Patrícia Lacouth da Silva

Mecanismos celulares e teciduais da regeneração em holotúrias (Echinodermata: Holothuroidea)

Cellular and tissular mechanisms of regeneration in sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea)

São Paulo

2011

Patrícia Lacouth da Silva

Mecanismos celulares e teciduais da regeneração em holotúrias (Echinodermata: Holothuroidea)

Cellular and tissular mechanisms of regeneration in sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Lacouth, Patricia
Mecanismos celulares e teciduais da regeneração de holotúrias (Echinodermata: Holothuroidea)
109 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Histologia 2. Regeneração 3. Celomócitos I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

_____

Prof(a). Dr(a).

_____

Prof(a). Dr(a).

_____

Prof. Dr. Márcio Reis Custódio

Orientador

Aos que, de coração, confiaram…

“Sonhar o sonho impossível,

Sofrer a angústia implacável,

Pisar onde os bravos não ousam,

Reparar o mal irreparável,

Amar um amor casto à distância,

Enfrentar o inimigo invencível,

Tentar quando as forças se esvaem,

Alcançar a estrela inatingível:

Essa é a minha busca.”

Dom Quixote

(Miguel de Cervantes)

Com certeza, sozinha eu não teria chegado até aqui. Eis o espaço para agradecer humildemente e de coração àqueles que estiveram presentes e solidários sempre. Que me ajudaram na prática, teoria, amizade ou simples presença.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Márcio Reis Custódio. Por aceitar a empreitada de trabalhar com os pepinos e principalmente pelo voto de confiança nesta retirante. Mas também pelo bom humor, paciência e sabedoria que compartilhou comigo ao longo de todo o projeto.

Aos meus pais, pelo amor incondicional que suporta toda a ausência e distância ao longo de todos esses anos. Por nunca deixaram de me incentivar e apoiar.

Ao meu amado irmão (Patric), meu exemplo, que me estimula e acredita que eu posso ir sempre além. Que mesmo com toda a distância esteve presente em pensamento e de coração em todos os momentos felizes e de crise.

Ao Enrique Rozas, que foi praticamente meu co-orientador. Pela ajuda e apoio que foram fundamentais em muitos momentos de dúvidas. Pelo cuidado e preocupação. Pelos bolos, pães e chocolates. Pela paciência de ouvir meus devaneios, de agüentar minhas bagunças, idéias mirabolantes. Gracias!

À Alessandra Majer, pela ajuda nas primeiras coletas, pelas conversas, conselhos, e pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Vagner Alberto, querido técnico, que tanto aguentou e solucionou os meus inúmeros pedidos. “- Vagner!! Eu preciso de água do mar!!!”

Aos funcionários do CEBIMar, em especial aos técnicos Eduardo, Joseilto, Joseph e Elso pelas ajudas nas coletas (pelos passeios de barco) e pela amizade.

Aos técnicos da Microscopia eletrônica Márcio e Valdir.

À Prof. Renata Guimarães, Prof. Gilberto Xavier e respectivos orientados e técnicos que dividiram um pouco do seu espaço, tempo e paciência comigo ao cederem seus equipamentos.

Aos funcionários do Instituto de Biociências e do Departamento de Fisiologia Geral, sem eles muitas coisas não existitiriam.

À Stefanny Christie, pessoa especial que foi essencial para que eu tivesse um Lar-doce-Lar. Pelas conversas, companhia, conselhos, risadas e muito mais.

À minha querida amiga Camila Queiroz (também companheira de laboratório), que com toda sua energia foi de extrema importância para seguir em frente e conseguir muitas soluções. Da qual eu levei muita “nadadeirada” e tive que nadar em busca de sacolas perdidas durante as coletas, mas que foi importantíssima para que o trabalho de campo fosse menos solitário. Obrigada pela amizade, cuidado e por todos os momentos agradáveis e divertidos em nossas coletas, discussões e andanças pela USP e por SP.

A todos os alunos e professores do Departamento de Fisiologia Geral/IB pela troca de experiências, amizade, conversas e convivência. Em especial à Maria Nathália que foi uma das primeiras e especiais amizades que consolidei.

A todos que passaram pelo Laboratório de Biologia Celular de Invertebrados Marinhos, Renato, Simone, Marcell, Wilson, Sheila, Bruno Madio e Diego. Pela companhia, ajudas e boas idéias.

À Camila Simões, minha amiga de longa data, simplesmente por ser minha amiga e enviar sempre boas energias.

Muitas outras pessoas participaram desta fase, algumas por pouco tempo, outras não, mas que deixaram um pouco de si e levaram um pouco de mim. Não caberia citá-las, mas estão nas minhas boas lembranças.

Muito Obrigada!

Resumo *1*
Abstract *2*
Introdução *3*
Regeneração *4*
Regeneração Fisiológica *6*
Regeneração Epimórfica e Morfalática *7*
Cicatrização *10*
O Filo Echinodermata *13*
Regeneração em Equinodermos *17*
Cicatrização em Equinodermos *20*
Celomócitos *21*
Objetivos *25*
Materiais e Métodos *27*
Modelo de Estudo *28*
Lesão *29*
Histologia *31*
Contagem das Células nos Tecidos *32*
Coleta do Líquido Celomático *33*
Caracterização dos Esferulócitos *34*
Microscopia Eletrônica de Transmissão *34*
Separação das Populações de Esferulócitos *35*
Análise das Inclusões dos Esferulócitos *37*
Resultados *38*
Cicatrização *39*
Caracterização Morfológica e Citoquímica dos Esferulócitos *53*
Separação dos Esferulócitos com Resina de Troca Aniônica *58*
Caracterização Química do Conteúdo dos Esferulócitos *61*
Discussão *69*
Referências *85*
Lista de Figuras e Tabelas *98*
Lista de Abreviaturas *103*

Equinodermos são bem conhecidos pelas suas grandes capacidades regenerativas, principalmente em processos mais complexos como a reposição de membros e órgãos. Porém pouco se sabe sobre processos aparentemente mais simples como a cicatrização. Tem sido descrito que um dos principais mecanismos envolvidos neste evento é o remodelamento da matriz extracelular e que existem células responsáveis por isto. Entretanto, vários detalhes do processo e do exato papel destas células ainda não são muito claros. Neste trabalho, foram estudados os estágios do processo de cicatrização em *Holothuria grisea* Selenka, 1867 (Holothuriidae). A lesão foi induzida através de uma incisão perfurando a parede do corpo do animal até alcançar a cavidade celomática. Através de análises histológicas, foram acompanhadas as mudanças estruturais e os mecanismos celulares que ocorrem no intervalo de doze horas a trinta dias após a injúria. Foi observado que houve um rápido fechamento da ferida através da síntese de novas fibras de colágeno, e que fibroblastos e duas populações de esferulócitos estão envolvidos neste processo. São discutidas as prováveis funções destes tipos celulares e possíveis diferenças funcionais entre os esferulócitos.

Palavras-chave: Histologia; Regeneração; Celomócitos; Fibroblastos; Esferulócitos.

Echinoderms are well known by their regenerative capabilities, mostly in complex events such as the reconstruction of internal organs or entire body parts. However, the knowledge on apparently simpler processes such as wound healing is relatively scarce. It has been described that extracellular matrix remodeling is the main mechanism, and it involves participation of different cells populations. However, the specific function of these cell types is still under debate. In this work, the wound healing process in *Holothuria grisea* Selenka, 1867 (Holothuriidae) was studied. The lesion was made by an incision through the body wall up to the coelomic cavity. The local changes in cell types and the reorganization of the extracellular matrix were accompanied from 12 hours to 30 days after the injury. Soon after the wound, the organism responded with a localized contraction, followed by cell migration and synthesis of new collagen fibers. Four different cell types were observed, including two different types of spherulocytes. The probable functions of these cells are discussed.

Keywords: Histology; Regeneration; Coelomocytes; Fibroblasts; Spherulocytes.

Introdução

1. Regeneração

A regeneração é um importante fenômeno regulatório com amplas implicações biológicas. Envolve desde eventos limitados de reparo a nível celular ou tecidual (cicatrização) até a reposição de estruturas e órgãos perdidos após amputações auto-induzidas ou traumáticas. Pode permitir a efetivação de processos mais complexos como a reconstrução de indivíduos inteiros a partir de fragmentos do corpo. É um mecanismo fundamental para a manutenção da homeostase e um dos requisitos básicos para a conservação da multicelularidade, sendo essencial para a sobrevivência contra as constantes e perturbadoras forças da natureza (Sánchez-Alvarado 2000).

A possibilidade de regenerar pode ser considerada uma adaptação a lesões, permitindo a reposição de partes do corpo perdidas em decorrência de acidentes, parasitismo ou predação.

Esta capacidade é amplamente distribuída desde os filos mais basais aos mais derivados, independentemente do nível de complexidade organizacional ou filogenético (Sanchéz-Alvarado 2000, Brokes *et al.* 2001). Organismos basais como *Hydra* e *Dugesia* têm esta capacidade bem desenvolvida, sendo capazes de regenerar o animal inteiro a partir de partes do corpo. Outros como *Caenorhabditis* e *Drosophila* são bem mais limitados (Galliot & Schmid 2002, Saló & Baguñà 2002). Mesmo vertebrados como *Xenopus laevis* e *Danio rerio*, apresentam mecanismos de reposição de membros e órgãos inteiros (Tsonis 2000, Brockes & Kumar 2005, Mochii *et al.* 2007).

Entretanto, o grau morfológico e funcional de recuperação varia consideravelmente entre níveis de organização (*e.g.* corpo inteiro, membros/estruturas, órgãos internos, tecidos e células) (Fig. 1), grupos, espécies relacionadas e mesmo entre diferentes tecidos de um mesmo animal (Sanchéz-Alvarado 2000, Brokes *et al.* 2001, Bely & Nyberg 2010). Todos os organismos, a princípio, possuem um potencial latente para regeneração, que pode ter sido modificado, inibido ou eliminado por pressões evolutivas. Nestes casos, esta característica não ajudaria na sobrevivência e reprodução, ou não contrabalançaria as desvantagens do seu alto custo metabólico (Bely & Nyberg 2010).

Nível Biológico	***Exemplos***	***Antes da injúria***	***Após a injúria***	***Regenerado***
Corpo inteiro	Regeneração a partir de pequenos fragmentos do corpo			
Estrutura	Membros, nadadeira, cauda, cabeça, tentáculo, sifão, braço etc.			
Órgão interno	Coração, fígado, retina.			
Tecido	Epiderme			
Célula	Axônio, fibra muscular			

Figura 1. Quadro resumo da presença de processos regenerativos nos diferentes níveis de organização. Modificado de Bely & Nyberg (2010).

Os diversos modos pelos quais a regeneração é realizada é um tópico de muito interesse, assim como a sua distribuição entre os grupos. Desde os primeiros estudos com regeneração de *Hydra* realizados por Abraham Trembley em 1740 (Sanchéz-Alvarado 2000), tem-se procurado entender os processos pelos quais alguns animais facilmente se reconstroem e organizam suas estruturas corporais após uma injúria. Entretanto, diversos aspectos dos mecanismos moleculares e celulares básicos da regeneração continuam não sendo muito claros (Sanchéz-Alvarado 2006, Agata *et al.* 2007).

Estratégias regenerativas incluem o rearranjo de tecidos pré-existentes, o uso de células tronco e a desdiferenciação e/ou transdiferenciação celular. Mais de um destes mecanismos pode atuar em diferentes tecidos do mesmo animal. No entanto, numa situação normal, sempre resultam no restabelecimento da polaridade, estrutura e forma apropriadas para o tecido (Sanchéz-Alvarado 2006).

Existe uma tendência de organizar os processos regenerativos em categorias, sendo as principais a regeneração fisiológica, a epimórfica e a morfalática (Carlson 2007). Apesar de parecerem processos distintos, cada um com suas próprias vias e regras, alguns estudos moleculares recentes sugerem que dependem de mecanismos comuns (Agata *et al.* 2007).

1.1 Regeneração Fisiológica

A regeneração fisiológica é a reposição natural de partes do corpo desgastadas. Caracteriza-se por ser difundida, regular, e não dependente da

destruição acidental de estruturas normais. Representa, portanto a restauração de elementos perdidos durante ciclos de atividade normal.

Uma característica importante das muitas variedades de regeneração fisiológica é que a sua intensidade pode ser ajustada de acordo com as necessidades momentâneas. No entanto, é importante entender que o termo não implica em um tipo de mecanismo especifico. Desta forma, deve ser vista como um termo de conveniência, que define uma variedade de processos designados para manter o equilíbrio normal dos tecidos do corpo (Carlson 2007). Em mamíferos, alguns dos melhores exemplos de regeneração fisiológica são o ciclo de trocas da epiderme ou células epiteliais, a renovação do endométrio e a reposição de células sanguíneas. Já entre os invertebrados esse processo é observado na ecdise em crustáceos e na renovação de células do líquido celomático em anelídeos, moluscos, equinodermos e outros. Todos esses exemplos possuem mecanismos de controle e processos celulares particulares, mas tem a função comum de manter o equilíbrio celular e/ou tecidual.

1.2 Regeneração Epimórfica e Morfalática

No inicio do século 20, T.H. Morgan propôs duas vias principais para descrever os mecanismos de regeneração: epimorfia e morfalaxia (Sanchéz-Alvarado 2000). Epimorfia (Fig. 2A) envolve a geração de partes do corpo ou tecidos através da proliferação de células, e pode ocorrer de duas formas. Na primeira ocorre a formação de uma estrutura especializada chamada “blastema”. Similar, em forma e organização, aos brotos iniciais de membros

durante a fase embrionária. Possui duas camadas celulares bem definidas, uma mais externa de origem epitelial, e uma massa interna de origem mesenquimal. Dependendo do organismo, esse blastema pode ser formado dentro de algumas horas ou dias depois da amputação ou injúria, e a partir da sua diferenciação serão formados os novos tecidos. Tal processo é mais comum, e encontrado em grupos diversos, como planárias, moluscos, equinodermos, urocordados e também participa da regeneração da cauda e membros de vertebrados (Goss 1969, Sanchéz-Alvarado 2000, Garcia-Arrarás *et al.* 2006). A segunda forma de epimorfia se dá sem a formação do blastema. Neste caso, ocorre a transdiferenciação do tecido remanescente, proliferação das células sobreviventes e de células tronco presentes no local e a diferenciação destas. Este mecanismo, por exemplo, ocorre durante a regeneração da retina de anfíbios e no fígado e osso de humanos (Carlson 2007).

Já a morfalaxia (Fig. 2B) é um mecanismo de regeneração onde ocorre pouca ou nenhuma proliferação celular, e o novo tecido é formado a partir de células pré-existentes no local ou próximo à injúria. Este evento é observado na regeneração de *Hydra* (Holstein *et al.* 2003) e durante o processo geral de cicatrização.

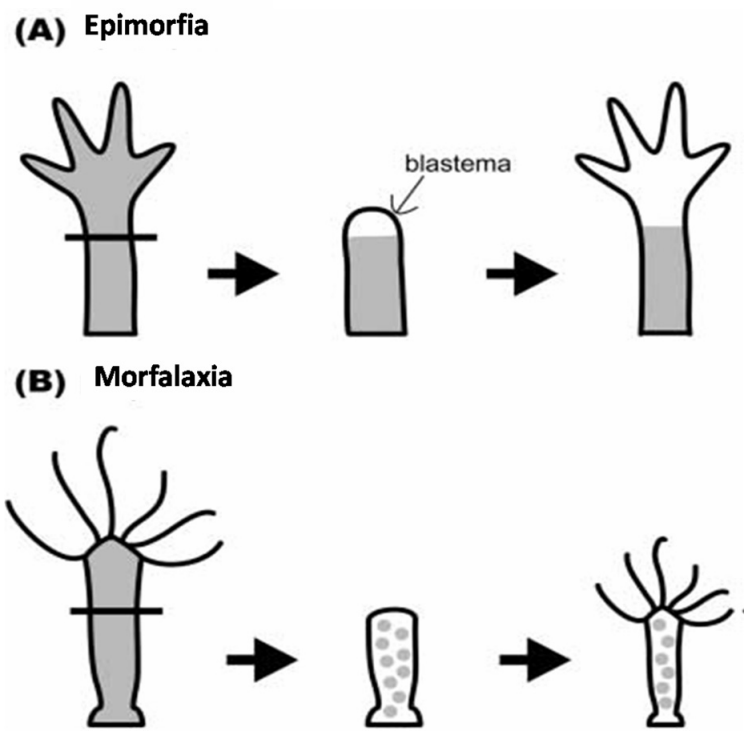


Figura 2 - Principais formas de regeneração: Epimorfia e Morfalaxia. (A) Regeneração epimórfica de um membro de anfíbio. (B) Regeneração morfalática em *Hydra*. Modificado de Agata *et al.* (2007).

Boa parte do atual entendimento dos mecanismos básicos nestes processos tem emergido de estudos usando invertebrados como sistemas modelo (Sanchéz-Alvarado 2004). Muitos invertebrados são capazes de repor rapidamente partes do seu corpo a partir de pequenos fragmentos isolados ou mesmo de agregados de células (Bekkun 2004). Um exemplo extremo dessas possibilidades é encontrado nas esponjas (Porifera), que são capazes de formar um organismo inteiro a partir de fragmentos pequenos ou mesmo de células completamente dissociadas (Wiens & Müller 2006, Louden *et al.* 2007).

A capacidade de regeneração de cada espécie depende do potencial individual de recrutamento de células indiferenciadas, proliferação e migração

de células, fornecimento de fatores regulatórios/tróficos específicos e a expressão ou re-expressão do programa de desenvolvimento em animais adultos (Candia-Carnevali & Bonasoro 2001). A diversidade celular aumenta com a complexidade morfológica e aparentemente adiciona alguns passos regulatórios na regeneração, como a diferenciação celular, formação de blastemas e a cicatrização (Sanchéz-Alvarado 2000).

2. Cicatrização

A cicatrização de feridas é um processo que depende de sinais químicos, da organização de células e da matriz extracelular e tem como objetivo reparar o tecido buscando o fechamento rápido da lesão (Mendonça & Coutinho-Netto 2009). Na maioria dos organismos onde a cicatrização foi descrita, a resposta à injúria ocorre em três fases distintas, mas parcialmente sobrepostas: inflamação, formação do tecido novo e remodelamento (Gurtner *et al.* 2008).

Processos inflamatórios ocorrem imediatamente após a lesão do tecido. Nesta fase são ativados os componentes da cascata de coagulação, vias inflamatórias e sistema imune para prevenir a perda de fluidos, para remover tecido morto e prevenir infecções. O segundo estágio é a formação do novo tecido, que ocorre geralmente entre 2 a 10 dias após a injúria. É caracterizado pela proliferação e migração de diferentes células, como fibroblastos e macrófagos, que irão participar da formação da matriz extracelular. Esta por sua vez formará um novo substrato para a restauração do epitélio e a posterior diferenciação dos demais tecidos (Mendonça & Coutinho-Netto 2009).

O terceiro estágio é o remodelamento, no qual todos os processos ativados imediatamente depois da injúria cessam. As células entram em apoptose ou saem do local da ferida, restando uma massa que contém algumas células e consiste principalmente de colágeno e outras proteínas de matriz extracelular. A matriz extracelular é ativamente remodelada, com o colágeno tipo III sendo substituído pelo tipo I. Em vertebrados, este processo é executado através da secreção de metaloproteinases de matriz secretadas pelos fibroblastos e macrófagos (Gurtner *et al.* 2008, Mendonça & Coutinho-Netto 2009).

A cicatrização é o primeiro passo para a regeneração e necessária a todos os animais, principalmente no sentido de prevenir o extravasamento dos fluidos corpóreos e limitar a invasão de patógenos. Mesmo com certas limitações, e de diferentes formas, todas as espécies possuem a capacidade de cicatrizar feridas produzidas por fatores externos.

Por exemplo, após uma injúria, o cnidário *Plexaurella fusifera* regenera tecidos lesados com a formação de uma camada epitelial contendo amebócitos. Estas células são responsáveis por produzir as fibras da mesogléia e possuem zooxantelas que fornecem a energia para o reparo (Meszaros & Bigger 1999). Em alguns anelídeos, os fibroblastos são o principal tipo celular envolvido na regulação da produção das proteínas da matriz extracelular durante o processo de cicatrização (Tettamanti *et al.* 2004). Em moluscos a cicatrização, após uma excisão no manto, é acompanhada de uma contração muscular, que reduz o tamanho da ferida, e da acumulação de hemócitos e tecido conjuntivo logo após a injúria. Posteriormente, uma

proliferação de células epiteliais cobre o local da lesão (Acosta-Salmon 2005). Já em artrópodes, as feridas são fechadas e a entrada de patógenos evitada através de um eficiente sistema de coagulação e da participação da melanina. (Fontaine 1973, Theopold *et al.* 2004)

Muitos pesquisadores tentam encontrar relações diretas entre o processo de regeneração e a cicatrização. Em salamandras é observado que tanto a cicatrização quanto a regeneração são dependentes de interações epiteliais/mesenquimais, da reestruturação da epiderme e da matriz extracelular e outros eventos celulares e moleculares (Roy & Levesque 2006). Experimentos com *zebra-fish (Danio rerio)* mutantes, desprovidos dos mecanismos moleculares desencadeadores da formação do blastema, mostraram que estes não eram capazes de regenerar as nadadeiras, mas que a cicatrização ocorria normalmente (Whitehead *et al.* 2005).

Estudar o reparo de feridas em vários filos pode melhorar o nosso entendimento sobre a cicatrização em organismos mais derivados, inclusive em humanos. Além disso, pode contribuir para a identificação de moléculas ou vias que permitam restaurar capacidades regenerativas desabilitadas (Gurtner *et al.* 2008).

