
Cynthia Grazielle Martins Delboni

Biologia celular da esqueletogênese e
processos de mineralização em Holothuroidea
(Echinodermata)

São Paulo

2008

Cynthia Grazielle Martins Delboni

Biologia celular da esqueletogênese e
processos de mineralização em Holothuroidea
(Echinodermata)

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Zoologia.

Orientador: Márcio Reis Custódio

São Paulo

2008

Resumo

Biomíneralização é o processo em que organismos precipitam materiais sólidos para a formação de estruturas esqueléticas. Nos Echinodermata o esqueleto é composto por CaCO_3 , com uma organização e morfologia variável entre as classes do filo. Nos Echinoidea, onde o processo de calcificação tem sido mais estudado, os sítios de formação do esqueleto aparentemente são vacúolos sinciciais dos esclerócitos. Pouco tem sido estudado sobre calcificação nas demais classes dos Echinodermata, principalmente em Holothuroidea, onde os elementos esqueléticos têm uma distribuição esparsa, sem a mineralização densa encontrada nas demais classes. Neste grupo os ossículos se encontram em sua maioria agrupados em projeções da superfície corporal, ou papilas, cujas exatas funções na biologia do animal ainda são discutidas. Para um estudo mais detalhado da função destas estruturas e dos mecanismos envolvidos na calcificação, a manutenção das células em ambiente controlado, onde possam ser acompanhadas e manipuladas, seria de grande importância. O conhecimento, no entanto, ainda é bastante restrito, e não existem linhagens celulares estabelecidas de equinodermos. Neste trabalho foram realizados: a descrição morfológica e funcional da estrutura que conecta os ossículos dentro das papilas de *Chiridota rotifera*; análises da matriz orgânica dos ossículos, envolvidas na calcificação de *Holothuria grisea*, *Synaptula hydriformis* e *Chiridota rotifera*; e desenvolvidos protocolos adequados para manutenção das células de organismos da classe Holothuroidea em cultura.

Capítulo 1 - Introdução Geral

Biomíneralização é o processo em que organismos precipitam materiais sólidos para a formação de estruturas como endo e exoesqueleto, e é encontrado em todos os grandes Filos (Lowenstam, 1981). Em metazoários triploblásticos os biomínerais podem ser construídos a partir da ectoderme ou da mesoderme, provavelmente indicando uma origem polifilética (Lowenstam e Weiner, 1989), e serem secretados tanto extra- como intracelularmente. Um exemplo é o que ocorre com equinóides (ouriços-do-mar), onde a formação do esqueleto inicia-se intracelularmente, mas seu crescimento e desenvolvimento completo ocorrem extracelularmente.

Estes processos são resultantes de complexas interações físico-químicas, mas podem ser divididos em dois mecanismos básicos: um processo induzido e um processo controlado (Lowenstam e Weiner, 1989). No primeiro, o mineral é formado como resultado de interações entre a atividade do organismo e o ambiente físico que o cerca, isto é, entre metabólitos produzidos biologicamente e cátions presentes no ambiente externo. Tal processo é comum também entre algumas algas verdes e vermelhas (Lowenstam e Weiner, 1989). O processo controlado – ou mediado pela matriz – é efetuado sob um estrito controle genético. Uma matriz orgânica sempre ocorre e age como mediadora, facilitando e regulando o crescimento do cristal pelo suporte mecânico oferecido (Dubois e Chen, 1989). Íons são introduzidos de forma controlada em espaços contendo a matriz, onde a formação e crescimento do cristal são induzidos (Lowenstam, 1981). Este processo é mais comum em eucariontes (Dubois e Chen, 1989).

