de células tronco ou circulantes (PINSINO et al., 2008). Faria e Silva (2008) verificaram o fenômeno de migração celular dos celomócitos para a membrana peristomial após estimulação com nanquim, desde 24 horas até 2 semanas após estímulo. Os esferulócitos são responsáveis pela liberação de substâncias antibacterianas e antifúngicas que podem ser um fator importante em situações de estresse. A manutenção na concentração de fagócitos, em ambas as condições de salinidade, demonstra que o aumento na capacidade fagocítica não ocorreu devido ao aumento na concentração de fagócitos e sim ao aumento na capacidade dessas células de realizar fagocitose, o que pode estar relacionado com a variação populacional dos esferulócitos

vermelhos. Em estudo com as subpopulações de celomócitos em ouriços-do-mar da espécie *Paracentrotus lividus* foi observado que a atividade citotóxica dos celomócitos é atribuída aos esferulócitos incolores e fagócitos, assim, os autores sugerem que os fagócitos podem contribuir na atividade citotóxica dos esferulócitos incolores, já que quando a atividade citotóxica das duas subpopulações misturadas foi avaliada houve um aumento de 26,5% (nos fagócitos) e 56,6% (nos esferulócitos) para 78% (ARIZZA et al., 2007), baseado nos resultados deste trabalho sugerimos que em celomócitos de ouriço-do-mar da espécie *E. lucunter* pode ocorrer a colaboração dos esferulócitos vermelhos para o aumento da fagocitose pelos fagócitos.

O presente trabalho é o primeiro relato na literatura da resposta de celomócitos de ouriço-do-mar *E. lucunter* ao estresse salino. O *E. lucunter* habita zonas entremarés de costões rochosos, tornando-os mais expostos a variações ambientais (BRANCO et al., 2013), o que explica o fato destes animais apresentarem-se mais resistentes à situações de estresse de curta duração, o que pode ser confirmado pelos nossos dados, onde as alterações na capacidade fagocítica dos celomócitos foi observada somente nos animais submetidos ao estresse por um período de 48 horas. Os parâmetros avaliados nesse trabalho, após estudos adicionais, podem ser utilizados como bioindicadores de situações de estresse, sendo úteis no biomonitoramento de regiões costeiras.

## 6. Conclusões

O estresse salino alterou tanto o perfil das subpopulações de celomócitos de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* quanto a capacidade fagocítica dos fagócitos, afetando o sistema imune destes animais. Estes parâmetros celulares podem ser utilizados, após estudos adicionais, como bioindicadores no monitoramento ambiental.

## 7. Referências:

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Elsevier, 2008.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual review of immunology**, v. 17, p. 593–623, 1999.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.

ARESCHOUG, T.; GORDON, S. Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. **Cellular microbiology**, v. 11, n. 8, p. 1160–1169, 2009.

ARIZZA, V. et al. Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 147, n. 2, p. 389–94, 2007.

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

BORGES, J. C. et al. Phagocytosis in vitro and in vivo in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* at 0 ° C Phagocytosis index. **Polar Biology**, p. 1–15, 2002.

BRANCO, P. C. et al. **O efeito do aquecimento global no sistema imune de ouriços- do-mar**. São Paulo: FMU, 2003.

BRANCO, P. C. et al. 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**, p. 1–7, 2013.

BRUSKOV, V. I. et al. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 6, p. 1354–63, 2002.

CASTELLANO, G. C. **Manutenção de gradientes de concentração entre o fluido celomico e a água do mar em equinodermos**. Curitiba: UFPR, 2009.