3. O Filo Echinodermata

Dentre todos os grupos onde o processo já foi estudado, um dos que apresenta as maiores capacidades de regeneração são os equinodermos. Exclusivamente marinhos e bentônicos, os equinodermos são encontrados em todos os oceanos, tanto nas zonas polares quanto tropicais, desde a região do mesolitoral até as grandes profundidades (Hyman 1955). No mundo existem cerca de 7.000 espécies atuais e 13.000 fósseis (Pawson 2007), sendo que no Brasil são conhecidas mais de 300 atuais. O filo é atualmente dividido em cinco classes: Crinoidea (lírios-do-mar), Ophiuroidea (serpentes-do-mar), Echinoidea (ouriços e bolachas-do-mar), Holothuroidea (pepinos-do-mar) e Concentricycloidea (classe recém descoberta). Nos ambientes tropicais rasos, são um dos invertebrados mais abundantes e diversos e em zonas abissais chegam a constituir até 90% da biomassa (Hendler *et al.* 1995). Ocorrem em substratos consolidados ou não, e até mesmo em epibiose com outros animais e plantas (Hyman 1955, Hendler *et al.* 1995). Constituem um dos grupos de maior importância na estrutura das comunidades bênticas marinhas, onde ocupam diversos níveis tróficos (Ventura *et al.* 2006). Holotúrias desempenham um importante papel na reciclagem dos nutrientes e no revolvimento dos sedimentos, pois são consumidores de depósitos ou de material em suspensão (Hyman 1955). Desta forma, são fundamentais para tais processos em alguns ambientes, sendo até mesmo considerados animais bioindicadores (Coteur 2004).

São organismos celomados com uma simetria bilateral na fase larval, mas pentaradial na fase adulta. A maioria possui um endoesqueleto composto por placas de calcário, de onde podem se originar espinhos externos ou protuberâncias. A superfície do corpo é geralmente rígida, com algumas exceções, como Holothuroidea que possui o esqueleto formado por pequenos ossículos dispersos no tecido conjuntivo. A parede do corpo consiste de uma epiderme e uma derme espessa, onde está localizado e é produzido o endoesqueleto, e um epitélio celômico. A derme possui uma propriedade exclusiva dos equinodermos, chamada de tecido conjuntivo mutável (TCM) (Hyman 1955, Lawrence 1987). Este confere a estes organismos a capacidade de alterar voluntariamente e com rapidez a rigidez do próprio tecido, que pode se tornar rígido ou flexível de acordo as circunstâncias enfrentadas pelo animal. Este processo pode ser controlado pelos nervos presentes na região ou pela variação local nas concentrações iônicas de cálcio. O TCM ocorre em diferentes partes do corpo de todas as classes de equinodermos, e está envolvido no mecanismo de autotomia, entrada e saída em refúgios, proteção contra predadores e injúrias e manutenção da postura com pouco gasto de energia (Wilkie 2001).

Outra característica peculiar é a presença de um sistema hidrovascular de natureza celômica, composto por um sistema de tubos por onde circula água do mar e fluido celômico. Este sistema possui várias pequenas projeções no exterior do corpo, chamados de pés ambulacrais, sendo fundamental para a locomoção e circulação. O sistema nervoso é simples, consistindo de redes concentradas em cinco cordões nervosos que seguem o padrão pentaradial. A

maioria não possui sistemas excretor e respiratório definidos, e fazem trocas através do tegumento. Entretanto, holotúrias de maior porte apresentam árvores respiratórias organizadas, responsáveis por grande parte das trocas gasosas. Por outro lado, espécies de tamanho reduzido, como da Ordem Apoda, realizam as trocas gasosas através da parede do corpo. O trato digestório consiste de um tubo enrolado que se estende desde a superfície oral até o ânus, não estando presente em ofiuróides e asteróides. São animais dióicos, com exceção de algumas holotúrias e ofiuróides que são hermafroditas. Os gametas são liberados no meio externo para a fecundação, mas há também espécies que se autofecundam e outras que incubam a sua prole (Hyman 1955).

Equinodermos não possuem uma região cefálica definida, mas o corpo é diferenciado em região oral e aboral. Essa característica junto com a simetria pentaradial faz com que muitos pesquisadores definam os equinodermos como animais "primitivos". No entanto, levando em consideração o desenvolvimento embriológico, estes organismos mostram muitas similaridades com o desenvolvimento de animais mais derivados, como a clivagem radial e o ânus originado a partir do blastóporo. Essa característica serve para colocá-los entre os deuterostomados, o mesmo ramo evolutivo onde são inseridos os vertebrados.

A relação filogenética aceita atualmente agrupa o Filo Echinodermata com o Hemichordata dentro dos Ambulacraria. E o coloca como grupo irmão do filo Chordata, o qual contém os Urochordata (tunicados), Cephalochordata e Vertebrata (Halanych 2004) (Fig. 3). Junto destes grupos, são os únicos

invertebrados Deuterostomados. Todos os demais (exceto Porífera e Cnidária) são agrupados dentro do grupo dos Protostomados.

Tem sido proposto que o ancestral comum dos cordados e equinodermos existiu a cerca de 600-700 milhões de anos atrás (Halanych 2004). No entanto, continuam compartilhando muitos processos de desenvolvimento e, junto com eles, a maquinaria genética que os controla (Hart 2002). Esta relação próxima com os cordados é uma das razões que os torna atrativos como sistemas modelo, em particular quando comparada a outros invertebrados que são utilizados para descrever vários processos celulares e moleculares como *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*. Desta maneira, equinodermos, com suas extraordinárias propriedades regenerativas podem fornecer pistas importantes sobre este fenômeno também em outros grupos.

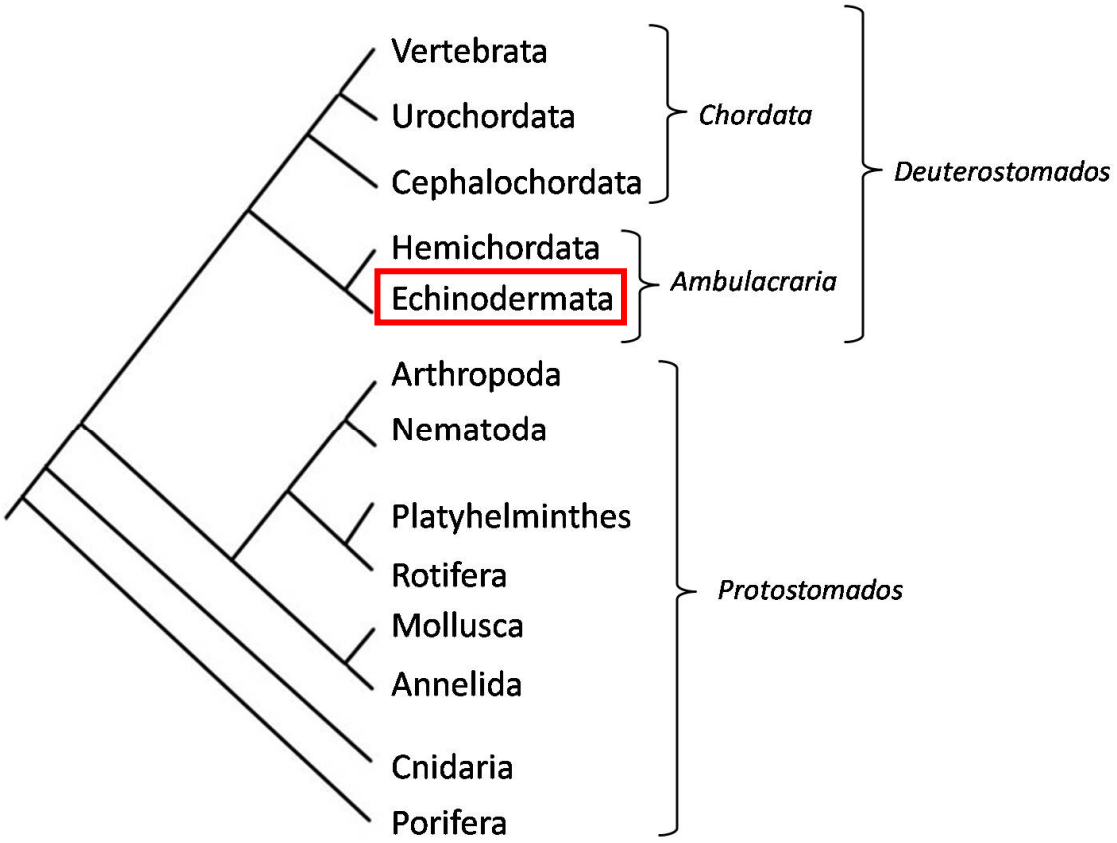


Figura 3. Árvore filogenética mostrando a relação entre Echinodermata e outros grupos animais (segundo Halanych 2004).

3.1. Regeneração em Equinodermos

Nestes organismos o potencial regenerativo é uma característica comum e extremamente desenvolvida (Candia-Carnevali & Bonasoro 2001). Estrelas-do-mar, crinóides e ofiuróides são capazes de regenerar totalmente um ou mais braços perdidos por ação de predadores (Emson & Wilkie 1980, Thorndyke & Candia-Carnevali 2001). Além de servir no reparo de estruturas danificadas, estes mecanismos de regeneração também podem ser parte de processos de reprodução assexuada.

Um exemplo bem conhecido, que retrata a grande capacidade entre as estrelas, é o caso da espécie *Linckia guildingii.* Conhecida como "estrela-cometa" pela sua capacidade de formar um novo individuo a partir de um fragmento amputado do braço (Hendler *et al.* 1995). Da mesma forma, crinóides podem reconstruir braços e cálices, e até mesmo estruturas rígidas, como os espinhos do ouriço-do-mar, podem ser regenerados quando partidos (Candia-Carnevali *et al.* 1998, Dubois & Ameye 2001).

Embora a regeneração esteja presente em todas as classes, a maioria dos estudos têm sido realizados com crinóides, ofiuróides e asteróides, tanto em termos de mecanismos teciduais e celulares como na sua importância ecológica (Candia-Carnevali *et al.* 1994, Candia-Carnevali & Bonasoro 2001). Não porque apresentam mecanismos específicos, mas porque parecem sofrer mais injurias do que outros grupos. A incidência de injurias aos braços varia com o hábito de vida desde equinodermos. Por exemplo, espécies que vivem na superfície de recifes estão mais expostas do que aquelas de hábito críptico (Meyer 1985). Equinóides também possuem capacidade de regenerar, porém suas capacidades são mais limitadas, voltadas principalmente para estruturas externas**,** como espinhos e pedicelárias (Bonasoro *et al.* 1995, 1998, Patruno *et al.* 2001).

Estas habilidades também são encontradas em holotúrias. Por exemplo, um fragmento do corpo de *Leptosynapta crassipatina* (Synaptidae) contendo apenas partes da região anterior do corpo, como o anel calcário, o anel nervoso e a boca, pode regenerar o animal inteiro (Smith 1971).

Um dos fenômenos mais notáveis neste grupo é a evisceração, usada como um mecanismo de defesa contra predadores ou quando o organismo é estressado. Neste processo, as holotúrias contraem a parede corporal e ejetam parte ou todos os órgãos internos. Posteriormente, os tecidos lesionados são inteiramente recompostos e voltam ao estado funcional (Hendler *et al.* 1995, Emson & Wilkie 1980, Garcia-Arrarás & Greenberg 2001). Em diversas espécies a regeneração total das vísceras (intestino, árvores respiratórias, gônadas e outros) é completada dentro de um período relativamente curto, de apenas 30 dias (Garcia-Arrarás *et al.* 2006). No entanto, os mecanismos e outros aspectos do processo têm sido menos estudados que em outros grupos, e os poucos trabalhos existentes estão relacionados com o processo de regeneração após a evisceração (Garcia-Arrarás *et al.* 2006, Miguel-Ruiz & García-Arrarás 2007).

Equinodermos também executam outros processos que dependem de mecanismos regenerativos, como a reprodução assexuada e autotomia. No primeiro, o organismo se divide por fissão em duas ou três partes e estas formam novos indivíduos. Trata-se de um evento recorrente entre asteróides, ofiuróides e holoturóides. Já a autotomia, trata-se de mecanismo pelo qual alguns animais destacam uma parte do corpo partir de um estímulo externo, como o ataque de predadores, como formas de escapar de um encarceramento ou remoção de uma parte do corpo infectada ou lesionada. E depois regeneram o membro descartado. Nos casos mais comuns é usado como uma estratégia de defesa anti-predação (Wilkie 2001).

Dentro da grande diversidade dos equinodermos poucos organismos já foram submetidos a estudos sobre regeneração, e vários detalhes deste processo ainda são desconhecidos. A maioria dos trabalhos em holotúrias é restrita a descrições macroscópicas, enquanto que os mecanismos celulares envolvidos não têm sido estudados em detalhes.

3.2. Cicatrização em Equinodermos

Tendo em vista a grande capacidade regenerativa dos equinodermos, pode se esperar que também sejam capazes de cicatrizar feridas rapidamente (Menton & Eisen 1973). Processos como: cicatrização, crescimento, morfogênese e diferenciação estão envolvidos no fenômeno de regeneração de tecidos e tem sido foco de estudos e mostram a necessidade de recrutamento celular para serem executados.

Existem poucos estudos que descrevem em detalhes a cicatrização em equinodermos. Em ouriços do mar, tem sido sugerido que a cicatrização de espinhos quebrados ocorre por um mecanismo morfalático, com o recrutamento de células diferenciadas, enquanto a regeneração de espinhos removidos ou pedicelárias ocorre por um processo epimórfico envolvendo precursores indiferenciados (Dubois & Ameye 2001). Em ofiuróides a fase de reparo ocorre em três dias onde inicialmente ocorre fechamento dos canais celômicos e cavidades expostas com a formação de coágulos contendo celomócitos e através da contração da parede do corpo. Em seguida há uma re-epitelização da superfície através da reorganização da epiderme e

contribuições de células migratórias. Por último, há o rearranjo dos tecidos danificados (Biressi *et al.* 2010).

Apenas três trabalhos focaram especificamente na cicatrização cutânea em holotúrias: um em *Stichopus badionotus* (Stichopodidae) (Cowden 1968), o segundo em *Thyone briareus* (Cucumariidae) (Menton & Eisen 1973) e o terceiro com *Holothuria glaberrima* (Holothuriidae) (Miguel-Ruiz & Garcia-Arrarás 2007). Todos descrevem que a cicatrização dura cerca de duas a três semanas, com pouca ou nenhuma divisão celular durante os estágios iniciais do processo, mas com uma numerosa migração de celomócitos para o local afetado. Entretanto, os resultados diferem quanto aos tipos celulares encontrados no local da lesão e suas respectivas funções.

4. Celomócitos

Celomócitos são células livres e circulantes, que ocorrem nas cavidades celômicas e no tecido conjuntivo de vários invertebrados. Nos equinodermos, além das cavidades celômicas, estas células estão presentes também nos sistemas hemal e aqüífero, no tecido conjuntivo e entre os tecidos de vários órgãos. Ainda permanecem muitas dúvidas a respeito da origem dos celomócitos nos equinodermos. Alguns trabalhos sugerem que seja a partir do epitélio celômico (Muñoz-Chapuli *et al.* 2005). Outros autores indicam que o órgão axial dos equinodermos, uma massa complexa e alongada que representa a junção comum do sistema circulatório, é o responsável (Pinsino *et al.* 2007).

Acredita-se que participam de funções variadas, algumas similares aos seus homólogos em vertebrados (Muñoz-Chapuli *et al.* 2005). Entre as várias já descritas para celomócitos de equinodermos estão: coagulação, excreção, digestão, transporte e estocagem de nutrientes, encapsulamento, secreção de substâncias, transporte de oxigênio, síntese e deposição de fibras de colágeno e da matriz extracelular (Endean 1958, Endean 1966, Smith 1971, Ramirez-Gómes *et al.* 2010). Também podem ter um papel importante na resposta imune humoral e celular, participando da fagocitose (Borges *et al.* 2005) encapsulamento, citotoxicidade e produção de agentes antimicrobianos (Smith & Davidson 1992, Gross *et al.* 1999). Já foi observado que a quantidade e os tipos de celomócitos podem variar durante infecções ou após uma injúria (Pinsino *et al.* 2007).

Estas células são classificadas, de uma maneira geral, de acordo com seu tamanho, forma e conteúdo citoplasmático (Eliseikina & Margalanov 2002). Os principais tipos encontrados em todas as classes de equinodermos são: amebócitos, fagócitos, células fusiformes e esferulócitos, também chamados de células mórula ou granulócitos (Hyman 1955, Bolootian 1958, Endean 1966). A quantidade e os tipos celulares variam entre as classes, e sua abundância, variedade e ubiqüidade sugerem que possuam papéis fundamentais na fisiologia dos organismos (Endean 1966).

Existem vários estudos a respeito dos tipos e morfologia de celomócitos encontrados em holotúrias (*e.g.* Hyman 1955, Bolootian 1958, Endean 1958, Hetzel 1963, Noble 1970, Canicatti 1989, Eliseikina & Margalanov 2002, Xing *et al.* 2008). No entanto, apenas quatro tipos celulares são encontrados em todas

as espécies: linfócitos, fagócitos, células fusiformes e esferulócitos *incolores*. Outros quatro não são comuns, mas encontrados em diversos grupos de holotúrias: hemócitos, células vibráteis, células cristal e esferulócitos *coloridos* (Hyman 1955, Endean 1966).

Estes esferulócitos *coloridos* e *incolores* são caracterizados por possuírem o citoplasma preenchido com muitas esférulas ou vacúolos. Células com morfologia semelhante são comuns em diversos invertebrados. Por exemplo, na esponja *Chondrosia reniformis* recebem o nome de *células esferulosas*, e são abundantes no mesohilo, e geralmente mostram uma estrutura degranulada nas regiões invadidas por bactérias (Bonasoro *et al.* 2001). Em outros grupos, como anelídeos, artrópodes e ascídias, células morfologicamente semelhantes participam de mecanismos de encapsulamento. Seus conteúdos, principalmente fenoloxidase, exercem atividades citotóxicas e parecem estar diretamente envolvidos em uma variedade de respostas imunes (Ratcliffe & Rowley 1981, Ballarin *et al.* 1998). Da mesma forma, podem ser responsáveis pela secreção alguns fatores humorais de defesa, como lisinas, aglutininas e enzimas antioxidantes (Odintsova *et al.* 2004).

Em equinodermos, esferulócitos são observados tanto no fluido celômico quanto no tecido conjuntivo. Sua participação sempre é descrita durante o processo de regeneração, principalmente holotúrias. No entanto, suas exatas funções ainda são bastante discutidas. A este tipo celular são atribuídos papéis bastante variados, que vão desde a participação em mecanismos de defesa (Haug *et al.* 2002, Arizza *et al.* 2007) até a secreção de enzimas extracelulares (Massin 1980) e produção de matriz extracelular (Garcia-Arrarás *et al.* 2006).

Não existe consenso quanto à origem, número de populações e até mesmo quanto à nomenclatura utilizada.

Ultimamente o interesse a respeito da origem e funções dos celomócitos de equinodermos tem aumentado. Por exemplo, podem fornecer novos modelos experimentais para estudos da regeneração e recrutamento de células-tronco (Candia-Carnevali 2006), além de novas ferramentas genômicas para analisar funções de regulação (Matranga *et al.* 2005). Tendo em vista sua posição filogenética próxima aos Chordata, os dados obtidos a partir destes estudos podem ter aplicabilidade mesmo em vertebrados.

Desta forma, neste trabalho a cicatrização cutânea em holotúrias foi acompanhada, de modo a caracterizar morfologicamente os principais eventos e investigar o papel dos esferulócitos durante este processo.

Objetivos

1. Investigar os estágios do processo de cicatrização em holotúrias, usando a espécie *Holothuria grisea* como modelo, descrevendo a seqüência de eventos e os tipos celulares envolvidos no reparo tecidual;

2. Caracterizar os esferulócitos, buscando definir melhor o papel desempenhado por estes tipos celulares durante o processo de cicatrização.

Materiais e Métodos

1. Modelo de Estudo

Holothuria grisea Selenka, 1867, (Aspidochirotida: Holothuridae) é uma espécie comum no litoral brasileiro e facilmente encontrada entre rochas na região entre-marés. Seus indivíduos (Fig. 4) atingem até 25 cm de comprimento, possuem forma cilíndrica, com a parede do corpo espessa e flexível, em sua maior parte composta por tecido conjuntivo no qual se inserem ossículos esparsos. Alimentam-se principalmente da matéria orgânica contida no sedimento e em suspensão. Para os experimentos, os espécimes de *H. grisea* foram coletados manualmente na região entre-marés na área do canal de São Sebastião (São Paulo). Os animais foram mantidos no Centro de Biologia Marinha (CEBIMar-USP) em tanques com sedimento do local onde os organismos foram coletados e água do mar corrente. A temperatura e o pH não foram controlados, e seguiram as flutuações naturais, e nenhum tipo de alimento adicional foi utilizado.

Figura 4. *Holothuria grisea,* espécie de pepino-do-mar comum em todo o litoral brasileiro. Caracterizada por uma parede do corpo espessa, com presença de pequenas verrugas e pés ambulacrais concentrados na região ventral. Geralmente é encontrada na região entre-marés, entre pedras e enterrada no sedimento (Foto: Patrícia Lacouth).