Os Echinodermata estão entre os metazoários que utilizam processos de biomineralização na formação do esqueleto, que apresenta formatos variados entre os representantes de suas cinco classes. O esqueleto mineral dos equinodermos é composto por CaCO_3 na forma de calcita, rica em magnésio (Nichols, 1964; Raup, 1966). Sua origem é mesodérmica, distinguindo o grupo dos demais invertebrados e aproximando-os dos Chordata (Dubois e Chen, 1989). A organização e a morfologia deste endoesqueleto variam consideravelmente entre as classes do filo, mas, com exceção dos Holothuroidea (Stricker, 1986), forma geralmente uma parede do corpo rígida. Nos Echinoidea, onde o processo de calcificação tem sido mais estudado, os sítios de formação do esqueleto são vacúolos intracelulares localizados em pseudópodos aparentemente sinciciais das células formadoras de esqueleto (Ameye *et al.*, 1998). Nestes organismos, uma matriz orgânica composta por proteínas e glicoproteínas contém os sítios de calcificação e pode ser incluída no esqueleto durante sua formação (Benson e Chuppa, 1986). Acredita-se que esta matriz interage em fases específicas dos minerais e controla de crescimento e formação dos ossículos (Wilt *et al.*, 2003). Alguns genes envolvidos nestes processos foram recentemente identificados e estudados em larvas de equinóides (Ameye *et al.*, 1999; Urry *et al.*, 2000; Illies *et al.*, 2002). No entanto, pouco tem sido estudado sobre calcificação em outras classes dos Echinodermata que não Echinoidea (Wilt *et al.*, 2003).

Em Holothuroidea, a maioria dos trabalhos ainda se detém a nível histológico (Stricker, 1985, 1986; Gibson e Burke, 1983), e poucos a nível celular (Garcia-Arrarás *et al.*, 1998). Este grupo constitui a classe mais abundante entre os equinodermos, compondo até 90% da biomassa do ecossistema marinho, além de ocorrer em todos os tipos de substratos (Hendler *et al.*, 1995). Esse sucesso adaptativo está relacionado ao formato de seu corpo e disposição de seus ossículos. Estes

constituem as unidades básicas do endoesqueleto, e têm grande importância como caráter sistemático para a identificação das espécies (Pawson e Fell, 1965). Encontram-se dispersos na derme, e apresentam uma grande variedade de formas, desde as mais simples, como bastões, até as mais elaboradas como placas ornamentadas e perfuradas (Delboni, 2008). Aparentemente são formados no interior de um sincício de esclerócitos situados na camada dérmica da parede do corpo (Stricker, 1986). Já foram observadas a presença de bainhas aparentemente completas ao redor de ossículos em desenvolvimento e tal fato sugere que, pelo menos em alguns casos, a calcificação é iniciada intracelularmente (Stricker, 1985). Apesar disso, ainda existem dúvidas se o depósito inicial de sais de cálcio é tipicamente localizado em um vacúolo intracelular, dentro do sincício esclerótico, ou dentro de um espaço extracelular intimamente envolvido por extensões dos esclerócitos.

O principal interesse biológico no endoesqueleto destes organismos é dado pela imensa especialização funcional de seus componentes, diferente, por exemplo, da relativa simplicidade funcional das conchas de moluscos. Nos Equinodermata, os elementos esqueléticos representam um papel importante em uma variedade de processos fisiológicos, sendo um bom material de estudo por causa da riqueza de dados embriológicos, bioquímicos e ecológicos disponíveis para o grupo. Ultimamente, há também um considerável interesse biomédico em seus processos de formação, devido ao possível paralelo entre a sua calcificação e a dos mamíferos (Raup, 1966). E, além disso, há também o interesse taxonômico, tendo em vista a importância das peças calcárias como caráter sistemático para a identificação das espécies deste Filo. O sistema de classificação atual substitui o antigo baseado somente na observação dos tentáculos, utiliza ossículos também o formato do anel calcário e, principalmente, a forma e tamanho dos ossículos (Cutress, 1996). Para um

estudo mais detalhado das estruturas e dos mecanismos envolvidos nestes processos de calcificação seria interessante a manutenção das células em ambiente controlado, onde possam ser acompanhadas e manipuladas. Culturas de células de equinodermos durante os últimos 10 anos foram concentradas em vários aspectos de diferenciação celular. Diversos estudos foram baseados em culturas primárias de células de ouriços (Benson *et al.*, 1990; Odintsova *et al.*, 1994), de estrelas (Kaneko *et al.*, 1995; 1997) e pepinos-do-mar (Blinova *et al.*, 1993). A maior parte dos estudos realizados com culturas de células utiliza embriões e células de ouriços-do-mar (Benson *et al.*, 1990; Ameye *et al.*, 1998; 1999).