- COOPER, M. D.; ALDER, M. N. The evolution of adaptive immune systems. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 815–22, 2006.
- DE FARIA, M. T.; DA SILVA, J. R. M. C. Innate immune response in the sea urchin *Echinometra lucunter* (Echinodermata). **Journal of invertebrate pathology**, v. 98, n. 1, p. 58–62, 2008.
- FARAH, M. E. et al. Diverse protective roles of the actin cytoskeleton during oxidative stress. **National Institutes of Health**, v. 68, n. 6, p. 340–354, 2012.
- FREIRE, C. A; SANTOS, I. A; VIDOLIN, D. Osmolality and ions of the perivisceral coelomic fluid of the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) upon salinity and ionic challenges. **Zoologia (Curitiba, Impresso)**, v. 28, n. 4, p. 479–487, 2011.
- GLIŃSKI, Z.; JAROSZ, J. Immune phenomena in echinoderms. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 48, n. 3, p. 189–93, 2000.
- GORDON, S. Elie Metchnikoff: father of natural immunity. **European journal of immunology**, v. 38, n. 12, p. 3257–64, 2008.
- HIBINO, T. et al. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. **Developmental biology**, v. 300, n. 1, p. 349–65, 2006.
- KAUFMANN, S. H. E. Immunology 's foundation : the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 705–712, 2008.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–84, 2010.
- KULMS, D. et al. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. **Oncogene**, v. 21, n. 38, p. 5844–51, 2002.
- LI, Q. et al. Transcriptomic response to stress in marine bivalves Abstract Marine bivalves have a set of unique capabilities to adapt to the complicated conditions owing to their habitats

, living habits and feeding ways . Meanwhile , marine bivalves can be the biosen. **Invertebrate Survival Journal**, p. 84–93, 2013.

MATRANGA, V. et al. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. **Cell stress & chaperones**, v. 5, n. 2, p. 113–20, 2000.

MCCAUGHEY, C.; BODNAR, A. Investigating the Sea Urchin Immune System: Implications for Disease Resistance and Aging. **Journal of Young Investigators**, 2012.

MCCLANAHAN, T. R.; MUTHIGA, N. A. Ecology of Echinometra. **Edible Sea Urchins: Biology and Ecology**, n. Capítulo 15, p. 297–316, 2007.

MILZANI, A; DALLEDONNE, I.; COLOMBO, R. Prolonged oxidative stress on actin. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 339, n. 2, p. 267–74, 1997.

MUNARI, M.; MATOZZO, V.; MARIN, M. G. Combined effects of temperature and salinity on functional responses of haemocytes and survival in air of the clam *Ruditapes philippinarum*. **Fish & shellfish immunology**, v. 30, n. 4-5, p. 1024–30, 2011.

PEARSE, J. S. Ecological role of purple sea urchins. **Science**, v. 314, n. 5801, p. 940–1, 2006.

PINSINO, A et al. 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 biology and toxicology**, v. 24, n. 6, p. 541–52, 2008.

PINSINO, A.; THORNDYKE, M. C.; MATRANGA, V. Coelomocytes and post-traumatic response in the common sea star *Asterias rubens*. **Cell stress & chaperones**, v. 12, n. 4, p. 331–41, 2007.

RAST, J. P. et al. Genomic insights into the immune system of the sea urchin. **Science**, v. 314, n. 5801, p. 952–6, 2006.

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

SODERGREN, E. et al. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 5801:941-52, 2006. **Science**, v. 314, n. 5801, p. 941–52, 2006.

TAHSEEN, Q. Coelomocytes: Biology and Possible Immune Functions in Invertebrates with Special Remarks on Nematodes. **International Journal of Zoology**, v. 2009, p. 1–13, 2009.

TALLEY, L. D. et al. Salinity Patterns in the Ocean. **The Earth system: physical and chemical dimensions of global environmental change**, v. 1, p. 629–640, 2002.

TAN, S. Y.; DEE, M. K. Elie Metchnikoff (1845-1916): discoverer of phagocytosis. **Singapore medical journal**, v. 50, n. 5, p. 456–7, 2009.

TAUBER, A. I. Metchnikoff and the phagocytosis theory. **Molecular Cell Biology**, v. 4, 2003.

WANG, F. et al. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 151, n. 4, p. 491–8, 2008.

XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J. Cell Signaling during Cold , Drought , and Salt Stress. **The plant cell**, p. 165–183, 2002.