2. Lesão

Para acompanhar o processo de cicatrização, 40 organismos foram anestesiados por imersão em uma de solução $MgCl_2$ 7,5% até que estivessem completamente relaxados, de modo a evitar a evisceração. Uma incisão longitudinal com 2 cm foi realizada com bisturi na lateral do corpo próximo ao ânus em 35 organismos, perfurando as camadas até atingir a cavidade celomática (Fig. 5A). Após a lesão, a região foi marcada com duas gotas de

Fucsina de Ziehl (Martoja & Martoja 1967), para posterior localização da área, e os animais foram retornados aos tanques com água do mar corrente. A cicatrização foi acompanhada externamente e em cortes histológicos por 30 dias nos seguintes intervalos de tempo: 12 horas, 1, 2, 4, 10, 15 e 30 dias após a lesão. A cada intervalo de tempo, cinco animais eram retirados dos tanques e seções transversais da parede do corpo (2 cm^2), contendo a região em regeneração (Fig. 5B) eram coletadas. Os cinco indivíduos restantes foram usados como controle.

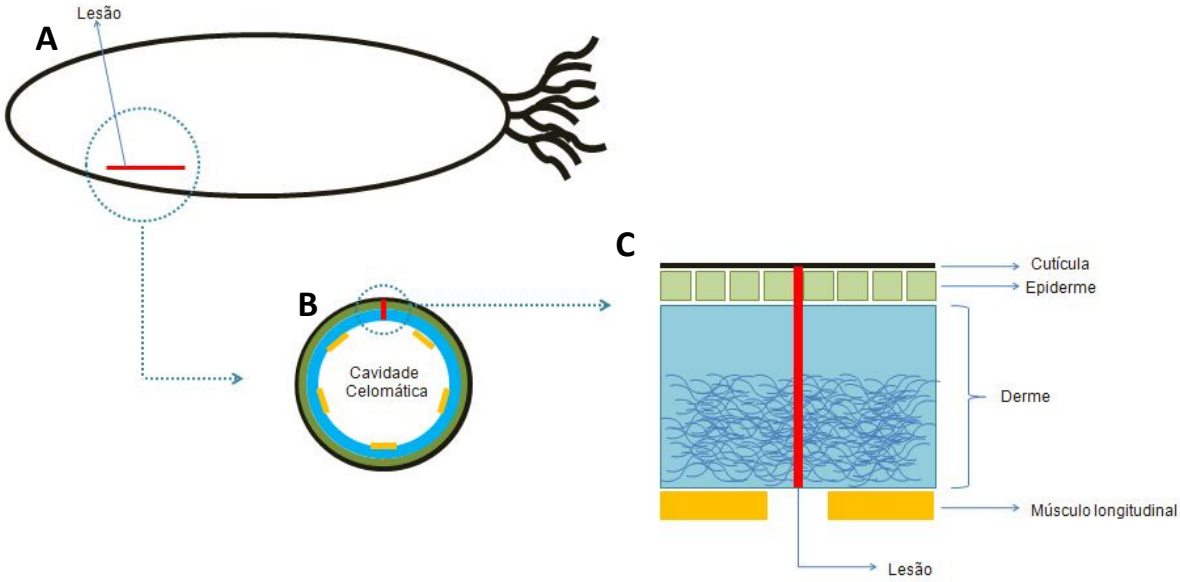


Figura 5. (A) Desenho esquemático mostrando a região onde foi realizada a lesão (B, C) Esquema de um corte transversal de *H. grisea* mostrando a organização dos tecidos da parede do corpo.

3. Histologia

As amostras de tecido foram fixadas por 24h em glutaraldeído 2,5% diluído em água do mar filtrada (0,22 µm) e posteriormente descalcificadas com EDTA 5% diluído em água do mar artificial livre de cálcio e magnésio (NaCl 460mM, Na_2SO_4 7mM, KCl 10mM, HEPES 10mM, pH 8,2 - Dunham & Weissmann 1986. Filtrada em 0,22 µm). Feito isso, os tecidos foram desidratados na seguinte série de etanol, diluído em água destilada: 50% (30 min.), 70% (30 min.), 90% (30 min.) e 100% (30 min). Posteriormente as amostras foram clarificadas com Xilol e Etanol (1:1) (30 min.) e Xilol 100% (30 min., duas vezes). Em seguida foram imersas para inclusão em Paraplast (SIGMA) fundido, por 12 horas em estufa a 60°C. Após a inclusão, as amostras foram emblocadas e secas a temperatura ambiente e os blocos contendo a amostra foram montados nos suportes. Os cortes foram realizados em micrótomo manual, com espessura de 7 µm. As fitas com os cortes foram colocadas em lâminas preparadas com uma fina camada de albumina e desparafinizadas com Xilol 100% (40 min., duas vezes). Após hidratação em um série gradativa de etanol, diluído em água destilada: 100% (30 min.), 90% (30 min.), 70% (30 min.) e 50% (30 min.) o material foi corado com Tricromo de Mallory ou Azul de Toluidina 0,1% (Martoja & Martoja 1967, Behmer *et al.* 1976).

4. Contagem das células no tecido

As células presentes na região da lesão foram quantificadas dentro do campo de visão do microscópio (Nikon E200) usando uma objetiva de imersão (100x). Foram analisados apenas os cortes corados com Tricromo de Mallory, que permitia uma melhor diferenciação dos tipos celulares nos tecidos. Para a contagem foram utilizados cortes histológicos de cinco indivíduos lesionados para cada estágio de regeneração (12 horas, 2, 4, 10, 15 e 30 dias). Contagens efetuadas em outros cinco indivíduos não lesionados foram utilizadas como controle. De cada indivíduo foram escolhidos três cortes histológicos aleatórios dentro daqueles que estivessem em boas condições e possuíssem todas as camadas de tecidos. Em cada um foram amostrados seis campos, sendo uma à esquerda e outro à direita da borda do canal da lesão em cada região da derme (derme superficial, derme central e hipoderme) (Fig. 6). Os dois campos de cada região da derme foram somados, e as análises estatísticas foram feitas através do teste 2way ANOVA utilizando o GraphPad Prism . Os resultados foram expressos em médias e desvios padrão dos números absolutos de células, e os dados foram plotados em gráficos de dispersão com linhas suavizadas usando a rotina interna do programa Microsoft Excel.

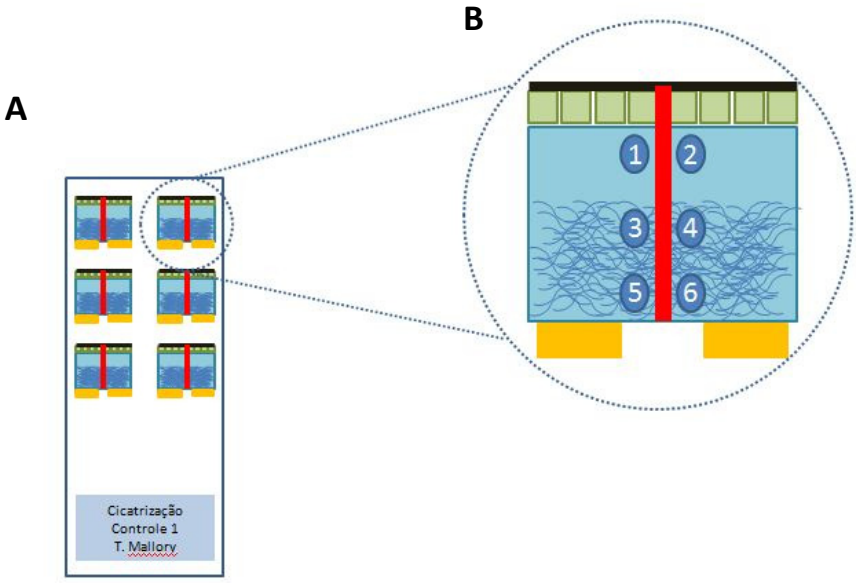


Figura 6. Esquema das regiões onde as células foram quantificadas. (A) Lâmina contendo os cortes histológicos seriados. (B) Regiões da parede corporal usadas para as contagens de células.

5. Coleta do líquido celomático

Para coletar as células do líquido celomático 50 animais, adicionais aos que foram utilizados para o acompanhamento da lesão, foram anestesiados com $MgCl_2$ 7,5% como descrito anteriormente. Depois de anestesiados, uma pequena incisão foi feita com auxílio de um bisturi na região dorsal, por onde foi inserida uma cânula. O fluido foi colhido com a ajuda de compressões no corpo do animal e misturado com uma solução anticoagulante 1:1 (0,02 M EDTA, 0,34 M NaCl, 0,019 M KCl, 0,068 M Tris-HCl, pH 8,2 - Xing & Chia 2000). Parte das amostras colhidas foi utilizada na caracterização dos esferulócitos e o

restante congelado a -20°C para as análises químicas. Após a coleta do líquido celomático os organismos foram retornados ao mar.

6. Caracterização dos esferulócitos

As células presentes no liquido celomático foram visualizadas por meio de citocentrifugados, usando amostras de líquido celomático de 10 indivíduos. Para os citocentrifugados, a densidade da suspensão foi verificada em uma câmara de Neubauer, ajustada para 5 x 10^5 células por ml, usando a solução anticoagulante e passada para lâminas em uma citocentrífuga (100 µl por poço – 270 x g / 5 min - Citospin 248. FANEM). Feito isso, as lâminas foram fixadas em vapor de formol por 45 min, coradas com Tricromo de Mallory ou Azul de Toluidina 0,1%. A identificação dos tipos celulares foi baseada nas descrições existentes na literatura (*e.g*. Hyman 1955, Hetzel 1963, Smiley 1994, Endean 1966, Xing *et al.* 2008).

6.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Para visualização dos esferulócitos em microscopia eletrônica de transmissão, as células coletadas do líquido celomático foram fixadas por 24h em glutaraldeído 2,5%. Após a fixação, a suspensão celular foi incluída em Ágar (SIGMA) seguindo protocolos adaptados de Dykstra (1993) e Taupin (2008). Para isso, as células fixadas foram centrifugadas (180 x g / 5 min.) e ressuspendidas com a mesma solução anticoagulante citada anteriormente, para retirar o fixador. A suspensão foi novamente centrifugada e ressuspendida em uma solução de ágar dissolvido em água destilada a 30°C, e passada

rapidamente para Eppendorfs, que foram submetidos a centrifugação por 1 min a 12.000 x g. Feito isto, os tubos foram mantidos a 4°C até que o ágar solidificasse. Posteriormente, os blocos foram retirados dos tubos e os pellets contendo as células foram cortados. Estes foram deixados por 24h a 20°C em uma mistura de tampão Cacodilato de Sódio 0,4 M e água do mar (4:5), sendo depois rinsados com o mesmo tampão e pós-fixados em Tetróxido de Ósmio 2% em água do mar (30 min. a 20°C). Para a microscopia, os pellets foram desidratados em uma série gradativa de etanol (50, 70, 90 e 100%, 30 min. em cada) e embebidos em resina (Embed-812, EMS). Os blocos foram então cortados em ultramicrótomo (Ultratome NOVA, LKB) e as seções observadas em microscópio de transmissão EM 900 (ZEISS).

7. Separação das populações de esferulócitos

Para isolar as diferentes populações de esferulócitos dos outros celomócitos, foi desenvolvido um método de separação através da interação das células com grânulos tipo gel de resina de troca iônica fortemente básica (Amberlite IRA-400AR. SIGMA).

As células foram coletadas do líquido celomático como descrito anteriormente, misturadas com a solução anticoagulante (1:1) e fixadas com glutaraldeído 2,5%, por 24 horas a 4°C. Posteriormente as células foram centrifugadas (180 x g / 10 min), o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido com água Milli-Q. Este processo foi realizado duas vezes para a retirada do excesso de fixador.

A concentração de células foi ajustada para $1,5x10^5$ células/ml e 2 ml da suspensão foram adicionados a 5 g de grânulos de resina, sendo mantidos em um agitador orbital sob agitação constante por 60 minutos. Após este período, esperou-se que a resina decantasse e o sobrenadante foi recolhido (Fração 1 - contendo as células que não se ligaram à resina). Em seguida, foi acrescentado 2 ml de água Milli-Q à resina, que foi deixada sob agitação por mais 10 minutos, sendo o sobrenadante recolhido e somado a Fração 1. Em seguida foram adicionados 2 ml de uma solução de NaCl 0,5 M à mesma resina, que foi mantida sob agitação por mais 60 minutos (Fração 2 - contendo células mais fracamente ligadas à resina). O sobrenadante foi coletado e mais 2 ml de água Milli-Q foram acrescentados, deixado sob agitação por outros 10 min., sendo o sobrenadante coletado e somado a Fração 2. Por último, foram adicionados 2 ml de uma solução de NaCl 2 M à mesma resina, que foi mantida sob agitação por 60 minutos. O sobrenadante foi recolhido (Fração 3 - células mais fortemente ligadas à resina), a resina lavada com 2 ml de água Milli-Q e o sobrenadante coletado e somado à Fração 3. As frações foram centrifugadas e as células ressuspendidas em água Milli-Q para retirada do sal, sendo mantidas à -20°C até as análises.

8. *Análise das inclusões dos esferulócitos*

Cada série de frações obtida da separação por troca iônica, contendo células coletadas de 40 organismos, foi reunida. Para obtenção do lisado, as células foram centrifugadas (400 x g / 10 min). Os pellets foram drenados e sua massa obtida por diferença de peso com Eppendorfs pré-pesados. Os pellets

foram ressuspendidos em um tampão composto por PMSF 5mM, Tris-HCl 5Mm e Triton 0,015% em água Milli-Q (pH 7,8) e sonicados por 3 min. (Virsonic M475. VIRTIS). Restos celulares e componentes insolúveis foram removidos do extrato por centrifugação (5 min. a 12.000 x g). O sobrenadante foi recolhido e filtrado com membranas Centricon YM-30 e YM-10 (MILLIPORE), centrifugando por 30 min a 1610 x g. Após esta filtração as amostras de cada série de frações celulares ficaram divididas em: (1) moléculas maiores que 30 kDa; (2) moléculas maiores que 10 kDa e menores que 30 kDa e (3) moléculas menores que 10 kDa.

Os filtrados foram liofilizados e ressuspendidos em água Milli-Q (1µl/µg). Para quantificação do material liofilizado os tubos foram pré-pesados e após a liofilização pesados novamente, calculada a diferença. As amostras foram analisadas por LC-MS (*Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*) nos equipamentos da Central Analítica - IQ/USP (MicroTOF. BRUKER DALTONICS). As amostras foram injetadas em um HPLC com coluna analítica C-18 de fase reversa (4,6 x 250 mm, 5 mm; VYDAC) e eluídas usando um gradiente linear de 0 até 100% do solvente "B", com fluxo de 1 ml/min durante 60 min. O solvente "B" era composto de acetonitrila, e o solvente "A" por água Milli-Q. Os componentes foram detectados pelo monitoramento em UV 214, 254 e 280 nm, e passados ao espectrômetro de massa.

Resultados

1. Cicatrização

Em condições normais a parede do corpo de *Holothuria grisea* é constituída por uma cutícula fina e estruturada, uma epiderme caracterizada por um epitélio pseudo-estratificado e pela derme. A derme constitui a maior parte da parede do corpo e está dividida em três regiões: (1) derme superficial, (2) derme central e (3) hipoderme. Estas regiões são pouco celularizadas, sendo observadas apenas algumas células dispersas no tecido conjuntivo que, aparentemente, não mantém um contato intercelular direto (Figura 7A e B).

A derme superficial está localizada logo abaixo da epiderme, é caracterizada pela presença de tecido conjuntivo frouxo. Este é constituído por uma grande quantidade de matriz extracelular, fibras de colágeno e fibras elásticas, além das células do tecido conjuntivo. Já a derme central é formada por tecido conjuntivo denso não modelado, composto por fibras de colágeno espessas, onduladas e arranjadas irregularmente. A hipoderme possui organização semelhante à derme superficial e está em contato com a cavidade celomática.

Entre as células do tecido conjuntivo normal foram identificados quatro tipos celulares principais:

1) Fibroblastos: células pequenas e fusiformes, caracterizados por um núcleo esférico e acidófilo, geralmente são observados com extensões a partir do citoplasma.

2) Amebócitos fagocíticos: são células esféricas, com citoplasma hialino e acidófilo, às vezes possuindo alguns grânulos. Possuem um núcleo esférico e acidófilo, localizado perifericamente.
3) Esferulócitos I: caracterizados por possuírem o citoplasma completamente preenchido por um grande número de esférulas acidófilas, que coram fortemente com a Fucsina Ácida presente no Tricromo de Mallory. O núcleo é periférico, mas por vezes é mascarado pelas vesículas (Fig. 7C).
4) Esferulócitos II: morfologicamente semelhantes aos anteriores, mas com inclusões que possuem grande afinidade pelo Azul de Metila e/ou Verde Luz do Tricromo de Mallory, e coram em metacromasia com o Azul de Toluidina (Fig. 7C).

Em animais não lesionados, os fibroblastos são as células mais abundantes no tecido conjuntivo, principalmente na derme superficial (19,5 ±6,4), seguidos dos amebócitos (4,7 ±1,6) e esferulócitos II (2,3 ±1,5). A derme central possui a menor densidade de células, sendo encontrados fibroblastos e os dois tipos de esferulócitos. Já na hipoderme, os esferulócitos II são os mais abundantes (8,8 ±5,1) seguidos pelos esferulócitos I (3,0 ±3,4). Fibroblastos e amebócitos não foram observados nesta região. As variações do número de células podem ser melhor observadas nos gráficos representados nas figuras 12, 13 e 14.

Após a lesão, a partir de uma visão macroscópica, observou-se que as camadas superficiais da ferida se reaproximam através de uma reação de

contração localizada do organismo. Porém, o corte pode ser facilmente aberto com uma pequena pressão na região. Doze horas depois se observou retração do tecido epitelial e da derme superficial, estreitando ainda mais a abertura da ferida (Fig. 7D). Não foi observado o extravasamento ou secreção de líquidos, nem a formação de coágulos. No entanto, esferulócitos II, amebócitos e fibroblastos foram observados livres dentro do canal da lesão (Figs. 7E e F). Nesta fase, o número de fibroblastos, na região da derme superficial se reduz significativamente, atingindo menos da metade da quantidade observada no controle (6,5 ±2,9 *versus* 19.5±6.4) (Fig. 12). Amebócitos são encontrados principalmente na derme superficial. Após a lesão, sua quantidade diminui nesta região mas nas primeiras horas são observados na hipoderme. Na derme central não ocorrem mudanças significativas no número de células, enquanto que na hipoderme a densidade de esferulócitos II duplica (18,6 ±6,3) (Fig. 14).

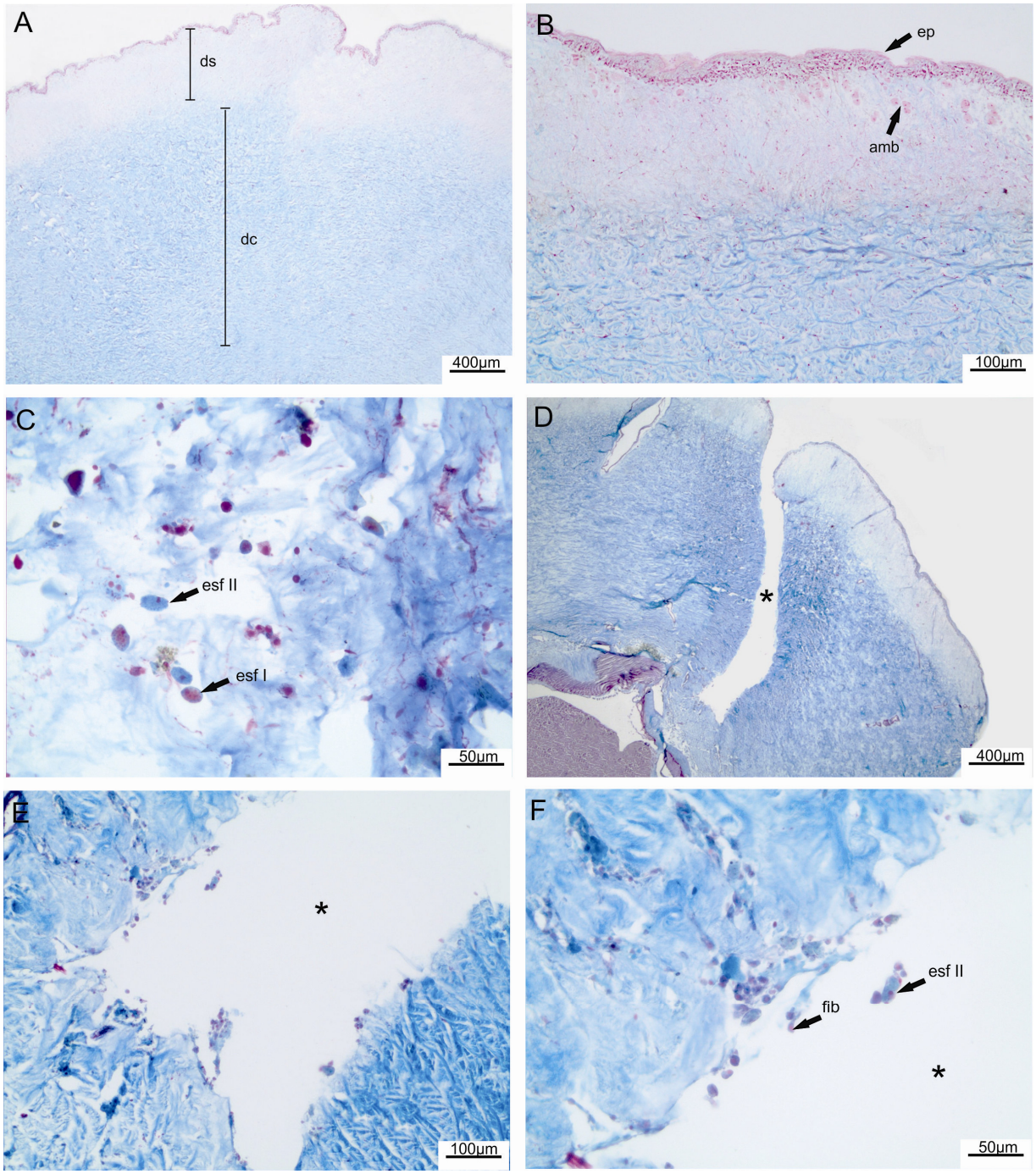


Figura 7. Fotomicrografias da parede do corpo de *H. grisea*, (Tricromo de Mallory). (A) Visão geral mostrando epiderme, derme superficial e derme central em condições normais. (B) Detalhe da epiderme e da derme superficial em condições normais, onde se observa a presença de amebócitos e fibroblastos. (C) Detalhe da hipoderme em condições normais, com presença de esferulócitos I e II. (D) Visão geral da área 12h após a lesão, mostrando o canal formado. (E) Canal da lesão após 12h, sendo invadido por celomócitos. (F) Esferulócitos tipo II e fibroblastos entrando no canal da lesão com 12h. (*ds*: derme superficial; *dc*: derme central; *ep*: epiderme; *fib*: fibroblastos; *amb*: amebócito; *esfI:* esferulócito I; *esfII*; esferulócito II; *: canal da lesão).