O conhecimento, no entanto, ainda é restrito. De forma semelhante aos demais grupos de invertebrados marinhos, não existem linhagens celulares estabelecidas de equinodermos. Culturas *in vitro* de células diferenciadas em geral não ultrapassam cinco semanas (Poccia, 1988, Moss *et al.*, 1998), independente de vários organismos e meios nutrientes já terem sido utilizados. Várias razões têm sido levantadas para explicar este fato e uma delas é a perda de substrato para adesão específica das células em cultura (Odintsova *et al.*, 1994). Células embrionárias de equinóides mostram uma correlação direta entre a adesão e o aumento da atividade de síntese de RNA, evidenciada por culturas em placas recobertas por polilisina. Utilizando este substrato, estas células podem ser mantidas em cultura por meses (Odintsova *et al.*, 1994). Tendo em vista observações semelhantes em outros Filos de invertebrados marinhos uma nova linha de abordagem, de culturas tridimensionais, vem sendo testada para resolver estes problemas. Estas técnicas utilizam-se de agregados multicelulares para suprir as necessidades de contato/microambiente que as culturas necessitam para se tornarem viáveis. Desta forma, bons resultados foram obtidos em culturas de esponjas e cnidários (Custódio *et al.*, 1998; Domart-Coulon *et al.*, 2001;

Sipkema *et al.*, 2003). No entanto esta abordagem ainda não havia sido tentada em equinodermos, sendo os resultados deste trabalho de suma importância para esse campo de pesquisa.

Os capítulos que se seguem apresentam as pesquisas realizadas neste estudo com Holothuroidea, englobando desde métodos para o estabelecimento de culturas de células; descrição dos ossículos com base nas proteínas de calcificação e estruturas de conexão nas papilas, além da discussão das funções das estruturas calcárias para esses organismos.

Referências bibliográficas

- AMEYE, L.; COMPÈRE, P.; DILLE, J.; DUBOIS, P. Ultrastructure and cytochemistry of the early calcification site and of its mineralization organic matrix in *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Histochem. Cell Biol.* 110: 285-294. 1998.
- AMEYE, L.; HERMANN, H.; KILLIAN, C.; WILT, F.; DUBOIS, P. Ultrastructural localization of proteins involved in sea-urchin biomineralization. *J. Histochem. Cytochem.* 47(9): 1189-1200. 1999.
- BENSON, S.; CHUPPA, S. Differentiation in vitro of sea-urchin micromeres on extracellular matrix in absence of serum. *J. Exp. Zool.* 256: 222-226. 1986.
- BENSON, S.; SMITH, L.; WILT, F.; SHAW, R. The synthesis and secretion of collagen by culture sea-urchin micromeres. *Exp. Cell. Res.* 188: 141-146. 1990.
- BLINOVA, M.I.; GORYUNOVA, L.B.; LEIBSON, N.L. Cell culture of regeneration tissues of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Biol. Morya.* 2: 84-91. 1993.
- CUSTÓDIO, M.R.; PROKIC, I.; STEFFEN, R.; KOZIOL, K.; BOROJEVIC, R.; BRÜMMER, F.; NICKEL, M.; MÜLLER, W.E.G. Primmorphs from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: A model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech. Ageing Dev.* 105(1-2):45-59. 1998.
- CUTRESS, B. M. Changes in dermal ossicles during somatic growth in Caribbean littoral sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea: Aspidochirotida). *Bull. Mar. Sci.* 58(1):44-116. 1996.
- DELBONI, C.G.M. Description of calcareous structures of the apoda holothurian *Synaptula hydriformis* (Lesueur 1824). *SPC Beche de Mer Information Bulletin.* 27: 13-15. March. 2008. <<http://www.spc.int/coastfish/News/BDM/27/BDM27.pdf>>. Data de acesso: 01/04/2008.