Vinte e quatro horas após a lesão, as faces da ferida se encontram bem próximas, principalmente na região mais superficial (Fig. 8A). Na região da epiderme e derme superficial é observada necrose e degeneração da matriz extracelular. Esferulócitos II são observados intercalados com as células epiteliais (Fig. 8B). Estes, sendo duas vezes mais numerosos do que na etapa anterior (13,9 ±4,7) (Fig. 12). Outros tipos celulares, principalmente esferulócitos II e fibroblastos provavelmente provenientes do líquido celomático, invadem e se acumulam dentro do canal da lesão (Fig. 8C). Amebócitos são observados na hipoderme (3,9 ±1,1) e não mais somente na derme superficial (Figs. 12 e 14).

Dois dias após a lesão, as faces da ferida estão próximas e há uma marcada desorganização do epitélio e da derme superficial, onde são observados amebócitos, esferulócitos I e restos celulares. No canal da lesão e na hipoderme, é observado um grande número de esferulócitos II e fibroblastos (Fig. 8E e F) (Fig. 14). Finas fibras de colágeno são formadas e iniciam o fechamento da lesão a partir da região da derme central. Trata-se da fase onde é encontrado o maior número de fibroblastos nas regiões da derme superficial e central (22 ±12,4 e 11,8 ±6,2) (Figs. 13 e 14). Amebócitos são detectados apenas na derme central (5,1 ±1,0) e não mais na hipoderme (Fig. 13).

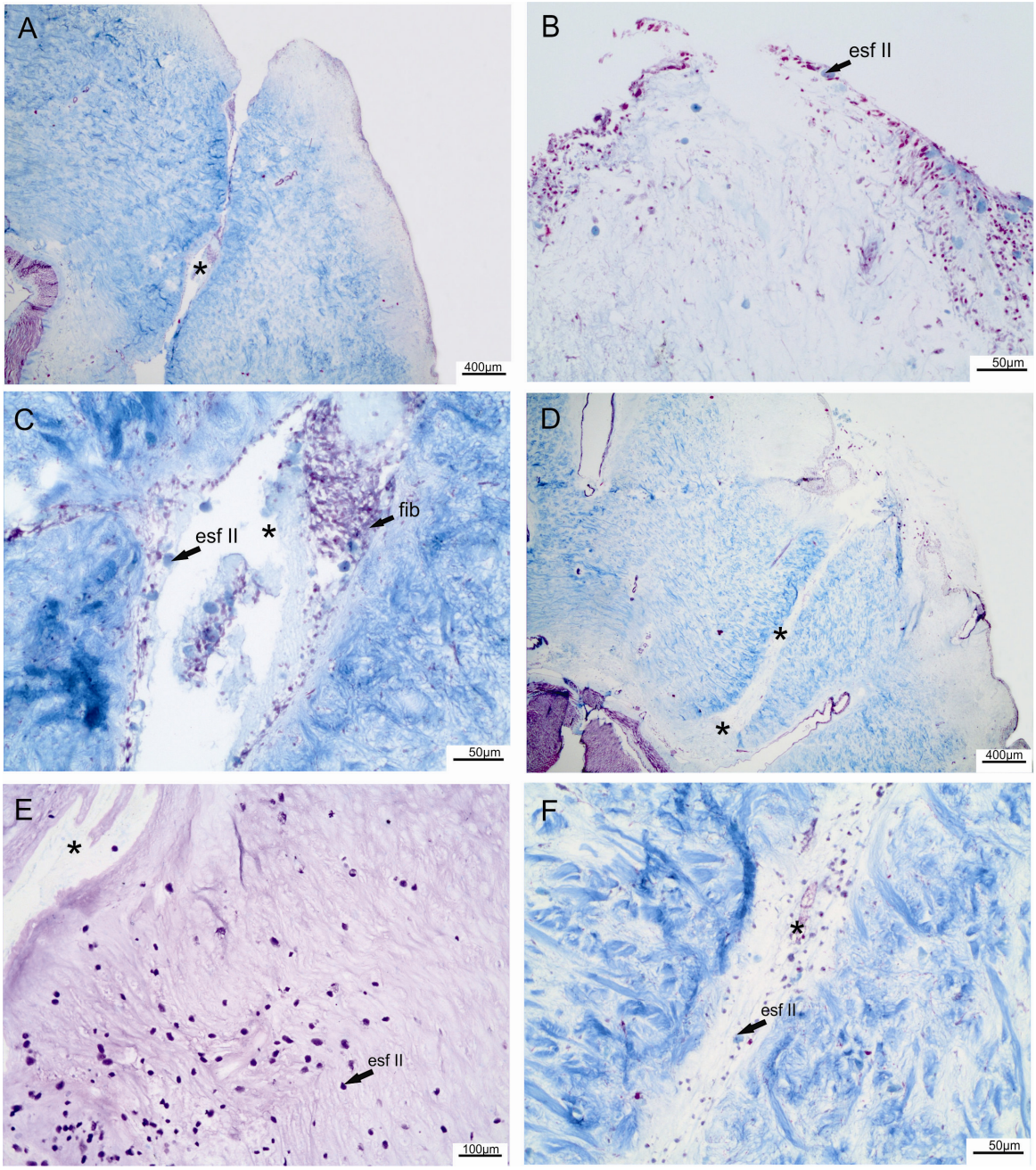


Figura 8. Fotomicrografias da parede do corpo de *H. grisea*. (A) Visão geral da área após um dia. (B) Detalhe da degeneração da área epiderme e derme superficial após um dia, há a presença de esferulócitos II nesta área. (C) Canal da lesão após um dia preenchido por celomócitos. (D) Visão geral da área após dois dias, mostrando uma área de degeneração na epiderme e derme superficial. (E) Esferulócitos II na hipoderme dois dias após a lesão (Azul de Toluidina). (F) Canal da lesão após dois dias, observam-se novas fibras de colágeno. (*fib*: fibroblastos; *esfI:* esferulócito I; *esfII*; esferulócito II *: canal da lesão).

oiQuatro dias após a lesão, macroscopicamente, não permanecem sinais da região afetada na superfície corpórea do pepino do mar. As faces da ferida, nas regiões da hipoderme e derme central, se encontram unidas (Fig. 9A). Porém, uma área de desorganização da epiderme e derme superficial ainda é visível (Fig. 9B). O canal da lesão na região da derme central e da hipoderme está fechado por uma grande quantidade de fibras de colágeno. No entanto, estas fibras estão organizadas perpendicularmente às fibras da derme central (Fig. 9C). Desta forma, o local onde a lesão ocorreu permanece ainda bem distinto internamente. Neste período há aumento significativo dos esferulócitos I na derme superficial e na central (9,5 ±2,4 e 9,3 ±1,7, respectivamente). Nota-se também o aumento significativo do número de fibroblastos na derme central (11,8 ±6,2) (Figs. 12 e 13). Amebócitos participam do processo até o quarto dia. Após este período são encontrados apenas na derme superficial, como ocorre nos tecidos dos organismos em condições normais (Fig. 12).

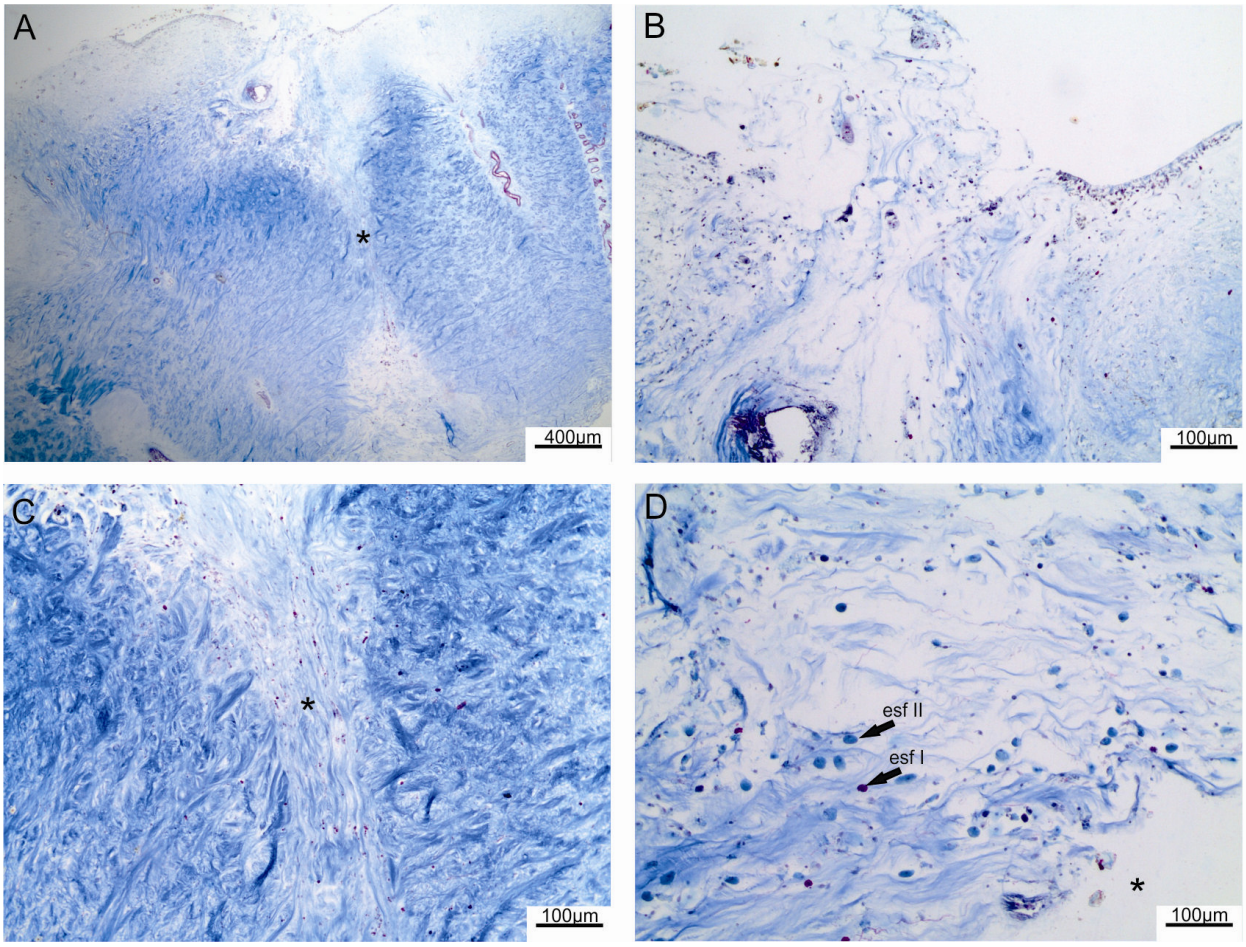


Figura 9. Fotomicrografias da parede do corpo de *H. grisea*, quatro dias após a lesão, coradas com Tricromo de Mallory. (A) Visão geral da cicatrização da ferida. (B) Epitélio e derme superficial degenerados. (C) Novas fibras de colágeno preenchendo o canal da lesão. (D) Esferulócitos I e II na hipoderme (*esfI*: esferulócito I; *esfI*I: esferulócito II; *: canal da lesão).

Dez dias após a lesão, uma nova camada de células epidérmicas é formada, mas a derme superficial continua com suas fibras desorganizadas e se confundindo com a derme central (Fig. 10A e B). Nesta fase, as novas fibras que preenchem o canal da lesão são semelhantes às fibras de tecidos normais. Um grande número de restos celulares e partículas livres, com as mesmas características das esférulas contidas nos esferulócitos I, são observadas no canal da lesão (Fig. 10C). Apenas alguns esferulócitos I intactos são vistos.

Fibroblastos estão restritos à derme superficial, em quantidades semelhantes as dos animais em condições normais (19,7 ±3,5). Na hipoderme, o número de esferulócitos II duplica em relação ao estágio anterior (8,6 ±1,6) (Fig. 14).

No décimo quinto dia já é possível observar uma diferenciação entre derme superficial e central (Fig. 10D e E), e o canal da lesão já está completamente preenchido por fibras de colágeno (Fig. 10F). Depois deste período, não há alterações significativas no número de células e na organização dos tecidos em relação ao observado no trigésimo dia após a lesão. Nesta observação final, a região lesionada já se encontra completamente reestruturada (Fig. 11). Os tecidos estão visivelmente diferenciados, mesmo que ainda seja possível notar onde a lesão foi induzida, pelo desarranjo das fibras da matriz extracelular. A quantidade de fibroblastos e amebócitos é semelhante daquelas encontradas no animal controle. Porém, o número de esferulócitos I e II continua maior do que nos tecidos em condições normais (7,1±1,7 e 12,7±3,4, respectivamente) (Figs. 12 – 14). Durante todos os eventos de cicatrização, não foram observadas células em divisão ou aumento no número de agregados de células próximos à lesão.

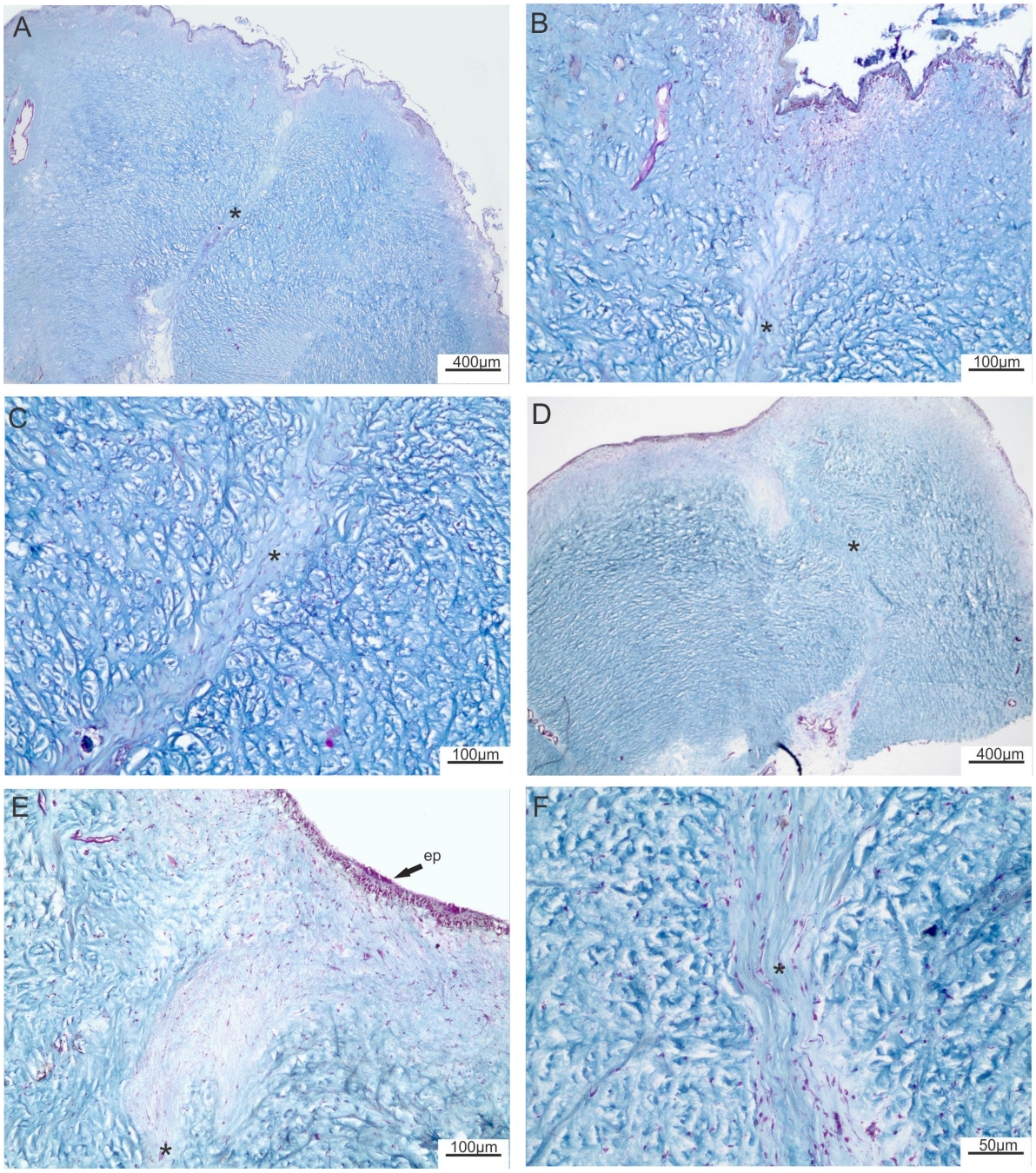


Figura 10. Fotomicrografias do processo de cicatrização em *H. grisea* 10 dias (A - C) e 15 dias (D - F) após a lesão. (A) Visão geral da região lesionada 10 dias depois da lesão. (B) Detalhe da formação de uma nova camada de células epiteliais. (C) Detalhe da presença de fibras de colágeno orientadas perpendicularmente às fibras antigas. (D) Visão geral da região lesionada 15 dias após a lesão. (E) Reorganização do epitélio e da derme superficial. (F) Canal da lesão completamente fechado pelas fibras de colágeno. (*ep*: epiderme; *: canal da lesão).

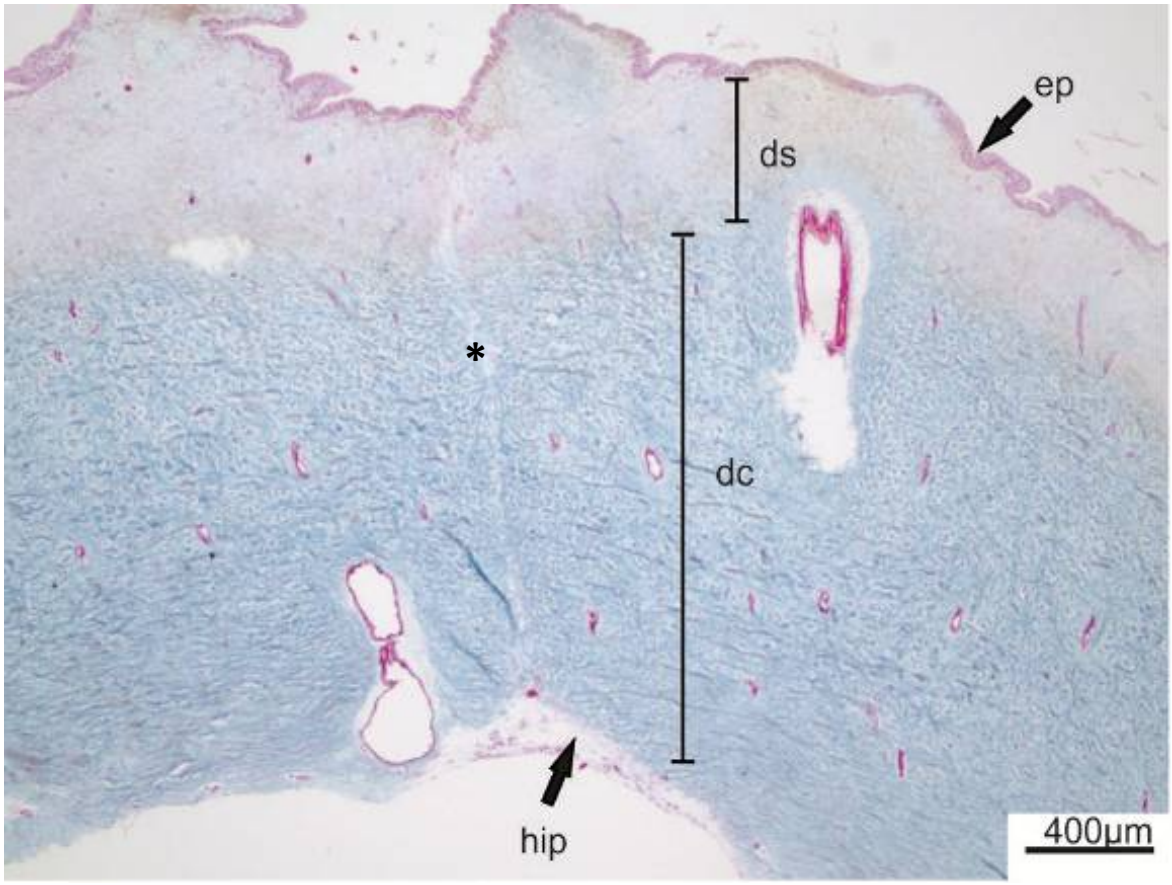


Figura 11. Fotomicrografia da parede do corpo de *H. grisea*, 30 dias após a lesão. Ainda é possível perceber onde a lesão foi realizada, porém todos os tecidos que compõe a região estão reestruturados na área da ferida.(*ep*: epiderme; *ds*: derme superficial; *dc*:derme central; *hip*: hipoderme; *: Canal da lesão).

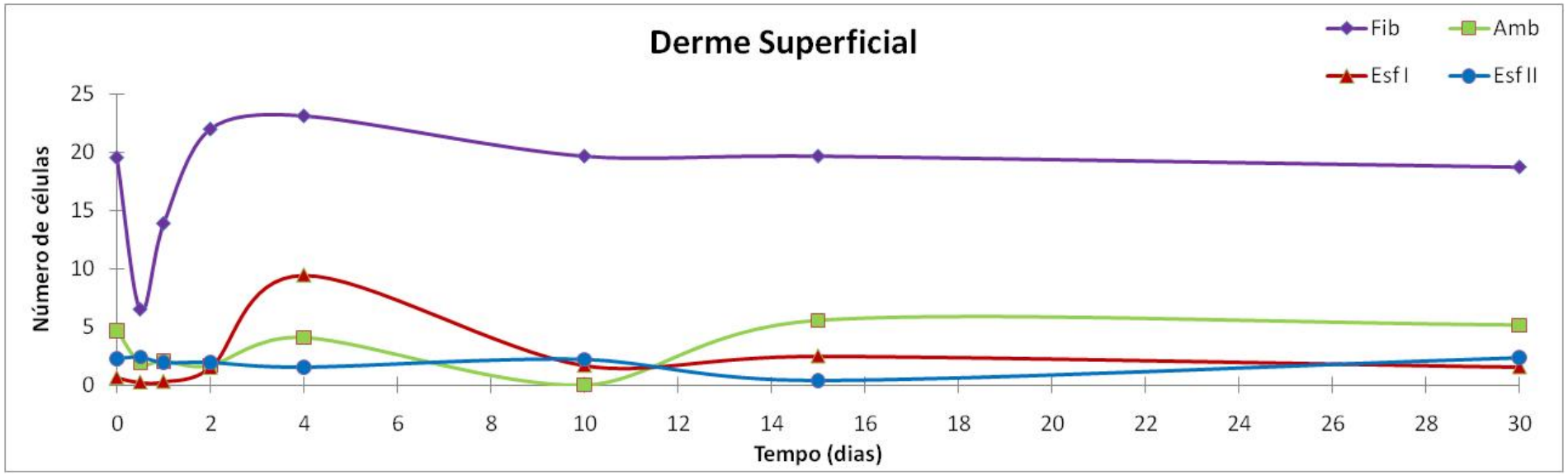


Figura 12. Gráfico da dinâmica das populações de fibroblastos, amebócitos e esferulócitos I e II na derme superficial ao longo dos 30 dias após a lesão. ($p < 0,0001$)

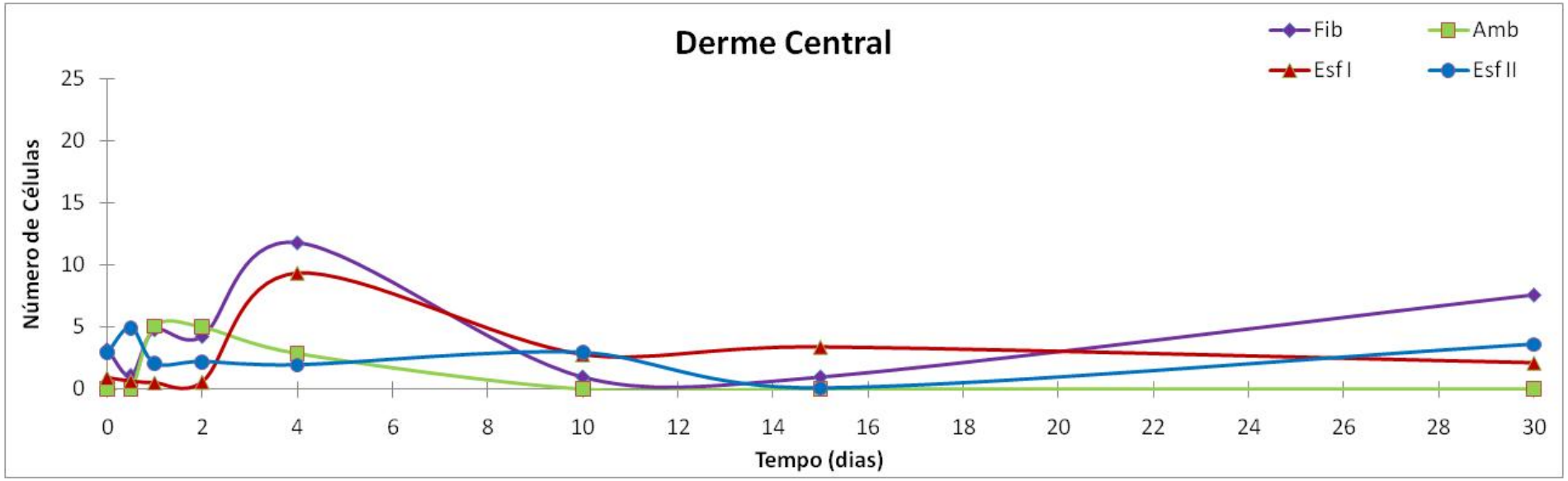


Figura 13. Gráfico da dinâmica das populações de fibroblastos, amebócitos e esferulócitos I e II na derme central ao longo dos 30 dias após a lesão. ($p < 0,0001$)

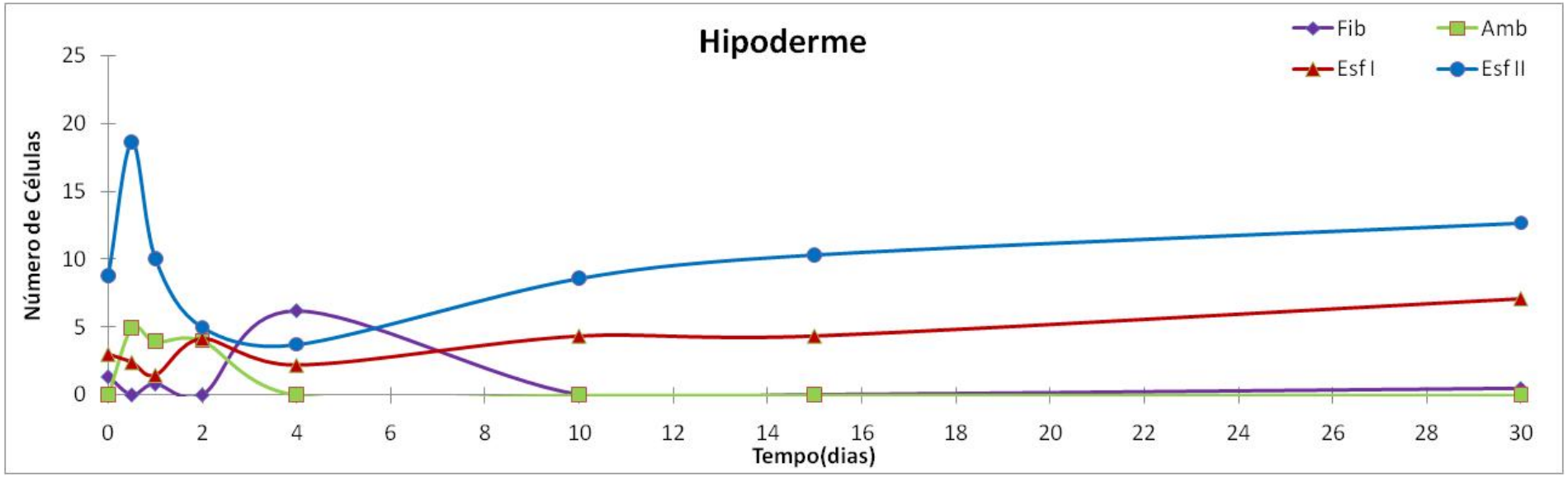


Figura 14. Gráfico da dinâmica das populações de fibroblastos, amebócitos e esferulócitos I e II na hipoderme ao longo dos 30 dias após a lesão. ($p < 0,0001$)

2. Caracterização Morfológica e Citoquímica dos Esferulócitos

No fluido celômico de *H. grisea* foram observados dois morfotipos de células contendo vacúolos no seu citoplasma, que diferem quanto ao conteúdo. Estas são semelhantes às encontradas entre as fibras de colágeno do tecido conjuntivo destes animais.

A primeira população de células (esferulócito tipo I - Figs. 15A e B) está presente no fluido celomático em uma concentração de 2 x 10^4 células/ml. São ovóides (8 µm de diâmetro) e com o citoplasma preenchido por esférulas de tamanho e conteúdo homogêneos (0,5 µm). Em todas as células deste tipo as esférulas possuem forte afinidade pela Fucsina Ácida presente no Tricromo de Mallory, mas não pelo Azul de Toluidina. O núcleo é esférico, de tamanho grande em relação ao citoplasma (4 µm) e geralmente está colocado perifericamente, devido à grande quantidade de esférulas no citoplasma. Em MET observa-se que o citoplasma é totalmente preenchido pelas esférulas, que são homogêneas e eletrodensas (Fig. 17).

A segunda população de células (esferulócito tipo II) é a mais abundante no líquido celomático, com uma concentração de 3,75 x 10^4 células/ml. Tem uma morfologia geral semelhante ao tipo I, sendo esféricas (8-16 µm) e com esférulas preenchendo todo o citoplasma (0,4 - 1,0 µm). O núcleo é pequeno (0,5 - 0,8 µm), e por vezes obscurecido pelas esférulas. Foram observadas células em diferentes estágios morfológicos, evidenciados por variações contínuas no tamanho, intensidade e afinidade da coloração das suas esférulas, tanto com Tricromo de Mallory como com Azul de Toluidina (Fig. 16).

A partir das alterações nestas características e principalmente pela relação de tamanho, foi montada uma possível seqüência de diferenciação destas células.

O tipo celular considerado como o estágio inicial consiste de células esféricas (8 µm), com esférulas densas (0,5 µm) que preenchem todo o citoplasma e conferem uma aparência de mórula. Neste estágio suas esférulas mostram forte metacromasia com o Azul de Toluidina e coram igualmente com o Azul de Metila e o Verde Luz constituintes do Tricromo de Mallory (Fig. 16A e E). Nesta última coloração, em cada uma das esférulas é possível notar uma região periférica estreita de coloração mais clara ao redor de um núcleo central mais denso.

À medida que a diferenciação prossegue, as esférulas aumentaram de tamanho, basicamente pelo aumento desta região periférica, e passam a apresentar as duas regiões destacadas. Com Tricromo de Mallory a porção central cora intensamente, mas não reage com o Azul de Toluidina. Por outro lado, a camada periférica não cora com o Tricromo de Mallory e apresenta forte metacromasia com o Azul de Toluidina (Fig. 16B e F).

Numa etapa posterior, o tamanho das esférulas é maior e dentro destas observam-se pequenos grânulos dispersos, como se a porção central densa estivesse fragmentada. Estes grânulos coram com o Azul de Metila/Verde Luz do Tricromo de Mallory, mas não com o Azul de Toluidina (Fig. 16C e G). O oposto ocorre com o restante do conteúdo da esférula, que não ocupa mais apenas a posição periférica, e mostra metacromasia com o Azul de Toluidina.

O estágio considerado como final da diferenciação é caracterizado por células com diâmetro maior (16 µm) e esférulas também maiores (4 µm)

preenchendo todo o citoplasma. Observa-se que uma mesma célula apresenta esférulas que coram em intensidades diferentes e apresentam grânulos menores e em maior quantidade. Uma constatação adicional é a aparente alteração da afinidade pelo Azul de Metila e Verde Luz do Tricromo de Mallory, verificada nas esférulas ao longo do processo. Enquanto que no estágio inicial estes aparentam ter afinidades semelhantes aos dois compostos, nos estágios finais a afinidade pelo Azul de Metila passa a ser claramente maior (Fig. 16D e H). Em microscopia eletrônica de transmissão observa-se que as esférulas, do que consideramos como estágio final, não são eletrodensas e homogêneas como as dos esferulócitos I, e tem um arranjo estrutural complexo e conteúdo variado (Fig. 17B).

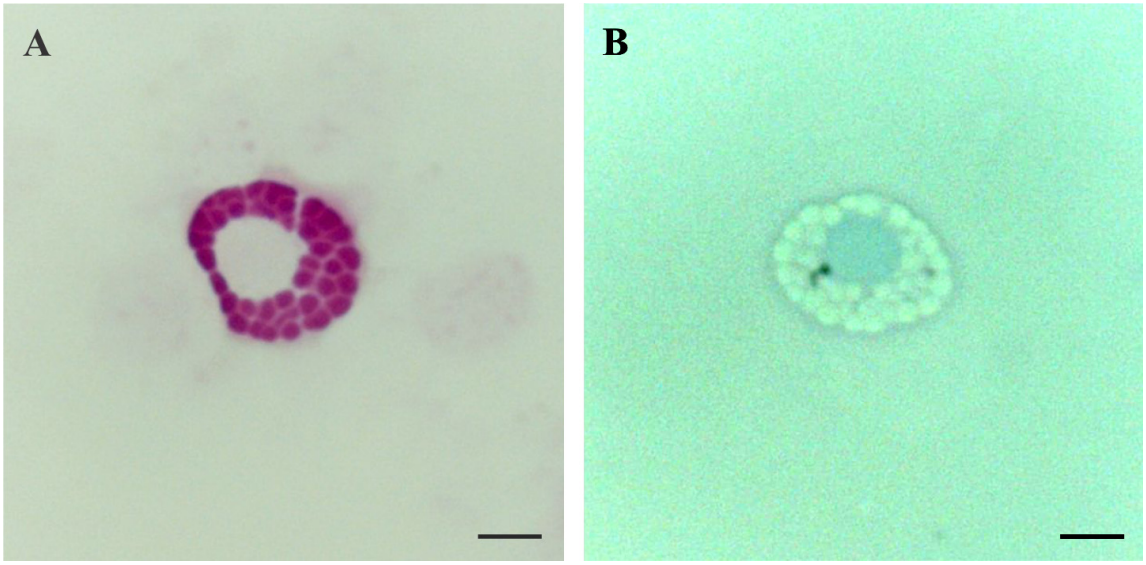


Figura 15. Esferulócitos tipo I de *H. grisea*. (A) Corado com Tricromo de Mallory e (B) Azul de Toluidina. *n*: núcleo (Escala: 2 µm).

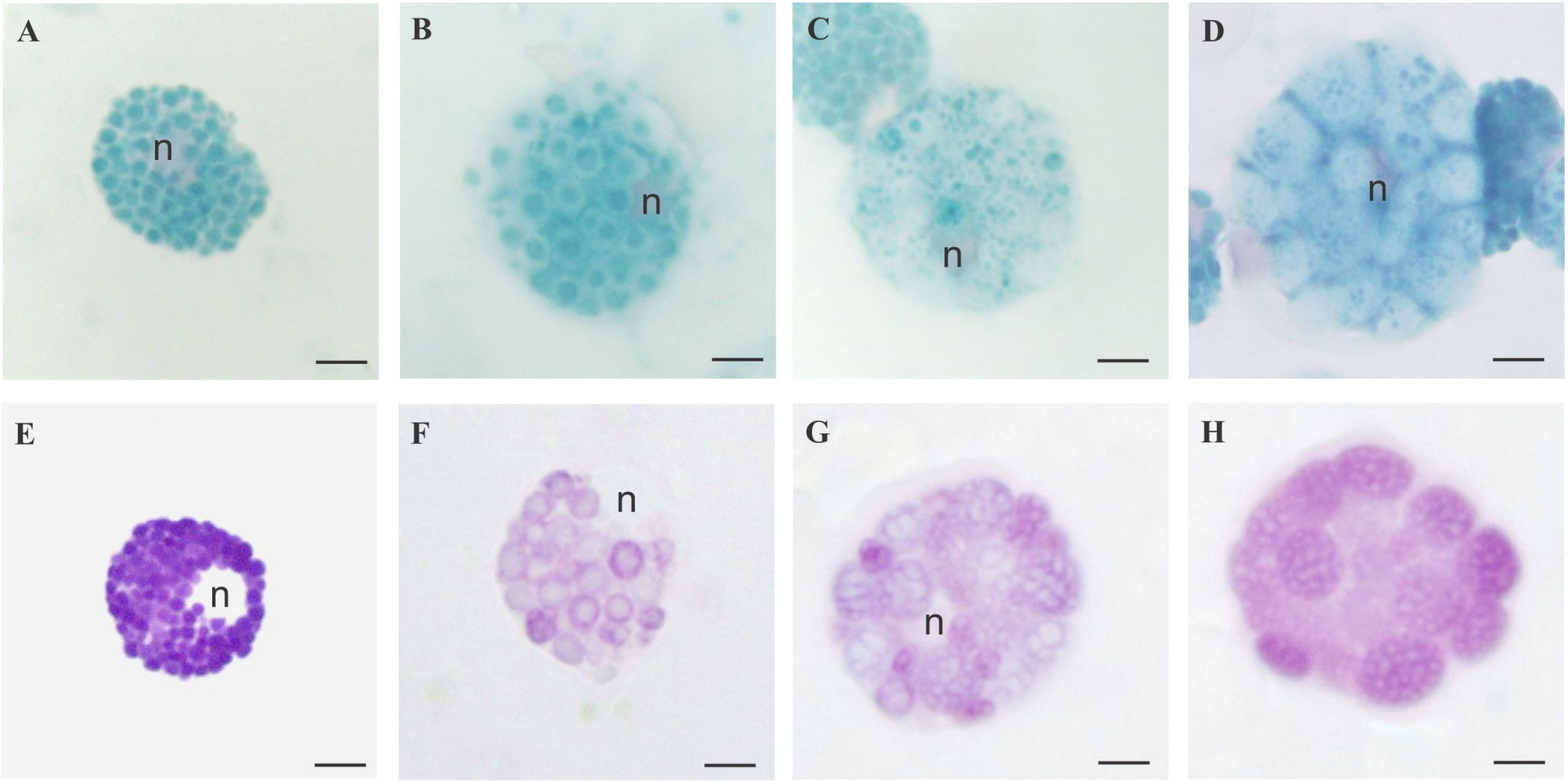


Figura 16. Esferulócitos tipo II de *H. grisea* em diferentes estágios de diferenciação. (A-D) Corados com Tricromo de Mallory e (E-H) corados com Azul de Toluidina. *n:* núcleo (Escala: 2 µm).

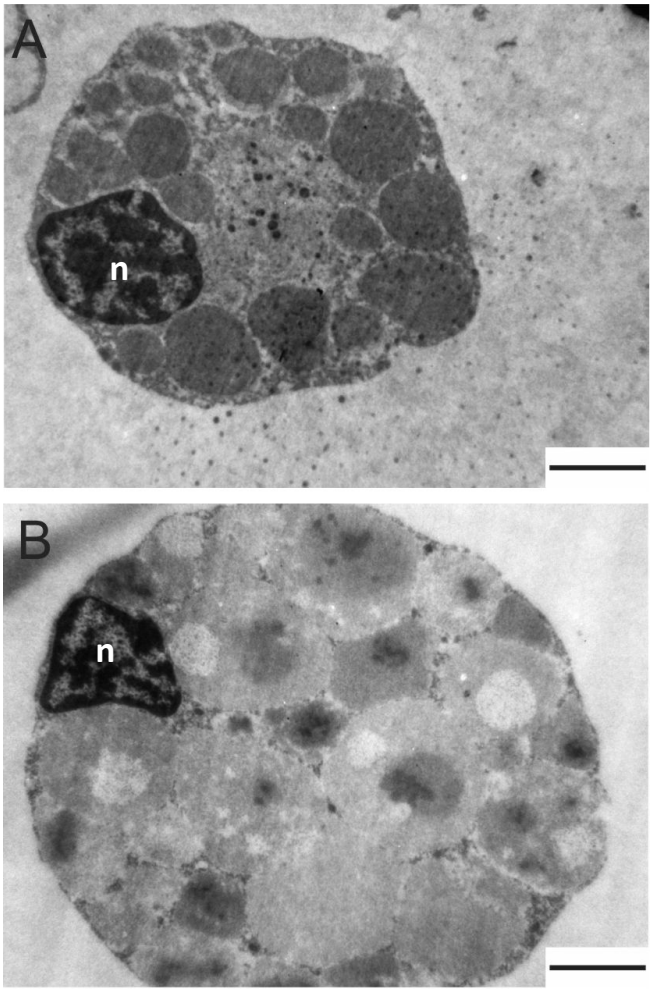


Figura 17. Fotos de microscopia eletrônica de transmissão dos esferulócitos encontrados no líquido celomático de *H. grisea*. (A) Esferulócito I. (B) Esferulócito II. *n:* núcleo. (Escala: 2 µm).