- DUBOIS, P.; CHEN, C.-P. Calcification in echinoderms. *In*: JANGOUX, M; LAWRENCE J.M. (Eds.). *Echinoderm studies*. Vol. III. A. A. Balkema. 1989. pags. 109-178.
- GARCIA-ARRARÁS, J.; ESTRADA-RODGERS, L.; SANTIAGO, R.; TORRES, I.I.; DIAZ-MIRANDA, L.; TORRES-AVILLÁN, I. Cellular mechanisms of intestine regeneration in the sea cucumber, *Holothuria glaberrima* Selenka (Holothuroidea: Echinodermata). *J. Exp. Zool.* 281: 288-304. 1998.
- GIBSON, A.W.; BURKE, R.D. Gut regeneration by morphallaxis in the sea cucumber *Leptosynapta clarki*. *Can. J. Zool.* 61:2720-2732. 1983.
- ILLIES, M.R.; PELLER, M.T.; DECHTIARUK, A.M.; ETTENSOHN, C.A. Identification and developmental expression of new biomineralization proteins in the sea-urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Genes Evol.* 212: 419-431. 2002.
- KANEKO, H.; KAWAHARA, Y.; DAN-SOHWKAWA, M. Primary culture of mesodermal and endodermal cells of the starfish embryo. *Zool. Sci.* 12: 551-558. 1995.
- KANEKO, H.; KAWAHARA, Y.; OKAMATO M.; DAN-SOHWKAWA, M. Study on the nature of starfish larval muscle cells in vitro. *Zool. Sci.* 14: 287-296. 1997.
- LOWENSTAM, H. A. Minerals formed by organisms. *Science.* 211: 1126-1131. 1981.
- LOWENSTAM, H.A.; WEINER S. *On biomineralization*. Oxford University Press, New York. 1989.
- MOSS, C.; BEESLEY, P.W.; THORNDYKE, M.C.; BOLLNER, T. Preliminary observations on ascidian and echinoderm neurons and neural explants in vitro. *Tiss. Cell.* 30:517-524. 1998.
- NICHOLS, D. Echinoderms: experimental and ecological. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 2:393-423. 1964.

- ODINTSOVA, N.A.; ERMAK, A.V.; TSAL, L.G. Substrate selection for long-term cultivation of marine invertebrate cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 107 A: 613-619. 1994.
- PAWSON, D.L.; H.B. FELL. *A revised classification of the dendrochirote holothurians*. *Breviora*. 1965.214:1-7.
- POCCIA, D. In vitro differentiation of male germ line cells from sea urchin testis. *J. Exp. Zool.* 246:57-64. 1988.
- RAUP, D.M. The endoskeleton. In: Boolootian, R. A. (ed). *Physiology of Echinodermata*. Interscience Publishers. New York. 1966. pags 379-395.
- SIPKEMA, D.; VAN WIELINK, R.; VAN LAMMEREN, A.A.M.; TRAMPER, J.; OSINGA, R.; WIJFFELS, R.H. Primmorphs from seven marine sponges: formation and structure. *J. Biotechnol.* 100(2): 127-139. 2003.
- STRICKER, S.A. The ultrastruture and formation of the calcareous ossicles in the body wall of the sea cucumber *Leptosynapta clarki* (Echinodermata, Holothuroidea). *Zoomorph.* 105:209-222. 1985.
- STRICKER, S.A. The fine struture and development of calcified skeletal elements in the body wall of holothurian echinoderms. *J. Morphol.* 188:273-288. 1986.
- URRY, L.A.; HAMILTON, P.C.; KILLIAN, C.E.; WILT, F.H. Expression of spicule matrix proteins in the sea-urchin embryos during normal and experimentally altered spiculogenesis. *Dev. Biol.* 225: 201-213. 2000.
- WILT, F.H.; KILLIAN, C.E.; LIVINGSTON, B.T. Development of calcareous skeletal elements in invertebrates. *Differentiation.* 71:237-250. 2003.

Conclusões

- 1) Ossículos de *Chiridota rotifera*, se encontram presos a uma estrutura colagenosa reticular dentro das papilas, que os liga ao tecido conjuntivo da parede corporal.
- 2) As proteínas das matrizes dos ossículos de três espécies de pepinos-do-mar são diferentes entre si, mas por outro lado, apresentam semelhança com as proteínas de um equinóide (*Strongylocentrotus purpuratus*).
- 3) Matrizes das diferentes estruturas calcificadas do mesmo organismo (*Holothuria grisea*) apresentam as mesmas proteínas.
- 4) Culturas de células em agregados apresentam maior longevidade do que células isoladas.
- 5) Há seis tipos celulares principais nos agregados de *Chiridota rotifera*, que se encontram em diferentes concentrações de acordo com o tempo de cultura.