3. Separação dos esferulócitos com resina de troca aniônica

Observou-se que a maioria dos celomócitos se associa rapidamente aos grânulos de resina (Fig. 18A e B). Inicialmente, diferentes concentrações de NaCl (de 0,1 a 4 M) foram testadas para verificar o perfil de liberação das células da resina. A primeira fração coletada foi constituída por células sem afinidade, e nela foi observada a presença majoritária de esferulócitos tipo I (Fig. 19A). A segunda fração foi coletada após a lavagem da resina com NaCl 0,5 M. Nesta fração foram observados principalmente esferulócitos tipo II menores, que representam o estágio inicial de diferenciação deste tipo celular (v. Fig. 16A e E). Já a solução com NaCl 2M retirou os esferulócitos tipo II maiores, ou mais diferenciados, que ainda estavam ligados à resina (Fig. 19B). Todos os demais tipos celulares observados no líquido celomático de *H. grisea*, como amebócitos e células progenitoras, permaneceram ligados aos grânulos, e não foram recuperados com as concentrações de NaCl utilizadas.

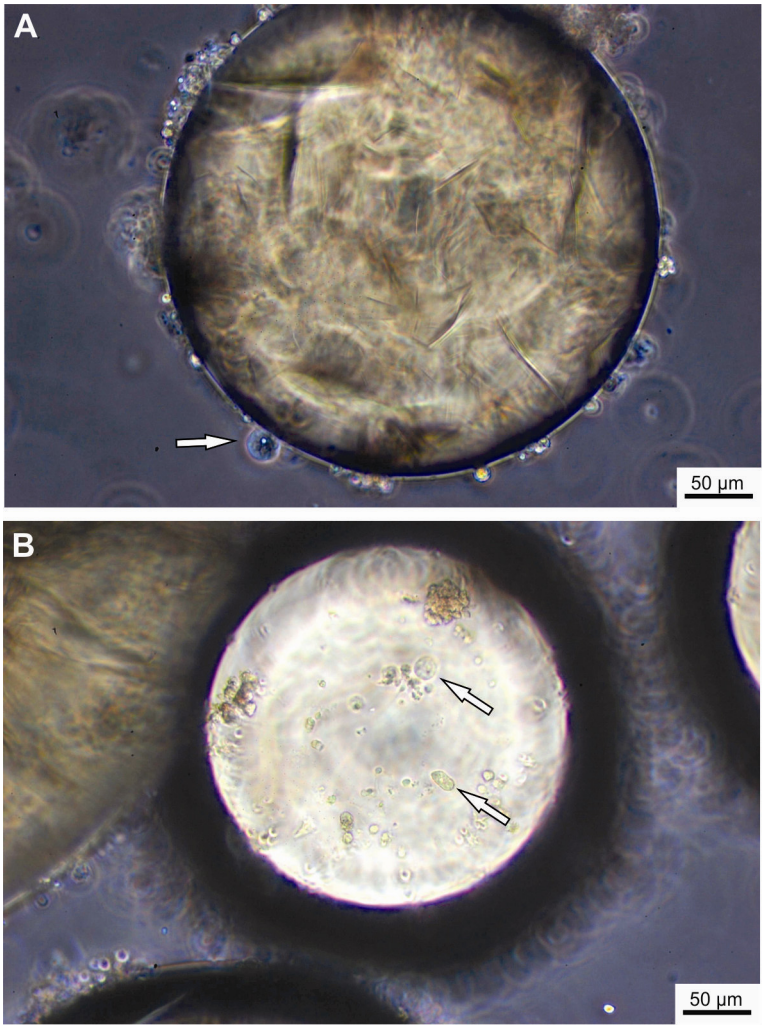


Figura 18. Foto em microscopia de luz mostrando celomócitos ligados aos grânulos de resina (seta branca)

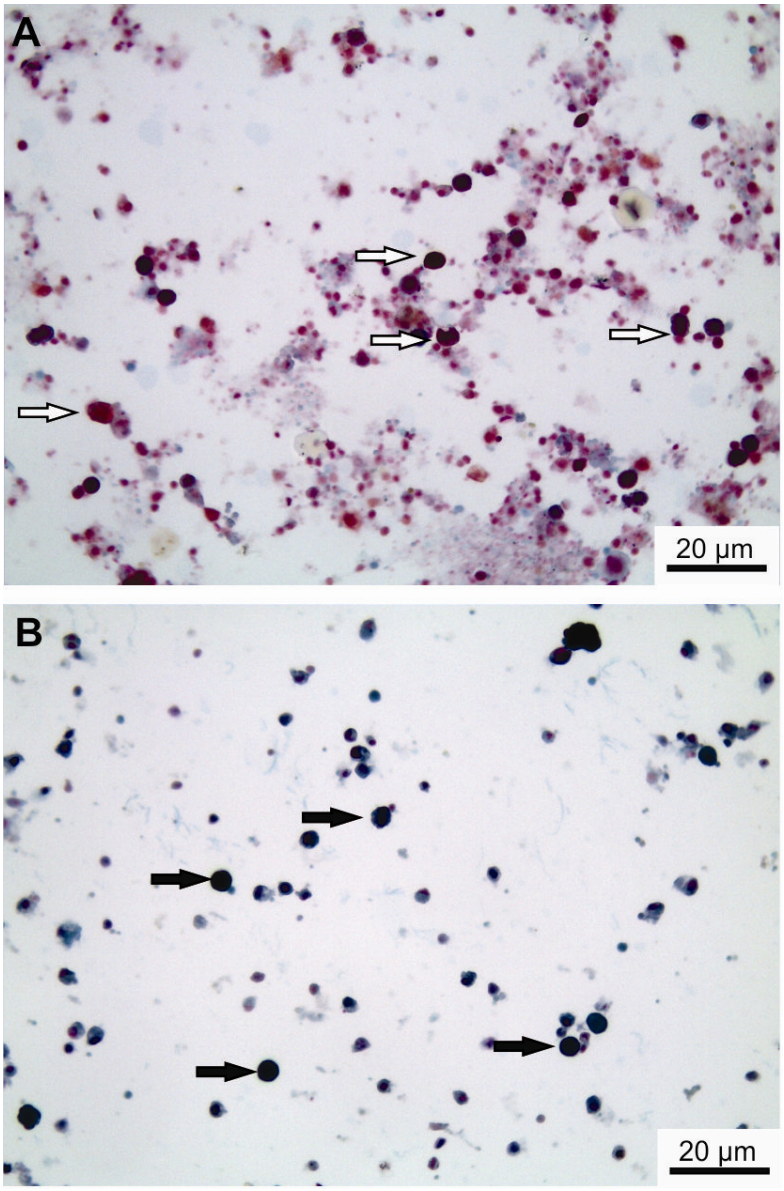


Figura 19. Foto em microscopia de luz de citocentrifugados feitos com as frações coletadas, após a separação das células em resina de troca aniônica, e corados com Tricromo de Mallory. (A) Fração 1 contendo os esferulócitos I indicados pelas setas brancas. (B) Fração 3 contendo os esferulócitos II apontados pelas setas pretas.

4. Caracterização química do conteúdo dos esferulócitos

Devido à característica abrangente do método utilizado para fracionar o material celular, as amostras foram constituídas por moléculas hidrossolúveis do mesmo tamanho de exclusão, porém pertencentes a grupos químicos diferentes. Desta forma, os perfis cromatográficos obtidos do HPLC apresentam similaridade entre eles. A maioria das substâncias se concentra na área mais hidrofóbica da eluição, no intervalo dos 20 aos 40 min, com um pequeno grupo de substâncias hidrofílicas no minuto 50 (Fig. 20 - 22). Isto é claramente observado nas amostras obtidas do extrato das células totais, e ocorre porque as substâncias mais abundantes são mais representativas devido à proporção do número de células.

No entanto, a comparação das análises de espectometria de massa do conteúdo dos vácuolos dos esferulócitos I e II mostram que existem substâncias que ocorrem exclusivamente em cada uma das populações de esferulócitos (Figs. 23 e 24). Nos extratos das duas populações de esferulócitos foram observados cinco picos principais. No tipo II, os dois primeiros picos são menos hidrofóbicos, com o primeiro mais concentrado dentro da amostra, diferentemente do tipo I, que possui picos hidrofóbicos mais concentrados.

Comparado os perfis podemos perceber que a população de esferulócitos II contribui com uma maior concentração das substâncias hidrofílicas. Assim, tanto nas amostras maiores que 30 kDa como no intervalo de 10-30 kDa, observamos que as substâncias presentes no primeiro e último pico exibem

maior concentração. As outras substâncias presentes nas amostras permanecem sem diferença entre esferulócitos I e II, indicando que podem ser constitutivas das células e não produto de uma função especifica. As substâncias menores que 10 kDa não apresentam diferenças evidentes com o total ou entre as subpopulações celulares, podendo significar que estas também são espécies químicas constitutivas do tipo celular e não da sua função.

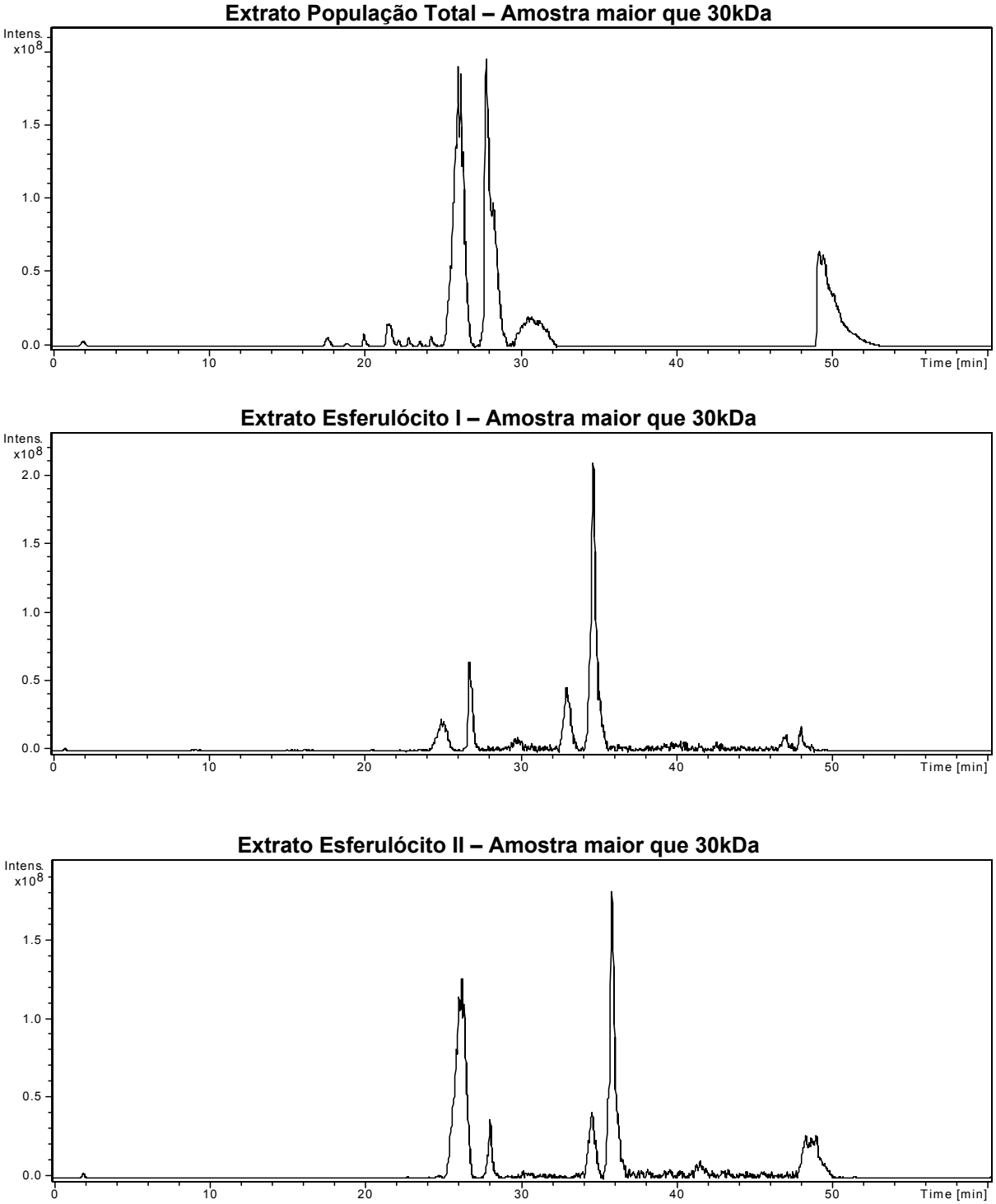
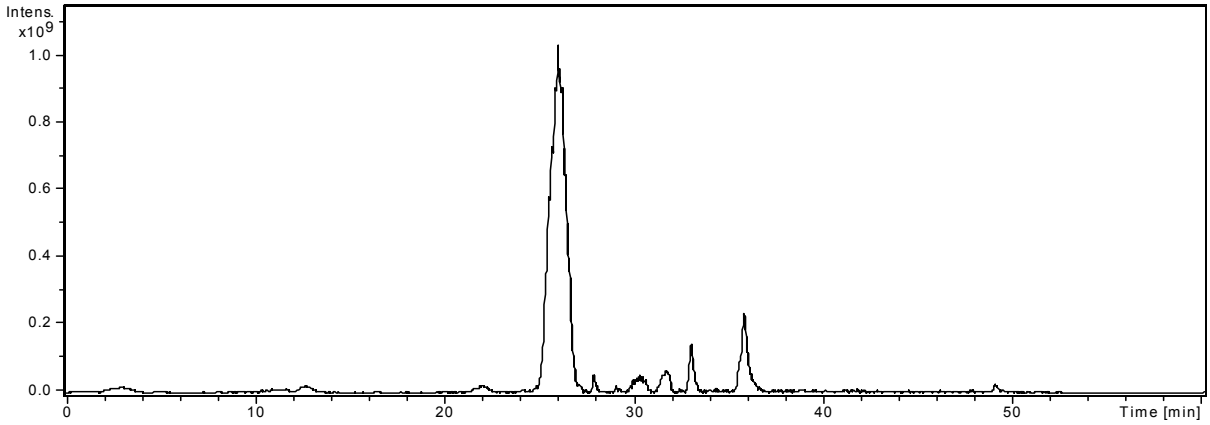
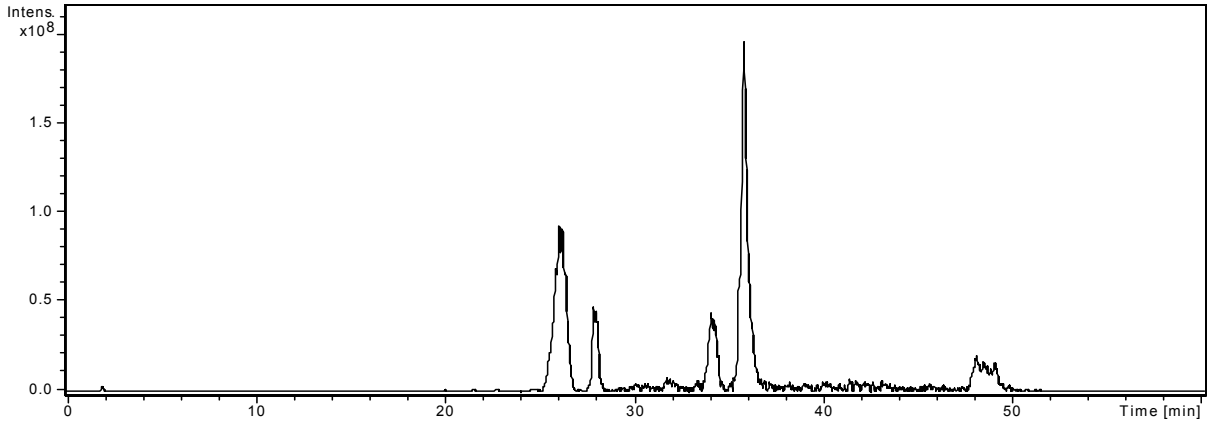


Figura 20. Perfis obtidos no HPLC dos extratos com substâncias de massa maior que 30kDa.

Extrato População Total – Amostra entre 10kDa e 30kDa



Extrato Esferulócito I – Amostra entre 10kDa e 30kDa



Extrato Esferulócito II – Amostra entre 10kDa e 30kDa

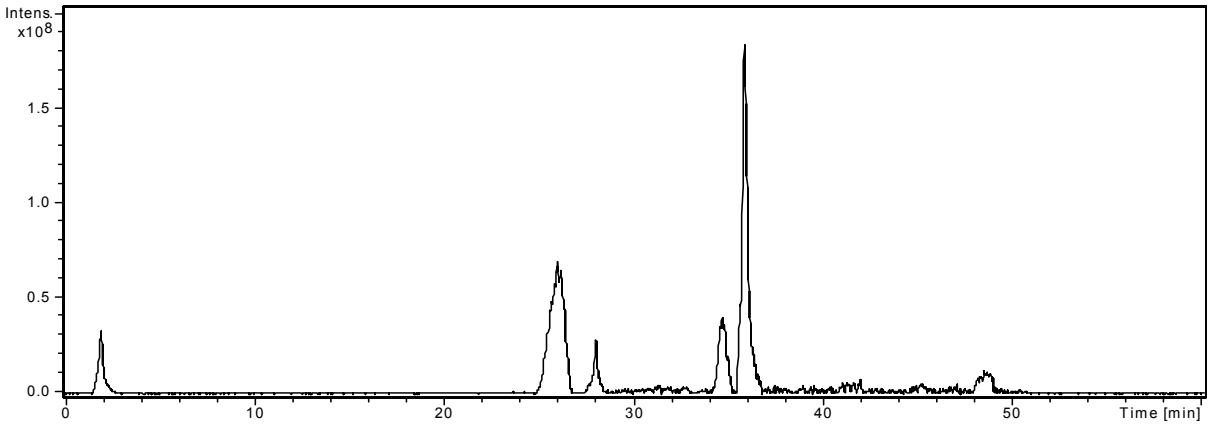


Figura 21. Perfis obtidos no HPLC dos extratos com substâncias de massa entre 10kDa e 30kDa.

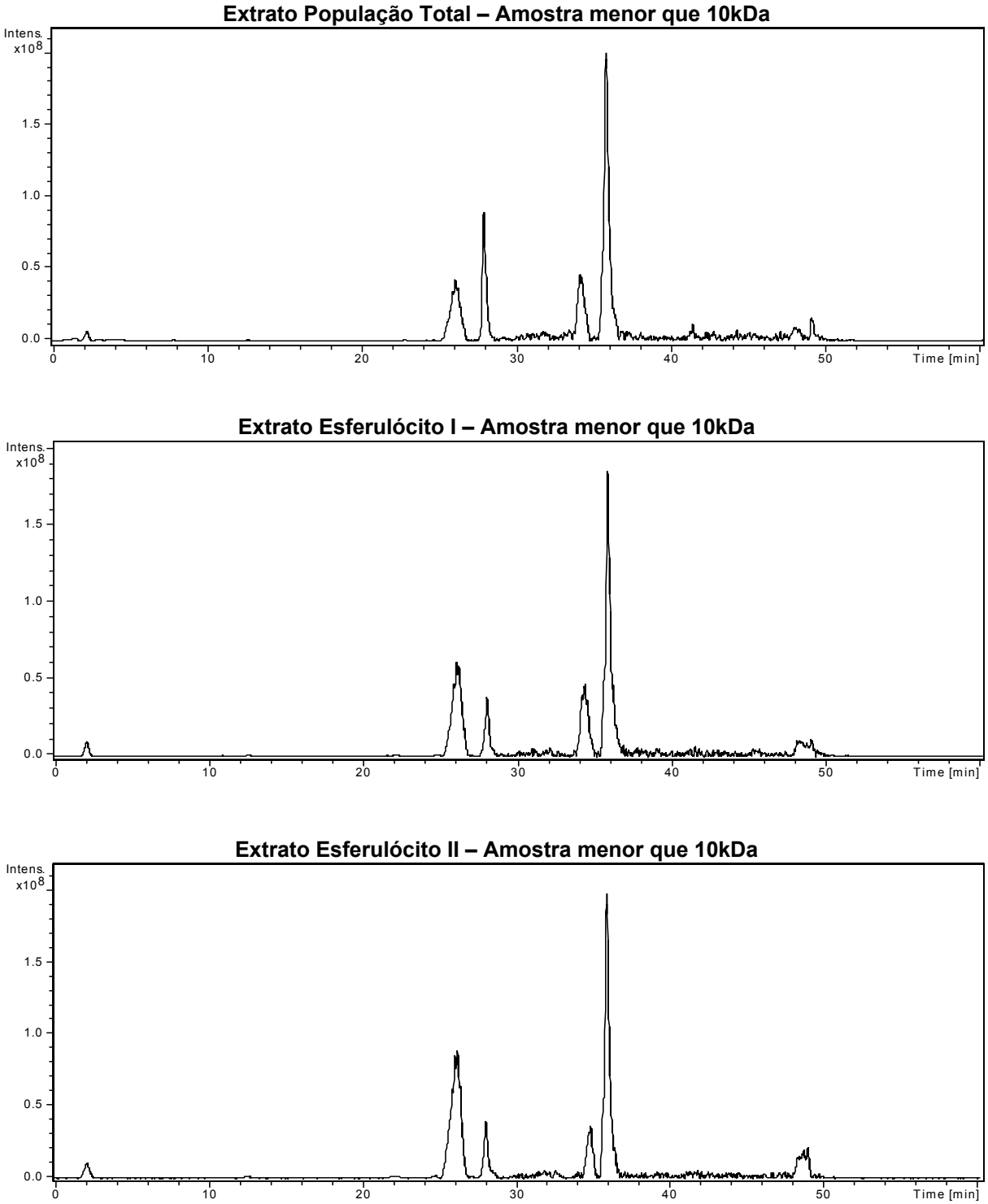


Figura 22. Perfis obtidos no HPLC dos extratos com substâncias de massa menor que 10kDa.

A comparação das análises de espectometria de massas do conteúdo dos vacúolos dos esferulócitos I e II mostram que existem substâncias que ocorrem exclusivamente em cada uma das populações de esferulócitos (Figs. 23 e 24). Tal observação confirma os diferentes conteúdos observados em microscopia ótica.

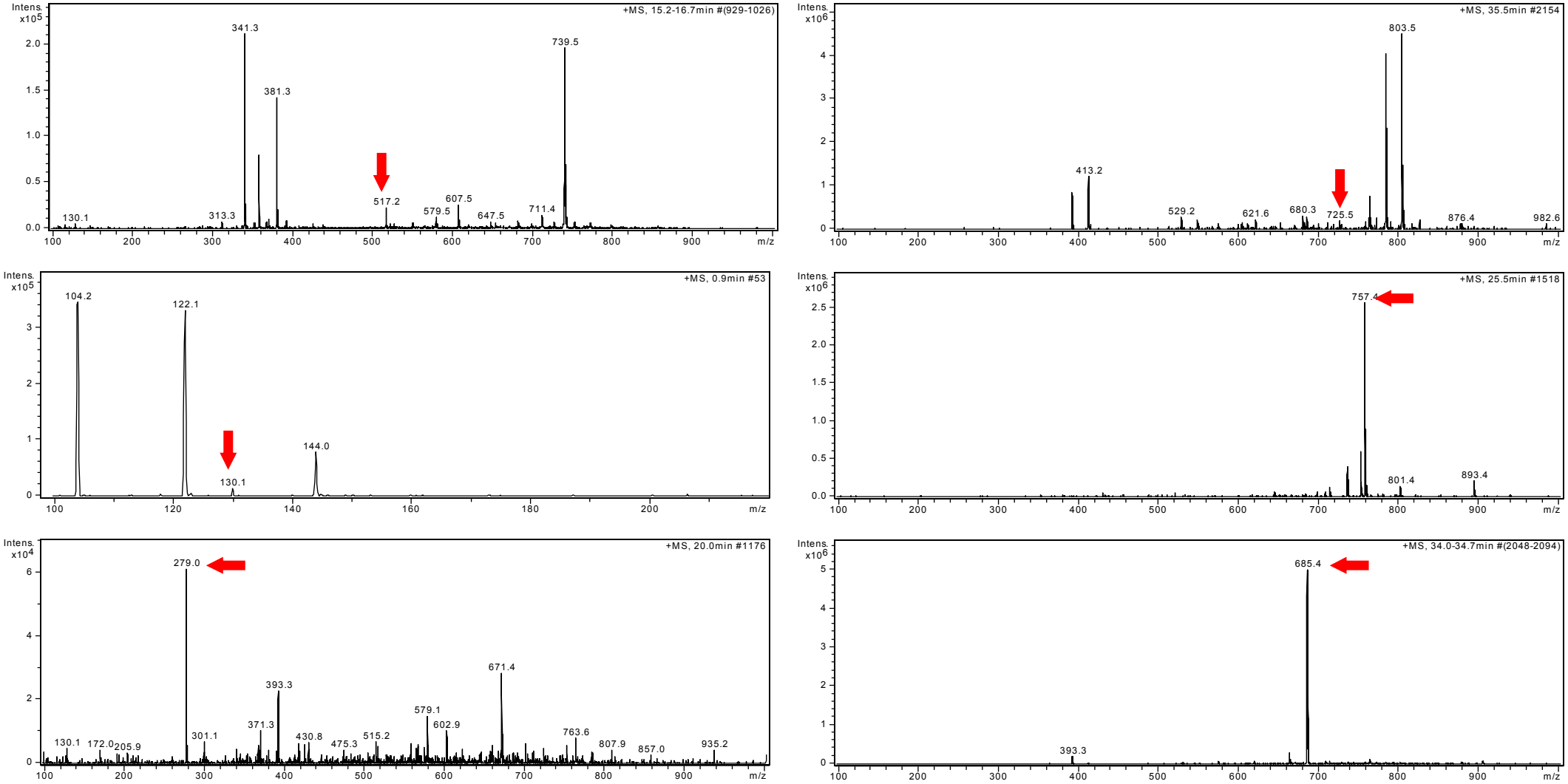


Figura 23. Espectometria de massas do conteúdo dos esferulócitos I, mostrando as substâncias que ocorrem exclusivamente nesta população de células (setas vermelhas).

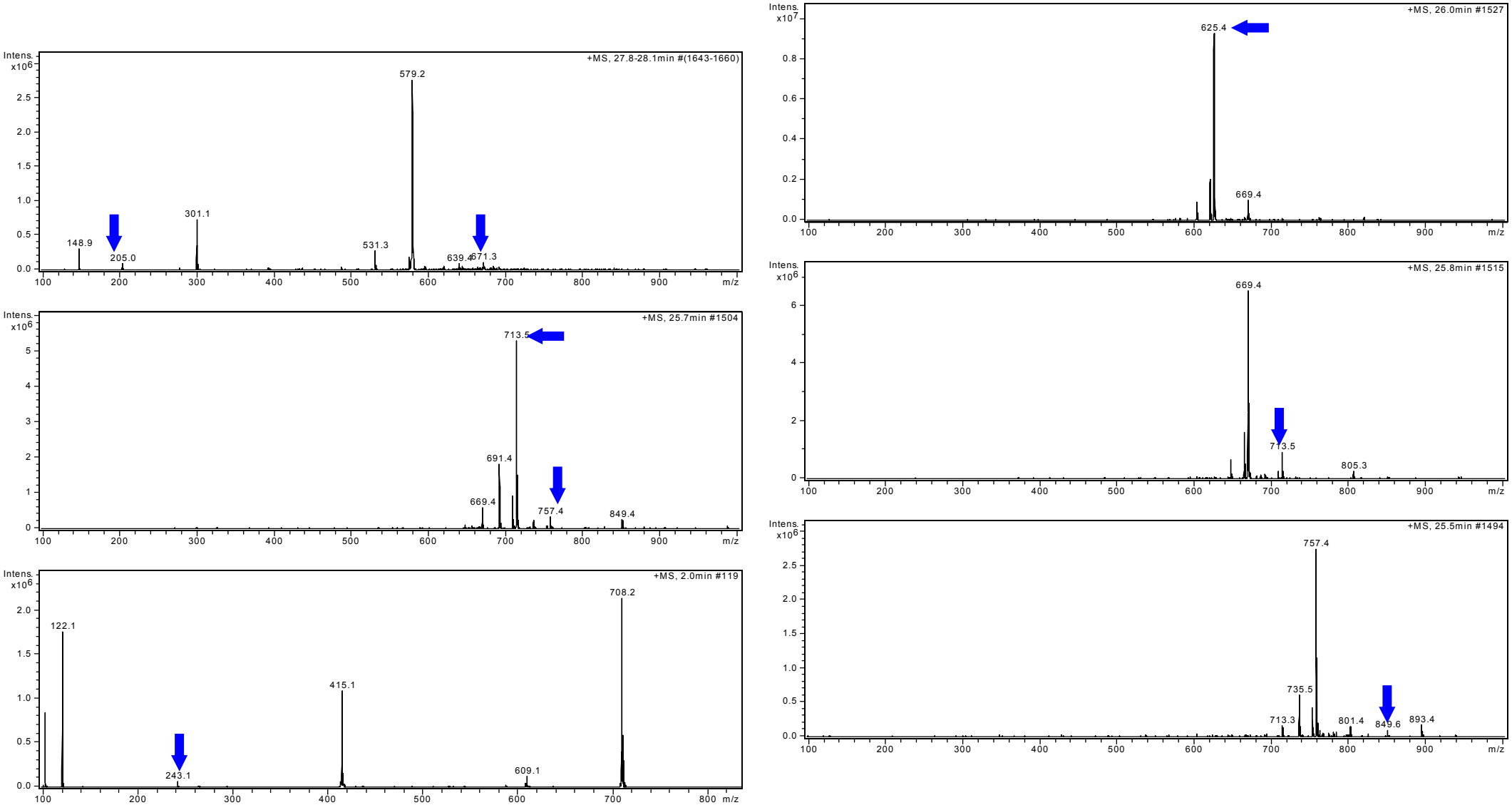


Figura 24. Espectometria de massas do conteúdo dos esferulócitos II, mostrando as substâncias que ocorrem exclusivamente nesta população de células (setas azuis)

Discussão

A composição dos tecidos dérmicos segue um padrão geral em todos os metazoários, dos mais basais aos mais derivados. São compostos por moléculas de colágeno agregadas em fibrilas fusiformes bipolares que possuem proteoglicanos associados em sua superfície (Trotter *et al.* 1995, 1998). Feixes paralelos dessas fibrilas constituem estruturas maiores que são as fibras de colágeno, um componente considerado básico na aquisição e desenvolvimento da multicelularidade (Tettamanti *et al.* 2004). Complementando essa estrutura, também é encontrada uma extensa rede de microfibrilas não colágenas que permeiam a derme, e que podem ser responsáveis pelas diferentes propriedades mecânicas destes tecidos (Thurmond & Trotter 1996). Este conjunto de componentes desempenha um papel fundamental na modulação de várias funções celulares incluindo adesão, migração, crescimento e diferenciação (Tettamanti *et al.* 2004). Além disso, as fibras de colágeno também estão envolvidas em outros processos, como a estabilização da forma dos tecidos, sendo produzidas durante o desenvolvimento dos organismos e regeneração (Badylak 2002).

A classe Holothuroidea possui espécies de variadas formas e tamanhos, com a parede do corpo com características diferentes. Animais da família Synaptiidae e Chiridotiidae, por exemplo, possuem parede do corpo fina e com grande quantidade de ossículos. Por outro lado, organismos das famílias Stichopodiidae e Holothuriidae possuem parede do corpo espessa e com poucos ossículos (Hyman 1955). Apesar das diferenças, todas são capazes de reparar danos de forma rápida e eficiente, e por vezes pouco usual. Por exemplo, sinaptideos possuem a capacidade de auto-suturar feridas na parede

do corpo através da reorganização de ossículos em forma de âncora (Fankboner 1978).

Na maioria dos animais multicelulares, a cicatrização geralmente é subdividida em quatro fases: coagulação, inflamação, migração e/ou proliferação, e remodelagem. Em vertebrados e mesmo em outros grupos de invertebrados celomados (e.g. moluscos e artrópodes) um trauma ou irritação é seguido por uma resposta celular exudativa rápida, formando um coágulo (Fontaine 1973, Acosta-Salmon & Southgate2005, Gurtner *et al.* 2008). Desta forma, ocorre o isolamento do meio interno sem o gasto de tempo necessário para o recrutamento e atuação de mecanismos celulares no local. Posteriormente, ocorre uma marcada proliferação celular na área da lesão, dando inicio ao processo de cicatrização (Martin 1997).

Em *Holothuria grisea* esta resposta inicial não é observada. Inicialmente, é verificada uma invasão de células provenientes do fluido celomático, mas em baixa densidade. Aparentemente, isto é causado apenas pelo extravasamento de pequenas quantidades de fluido após o corte, e não representa um processo direcionado.

Os eventos celulares e teciduais que ocorrem durante a cicatrização em *H. grisea* estão resumidos na Figura 25, como a migração de células, fibrogênese e aumento na população de esferulócitos são similares aos realizados durante a cicatrização em outras espécies da mesma ordem (Tabela 1). A primeira reação observada, logo após a lesão, foi a contração rápida e enrijecimento da parede corporal na área lesionada. Isto resultou no fechamento, por pressão, da porção mais externa da área cortada. Esta reação

substitui funcionalmente a formação de um coágulo, evitando a perda de fluidos e invasão de patógenos. Essa rápida contração ocorre devido a presença do tecido conjuntivo mutável que é capaz de mudar rapidamente as suas propriedades mecânicas através de controle neural (Szulgit & Shadwick 2000, Wilkie 2001). A presença deste tecido é uma característica peculiar dos equinodermos. Em holotúrias, a modificação reversível das propriedades do tecido é comumente utilizada para a manutenção da postura e defesa contra predadores sem grandes gastos de energia (Byrne 2001).

Figura 25 (próxima página). Desenho esquemático resumindo os principais eventos que ocorreram durante o processo de cicatrização em *H. grisea*. (A) Organização da parede do corpo antes da lesão, mostrando a cutícula, a epiderme e as três camadas que formam o tecido conjuntivo (*Ds*: derme superficial, *Dc* :derme central, *Hp*: Hipoderme e *Cc*: cavidade celômica) e a distribuição dos tipos celulares. Os amebócitos estão restritos à região da derme superficial e esferulócitos se concentram na hipoderme. (B) Parede do corpo 12 horas após a lesão. Há uma rápida contração da parede do corpo com participação do tecido conjuntivo mutável. Esta reação fecha a ferida na parte mais externa, substituindo, funcionalmente, a formação de coágulos. Isto evita a perda de fluidos e invasão de patógenos. (C) Vinte e quatro horas após a lesão, há uma contração da parede do corpo, fechando a ferida. Amebócitos já são observados na hipoderme e derme central, evidenciando sua possível origem a partir do liquido celomático, também é observada uma zona de degeneração (*DZ*) na região da epiderme e derme superficial, com participação ativa dos amebócitos fagocíticos. Celomócitos, principalmente esferulócitos II, estão presentes no canal da lesão. (D) Quatro dias após a injúria já há a presença de matriz extracelular e fibras de colágeno no canal da lesão. Neste período o número de esferulócitos I aumenta e estes se distribuem nas três camadas do tecido conjuntivo e na lesão. O número de fibroblastos na derme superficial também aumenta. (E) No décimo dia a epiderme foi reconstituída e o canal da lesão selado com nova matriz extracelular e fibras de colágeno. No entanto, estas estão organizadas perpendicularmente às fibras dos tecidos normais, e não é possível observar a diferenciação entre as camadas do tecido conjuntivo. Porém a ferida está completamente cicatrizada.

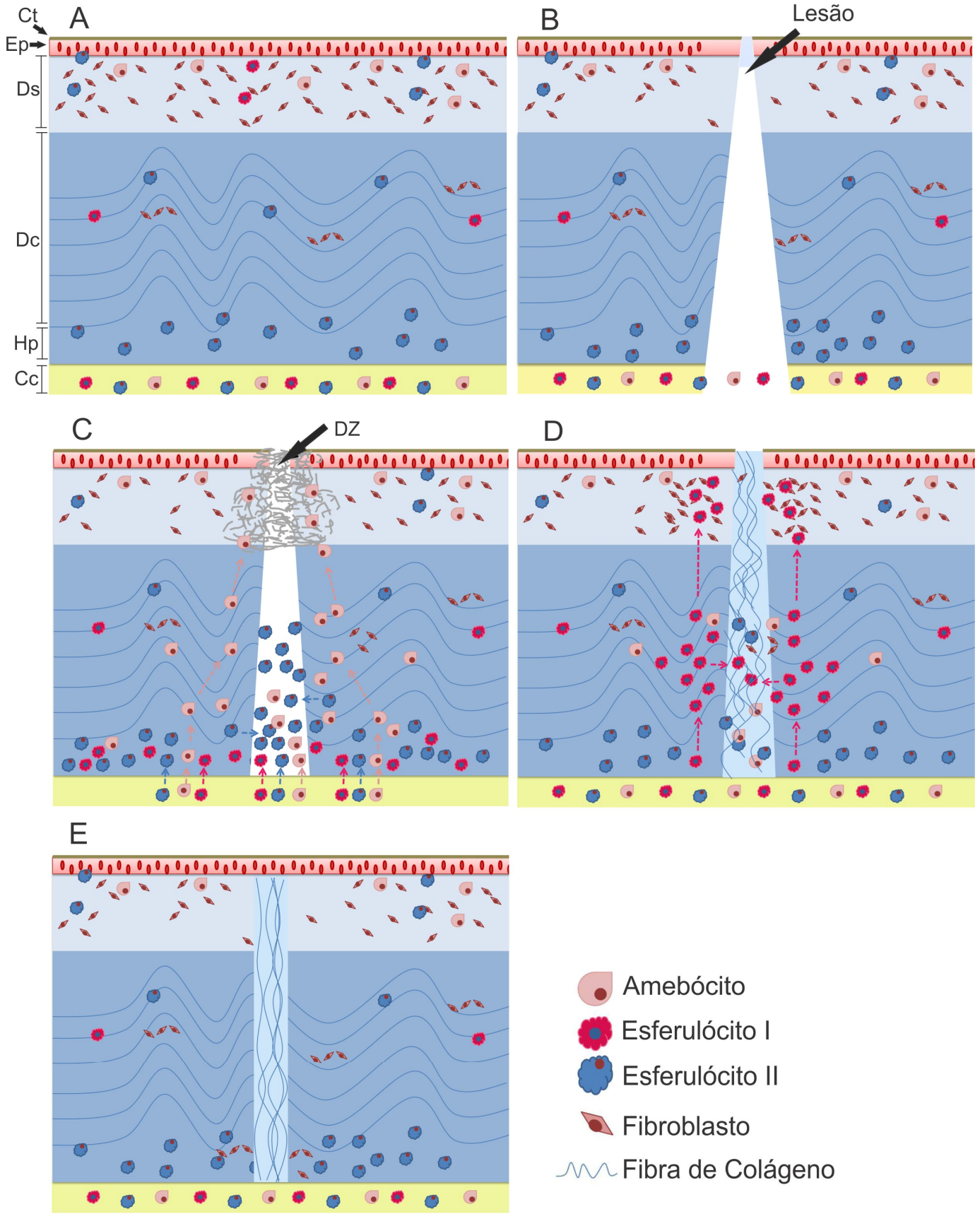

A
Ct
Ep
Ds
Dc
Hp
Cc
B
Lesão
C
DZ
D
E
Amebócito
Esferulócito I
Esferulócito II
Fibroblasto
Fibra de Colágeno

Tabela 1. Resumo dos eventos registrados durante o processo de cicatrização em diferentes espécies de holotúrias.

Tempo após a lesão	*S. badionotus* Cowden, 1968	*T. briareus* Menton & Eisen, 1973	*H. glaberrima* Miguel-Ruiz & Garcia-Arrarás, 2007	*H. grisea* Presente trabalho
1 h	-	Células mórula começam a se acumular na hipoderme e também estão presentes na derme exposta pela ferida	-	-
6-8hr	As camadas permanecem abertas	Degranulação das células mórula	-	(12h) Ferida aberta, com leve retração da epiderme. Aumento do número de esferulócitos II na hipoderme e derme central.
1 dia	Camadas retraídas; canal preenchido por um coágulo com células livres; Degeneração do colágeno	-	-	Camadas retraídas; Canal da lesão preenchido por células do liquido celomático; Degeneração da epiderme e derme superficial. Aumento do número de fibroblatos.
2 dias	Grande número de fibroblastos ao longo da ferida. Inicio da secreção de colágeno pelos fibroblastos	Grande quantidade de células mórula acumuladas na hipoderme	Ferida permanece aberta; presença de fluido celômico e debris. Camada mais interna da ferida possui tecido **recém formado.** A vizinhança da ferida é infiltrada por um número considerável de esferulócitos (dois tipos)	Epiderme e derme superficial degeneradas; Início da fibrogênese
3 dias	Fechamento da epiderme dos dois lados	-	-	-
4 dias	Fibrogênese avançada	Migração de células epiteliais	-	Fibrogênese avançada. Grande quantidade de esferulócitos I.
6 dias	-	A ferida recoberta por uma nova camada epitelial	Acúmulo de matriz no canal da lesão.	-

(Continuação) Tabela 1. Resumo dos eventos registrados durante o processo de cicatrização em diferentes espécies de holotúrias.

8 dias	Observação de proliferação mitótica das células epiteliais	A área lesionada foi coberta por uma camada contígua de células epiteliais e cutícula. Início da cicatrização da derme. Pouco exudado ocupa o canal da lesão	-	-
10 dias	Fibrogênese completada	-	-	Fechamento da epiderme; Fibrogênese completada. Quantidade de celomócitos retorna a níveis próximos do controle.
12 dias	-	-	Junção da derme	-
15 dias	-	As faces da derme se fundem, mas com considerável distorção da sua arquitetura normal	-	Diferenciação da derme superficial e central
20 dias	-	-	Re-estabelecimento da arquitetura tecidual se assemelhando ao tecido em condições normais	-
28 dias	-	-	Restauração de todos os componentes teciduais.	(30 d) Restauração de todos os componentes teciduais.
50 dias	-	Apenas a derme superficial foi re-estabelecida	-	-

As observações em *H. grisea* mostraram um rápido processo de cicatrização. Quatro dias após a lesão a ferida já estava selada com uma nova camada de tecido conjuntivo, embora as regiões da derme ainda não estivessem bem diferenciadas. Este rápido processo de cicatrização é marcado principalmente pelo aumento do número de células no local. Estas têm origem dos tecidos adjacentes e principalmente do fluido celomático, migrando entre os tecidos até atingir o local lesionado. Estudos têm mostrado, através da marcação do núcleo das células, que celomócitos estão aptos a se movimentar livremente entre os tecidos a partir da cavidade do corpo (Cowden 1968, Ginanova 2007). Em *H. grisea* não foram detectados indícios de divisão celular, via figuras mitóticas ou pela formação de massas proliferativas, e a região adjacente parece estar envolvida apenas como via de passagem para o influxo dos celomócitos e células do tecido conjuntivo.

Em tecidos intactos de muitos equinodermos há, geralmente, um baixo nível de proliferação celular. Este nível aumenta consideravelmente apenas durante a regeneração de músculos e órgãos como árvores respiratórias, gônadas e intestino (Spirina & Dolmatov 2003). Isto reforça conclusões de que os processos de cicatrização e regeneração são diferenciados.

A parede do corpo de *H. grisea* possui basicamente quatro tipos celulares dispersos entre as fibras, dos quais alguns têm funções mais claramente reconhecíveis, *viz.* fibroblastos e amebócitos. Os fibroblastos são os mais numerosos, sendo descritos como idênticos morfologicamente e funcionalmente aos fibroblastos de vertebrados (Hyman 1955, Menton & Eisen 1970, Gurtner *et al.* 2008). São classificados comumente como componentes do tecido conjuntivo propriamente dito, sendo responsáveis por sintetizar e

secretar continuamente proteoglicanos, glicoproteínas e moléculas precursoras de vários tipos de colágeno (Kierszenbaum 2008). Em diferentes grupos de organismos, são recrutados durante a cicatrização para formar o esqueleto básico de colágeno para a recuperação da matriz extracelular (Tettamanti *et al.* 2004).

Em equinodermos, sugere-se que os fibroblastos sejam responsáveis pela maior parte da cicatrização do tecido conjuntivo. Em *S. badionotus* foi observado que participam da síntese de fibras de colágeno no segundo dia após uma lesão na parede do corpo (Cowden 1968). Em *T. briareus*, se acumulam na região lesionada, junto com esferulócitos, e participam do processo de fibrogênese (Menton & Eisen 1973). Em nenhum desses casos foram observados em divisão celular, indicando que essas células migram para a área da injúria a partir de regiões próximas. Em *H. grisea*, o rápido processo de fibrogênese se deu aparentemente a partir da migração dos fibroblastos da região da derme superficial, próxima ao epitélio. Após uma queda significativa dos seus números nas primeiras horas depois da lesão, devido à degeneração do epitélio e da derme superficial, sua densidade na região da ferida permanece constante ao longo do processo, sem a formação de agregados maiores.

Já os amebócitos são observados apenas na derme superficial nos organismos em condições normais, tanto em *H. grisea* como em outras espécies já estudadas (Menton & Eisen 1970). Porém, 12 horas após a injúria também foram observados na hipoderme e derme central. Diferentes papéis tem sido atribuídos a estas células: transporte de nutrientes (Smiley 1994), coagulação do fluído celomático, rejeição de enxertos (Smith 1971, Canicatti

1989), encapsulamento de partículas estranhas e microorganismos e na formação dos corpos marrons (Xing *et al.* 2008). Outras possíveis funções sugeridas podem ser ainda a remoção de restos celulares após a degeneração dos tecidos e a formação inicial de uma camada de células no local da injúria (Glinski & Jarosz 2000).

Em *H. grisea* o citoplasma dos amebócitos contém apenas inclusões pequenas, indiferenciadas e não organizadas, o que não sugere um papel de transporte importante. Sendo assim, as suas funções parecem estar vinculadas a remoção de detritos, como outros tipos celulares com características amebóides encontrados em diversos grupos, *e.g.* arqueócitos em Porifera (Simpson 1984) ou macrófagos em vertebrados. Estes são constituintes do tecido conjuntivo propriamente dito e possuem propriedades fagocitárias, geralmente migrando para locais de inflamação atraídos por mediadores. Entre as suas principais funções estão a reabsorção e degradação de componentes da matriz extracelular (Kierszenbaum 2008).

Além da presença de fibroblastos e amebócitos durante o período de cicatrização também foram observados dois tipos de esferulócitos. Estas células são facilmente identificadas pelo grande número de esférulas em seu citoplasma, sendo geralmente descritas como semelhantes aos mastócitos de vertebrados, tanto estrutural quanto funcionalmente (Cowden 1968, Ramirez-Gómez *et al.* 2010)

Geralmente são encontrados em dois ou mais tipos morfologicamente distintos (Hetzel 1963, Endean 1966, Byrne 1986, Canicatti 1989, Eliseikina & Margalanov 2002, Garcia-Arrarás *et al*. 2006, Miguel-Ruiz & García-Arrarás 2007, Ramirez-Gómez *et al.* 2010). Em holotúrias e equinóides, esferulócitos

ocorrem em todos os tecidos, entretanto sempre em baixas densidades nos organismos em condições normais (Jangoux 1987). No entanto, existem ainda muitas dúvidas a respeito das suas reais funções e variabilidade, dificultando assim sua correta identificação. Em geral diversos papéis lhes são atribuídos, tais como produção de antibióticos (Haug *et al.* 2002), citotoxicidade (Arizza *et al.* 2007), reações inflamatórias (Gross *et al.* 1999) e agregação e encapsulamento de debris (Jans *et al.* 1996). Alternativamente, outros estudos sugerem que suas vesículas tomam parte na produção de enzimas digestivas extracelulares (Massin 1980), ou podem ainda estocar nutrientes e participar na síntese de fatores humorais do sistema imune de equinodermos (Byrne 2005). Existem evidências que estas células participam ativamente da síntese de matriz extracelular, produzindo e/ou estocando precursores (mucopolissacarídeos - Byrne 1986, Garcia-Arrarás *et al.* 2006). Estudos mais antigos já descrevem a presença de esferulócitos entre as fibras do tecido conjuntivo durante o processo de cicatrização. Em *S. badionotus* estas células foram observadas durante a reconstrução da parede do corpo, mas não lhes foi atribuída nenhuma função específica no processo (Cowden 1968). Já em *T. briareus* e *Eupentacta quinquesemita*, foi observado um aumento no número de esferulócitos na região da hipoderme dentro de alguns minutos após a lesão e seu acúmulo na área afetada dois dias depois. Isto levou à sugestão de um papel na produção de tecido conjuntivo e substância amorfa (Menton & Eisen 1973).

Em *H. glaberrima* já foi observada a presença de dois tipos de esferulócitos durante a regeneração do intestino (Garcia-Arrarás *et al.* 2006). Um deles mostrou forte metacromasia quando corado com Azul de Toluidina e

o outro não reagia com este corante. Inicialmente foi sugerido que estas duas populações eram apenas os estágios de diferenciação de um único tipo. Células metacromáticas seriam imaturas e na medida em que se diferenciam, a composição das suas inclusões se altera e passam a ser fracamente coradas. Porém, dados mais recentes do mesmo grupo (Miguel-Ruiz & García-Arrarás 2007) questionaram esta interpretação inicial. Foi demonstrado que ambos os tipos celulares aumentam concomitantemente e migram para a área lesionada, sugerindo, portanto, que sejam duas populações distintas.

Em *H. grisea* duas populações de esferulócitos são observadas, tanto no fluido celômico como na parede do corpo. Em animais intactos são encontradas em baixa densidade entre as fibras do tecido conjuntivo, com o tipo II sempre em maior número, principalmente na hipoderme. Embora com morfologia geral semelhante, *i.e.* citoplasma carregado de inclusões homogêneas, ambas apresentam características citoquímicas e ultraestruturais bastante diferentes. Além disso, nos tecidos e no fluido celomático de todos os espécimes estudados não foram detectados estágios intermediários entre os dois tipos. Tal fato reforça a afirmação de que se tratam de populações diferentes, com funções distintas.

Diferentemente do observado em *H. glaberrima* (Miguel-Ruiz & García-Arrarás 2007), as duas populações de esferulócitos não aumentam concomitantemente após a lesão. Os esferulócitos I mostram aumento marcado apenas no terceiro/quarto dia, sendo praticamente limitado às dermes superficial e central. Por outro lado, já nas primeiras horas observa-se um aumento significativo dos esferulócitos II na região da hipoderme. Posteriormente este número decresce a níveis semelhantes ao do organismo

controle, se mantendo constante até o final do processo. Já que não foram observados sinais de divisão celular na área, provavelmente ambas as células são também provenientes do liquido celomático, e chegam à região lesionada utilizando a hipoderme como via de passagem. Em *A. japonicus* foi observado que a regeneração dos músculos é acompanhada pela migração a partir do epitélio celômico e da hipoderme da parede do corpo para o tecido conjuntivo (Ginanova 2007).

No quarto dia após a lesão os esferulócitos I e os fibroblastos são observados em maior número, tanto na derme superficial como na central, retornando a números semelhantes aos do organismo controle a partir do décimo dia. Neste mesmo período, observamos um alto índice de fibrogênese com novas fibras de colágeno preenchendo totalmente o canal da lesão. O primeiro esferulócito (tipo I) possui inclusões com forte afinidade pela Fucsina Ácida, mas nenhuma pelo Azul de Toluidina. Esta característica sugere que o conteúdo de suas inclusões seja composto por peptídeos (Gurr 1962). Pode ser que os esferulócitos tipo I não estejam ligados diretamente à síntese de matriz. É possível que tenham atuação indireta, fornecendo reservas a outras células, como os fibroblastos, já que aumentam no período onde ocorre maior síntese de matriz extracelular. Outra possível função seria de defesa química, contendo substâncias antibióticas/citotóxicas em suas inclusões. Neste caso, seus números deveriam aumentar já nos primeiros momentos após a lesão para uma ação mais eficiente, o que não foi observado.

A segunda população (tipo II) caracterizou-se pela afinidade ao Azul de Metila/Verde Luz presentes no Tricromo de Mallory, e uma forte metacromasia com o Azul de Toluidina. O fato de serem corados pelo Azul de Metila e o

Verde Luz do Tricromo de Mallory indica a presença de glicosaminoglicanos ácidos (Gurr 1962), e a reação metacromática com o Azul de Toluidina confirma a presença de proteoglicanos. Isto sugere fortemente a sua participação na produção de componentes da matriz extracelular, como ácido hialurônico ou heparina.

Um fato interessante é que entre as células coletadas do líquido celomático foram observados esferulócitos do tipo II em diferentes fases de diferenciação. Um processo semelhante também foi observado por Canicatti (1989) no liquido celomático de *H. polli*, onde células com esferulas em diferentes estágios de maturação apresentavam basofilidade dos grânulos diferente em cada estágio. No caso de *H. grisea* talvez a sequência de diferenciação observada sejam as diferentes fases da síntese de proteoglicanos, desde a produção dos glicosaminoglicanos e proteínas à junção destes para a formação dos proteoglicanos.

As alterações se assemelham ao processo de degranulação dos mastócitos de vertebrados, onde células imaturas apresentam grânulos com aparência uniforme e compacta. Em vertebrados, durante processos inflamatórios, essas células são recrutadas ao local afetado, o conteúdo das suas inclusões é então liberado (*degranulação*), e os vacúolos passam a apresentar uma aparência inchada com conteúdo disperso (Röhlich *et al.* 1971, Reite & Evensen 2006). Em *T. briareus* foi observado que células esferulosas acumulam próximas a região da lesão e degranulam ou simplesmente se rompem (Menton & Eisen 1973). O acumulo de esferulócitos na região lesionada pode ter outras finalidades além da secreção da matriz extracelular. Produtos da degranulação podem contribuir para ação dos fibroblastos (Smith

1971) ou atuar como agentes quimiotáticos, estabelecendo uma via para outras células que participam da regeneração (Byrne 1986). Substâncias produzidas pelos mastócitos de vertebrados têm potencial para afetar o microambiente do tecido conjuntivo. Tem sido mostrado que a histamina e heparina estimulam o crescimento de fibroblastos e a síntese de colágeno *in vitro*, contribuindo diretamente na fibrogênese pela produção glicoproteínas da matriz extracelular (Reite & Evensen 2006).

De acordo com os resultados obtidos com *H. grisea*, podemos afirmar que as duas populações participam do processo, mas atuam em momentos diferentes. Os esferulócitos tipo II estão muito provavelmente ligados à síntese da matriz extracelular. No entanto, ainda permanecem dúvidas a respeito do papel desempenhado pela população de esferulócitos I.

No sentido de caracterizar melhor a natureza química das inclusões, buscou-se isolar e concentrar as diferentes populações de esferulócitos. Diversos protocolos usuais para separação e concentração de células, por exemplo, gradiente de Sacarose e de Percoll em gradientes contínuos e descontínuos, foram testados, mas nenhum destes foi satisfatório. Por fim, o procedimento mais eficiente foi o isolamento das células através do método de separação por troca aniônica. Nesta metodologia foram utilizados grânulos, tipo gel, da resina fortemente básica *Amberlite IRA - 400 AR.* O processo consiste na troca de íons entre uma solução e a resina orgânica de troca iônica, por meio da qual íons selecionados são removidos da solução pela interação com a resina.

Este método é utilizado como um passo rotineiro na separação e identificação de moléculas e de bactérias (eg. Cornelissen *et al.* 2008, Guo

2009), e existe pelo menos um trabalho onde a resina foi utilizada como substrato para cultura *in vitro* de células de mamíferos (Himes 1987). Porém, ainda não havia sido empregado para separação de diferentes tipos celulares. A experiência com a separação de celomócitos se mostrou eficiente e prática, e superior a outros métodos comumente empregados. Experimentos com outros tipos celulares estão sendo realizados, de modo a estabelecer a eficiência e aplicabilidade do método.

A partir das frações celulares isoladas com a resina, foram iniciadas as análises por espectrometria de massa das populações de esferulócitos. Ainda preliminares, os resultados obtidos confirmam os diferentes conteúdos observados em microscopia, e que os esferulócitos II têm uma maior concentração de substâncias hidrofílicas. A complementação destas análises químicas deve mostrar a exata composição dos vacúolos, e confirmar a exata função destas células durante a regeneração.

Nossos resultados mostram que em *H. grisea,* os celomócitos possuem um papel fundamental na cicatrização. E os mesmos processos simples que são utilizados pela cicatrização estão presentes nos estágios iniciais da regeneração de estruturas complexas. A rápida cicatrização e regeneração observada em equinodermos indicam que estes eventos representam um componente essencial no ciclo de vida o qual possui ampla aplicação em estratégias de sobrevivência. Dado o seu valor adaptativo, tais processo podem ser responsáveis pelo grande sucesso dos equinodermos no ecossistema marinho (Candia-Carnevali 2006). O principal objetivo na pesquisa da regeneração em equinodermos é responder questões cruciais a respeito de como este processo é iniciado, quais genes são ativados ou reativados, qual a

origem das células envolvidas na reconstrução ou reparo de estruturas danificadas ou perdidas, e quais são os fatores que regulam estes processos. Tudo isso utilizando organismos simples que possuem muitas características que se conservaram em vertebrados superiores, tornando-os ótimos organismos modelos para estudos comparativos.

Referências

Acosta-Salmon, H. & Southgate, P.C. (2005) Wound healing after excision of mantle tissue from the Akoya pearl oyster *Pinctada fucata*. **Comp. Bioch Phys A.** 143: 264 - 268.

Agata, K.; Saito, Y. & Nakajima, E. (2007) Review.Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. **Develop Grow Differ.** 49: 73 - 78.

Arizza, V.; Giaramita, F.T.; Parrinello, D.; Cammarata, M. & Parrinello, N. (2007) Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. **Comp Bioch Phys A.** 147: 389 - 394.

Badylak, S.F. (2002) The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. **Sem Cell Develop Biol.** 13: 377 - 383.

Ballarin, L.; Cima, F. & Sabbadin. A. (1998) Phenoloxidase and cytotoxicity in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*. **Dev Comp Immunol.** 22: 479 - 492.

Behmer O.A.; Tolosa, E.M.C. & Freitas Neto, A.G. (1976) **Manual de técnicas de histologia normal e patológica**. EDART/EDUSP, São Paulo.

Bekkun, D.W. (2004). Phylogenetic aspects of tissue regeneration: role of stem cells. A concise overview. **Blood Cell Mol Dis.** 32: 11 - 16.

Bely, A.E. & Nyberg, K.G. (2010) Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. **Trends Eco Evo.** 25 (3): 161 - 170.

Biressi, A.C.M. Zou, T.; Dupont, S. Dahlberg, C.; Di Benedetto, C.; Bonasoro, F. ; Thorndyke, M. & Candia-Carnevali, M.D. (2010) Wound healing and arm regeneration in *Ophioderma longicaudum* and *Amphiura Wliformis* (Ophiuroidea, Echinodermata): comparative morphogenesis and histogenesis. **Zoomorphology**. 129:1 - 19.

Bolootian, R.A. & Giese, A.C. (1958) Coelomic Corpuscles of Echinoderms. **Biol Bull.** 115(1): 53 - 63.

Bonasoro, F.; Candia-Carnevali, M.D.; Thorndyke, M.C. & Welsch, U. (1995) Neural factors in crinoids arm regeneration. *In:* Emson, R.; Smith, A.B. & Campbell, A.C. (eds.). **Echinoderm Research.** Rotterdan, Balkema. p. 237- 243.

Bonasoro, F.; Candia-Carnevali, M.D.; Moss, C. & Thorndyke, M.C. (1998) Epimorphic versus morphallactic mechanisms in arm regeneration of crinoids and asteroids: pattern of cell proliferation/differentiation and cell lineage. *In:* Mooi, R. & Telford, M. (eds.) **Echinoderms**. San Francisco. Rotterdam: Balkema. p. 13 - 18.

Bonasoro, F.; Wilkie, I.C.; Bavestrello, G.; Cerrano, C. & Candia-Carnevali, M.D. (2001) Dynamic structure of the mesohyl in the sponge *Chondrosia reniformis* (Porifera, Demospongiae). **Zoomorphology**.121: 109 - 121.

Borges, J.C.S.; Jensch-Junior, B.E.; Garrido, P.A.G.; Mangiaterra, M.B.B.C.D & Silva, J.R.M.C. (2005) Phagocytic Amoebocyte Sub Populations in the Perivisceral Coelom of the Sea Urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). **J Exp Zool.** 303(A): 241- 248.

Brockes, J.P.; Kumar, A. & Velloso, C.P. (2001) Regeneration as an evolutionary variable. **J Anat.** 199: 3 - 11.

Brockes, J.P. & Kumar, A. (2005) Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. **Science** 310: 1919 - 1923.

Byrne, M. (1986) The fine structure of the morula cells of *Eupentacta quinquesemita* (Echinodermata: Holothuroidea) and their role in the maintenance of the extracellular matrix. **J Morph**.188: 179 - 189.

Byrne, M. (2001) The morphology of autotomy structures in the sea cucumber *Eupentacta quinquesemita* before and during evisceration. **J Exp Biol.** 204: 849 - 863.

Byrne, M. (2005) The ultrastructure of the morula cells of Eupentacta quinquesemita (Echinodermata: Holothuroidea) and their role in the maintenance of the extracellular matrix. **J Morphol** 40:179 – 189.

Candia-Carnevali, M.D.; Lucca E. & Bonasoro, F. (1994) Mechanism of arm regeneration in the feather star *Antedon mediterranea*: healing of wound and early stages of development. **J Exp Zool**. 267: 299 - 317.

Candia-Carnevali, M.D.C.; Bonasoro, F.; Patruno, M. & Thorndyke, M.C. (1998) Cellular and molecular mechanisms of arm regeneration in crinoid echinoderms: the potential of arm explants. **Dev Genes Evol** 208: 421 - 430.

Candia-Carnevali, M.D.C. & Bonasoro, F. (2001) Introduction to the Biology of Regeneration in Echinoderms. **Mic Res Tech.** 55: 365 - 368.

Candia-Carnevali, M. (2006) Regeneration in Echinoderms: repair, regrowth, cloning. **Invertebr Surviv J.** 3: 64 - 76.

Canicatti, C. (1989) The lytic system of *Holothuria polli* coelomic fluid and coelomocyte lysate. **Comp Biochem Physiol**. 96B(1): 145 - 148.

Carlson, B.M. (2007). **Principles of Regenerative Biology**. London: Elsevier. 379pp.

Cornelissen, E.R.; Moreau, N.; Siegers, W.G.; Abrahamse, A.J.; Rietveld, L.C.; Grefte, A.; Dignum, M.; Amy, G. & Wessels, L.P. (2008) Selection of anionic exchange resins for removal of natural organic matter (NOM) fractions. **Water Res.** 42: 413 - 423

Coteur, G.; Corrieri, N. & Dubois, P. (2004) Environmental factors influencing the immune responses of the common European starfish (*Asterias rubens*). **Fish Shellf Immun** 16:51 - 63.

Cowden, R.R. (1968) Cytological and Histochemical Observations on Connective Tissue Cells and Cutaneous Wound Healing in the Sea Cucumber *Stichopus badionotus*. **J Invert Path.** 10: 151 - 159.

Dolmatov, I.Y.; Eliseikina, M.G.; Bulgakov, A.A.; Ginanova, T.T.; Lamash, N.E. & Korchagin, V.P. (1996) Muscle regeneration in the holothurian *Stichopus japonicus.* **Roux's Arch Dev Biol.** 205: 486 - 493.

Dubois, P. & Ameye, L. (2001) Regeneration of Spines and Pedicellariae in Echinoderms: A Review. **Mic Res Tec.** 55: 427 - 437.

Dunham, P. & Weissman, G. (1986) Association of marine sponge cells induced by Ca pulses, Ca ionophores, and phorbol esters proceeds in the absence of external calcium. **Biochem Bioph Res Commun**.134: 1319 - 1326.

Dykstra, M.J. (1993) **A manual of applied techniques for biological electron microscopy**. Plennum Press, NY.

Eliseikina, M.G. & Margalanov, T. Y. (2002) Coelomocyte Morphology in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). **Rus J Mar Biol.** 28(3): 197 - 202.

Emson, R.H. & Wilkie, I.C. (1980) Fission and autotomy in echinoderms. **Oceanogr Mar Biol A Rev.** 18: 155 - 250.

Endean, R. (1958) The coelomocytes of *Holothuria leucospilota.* Quarterly **J Mic Sci**. 99(1): 47 - 60.

Endean, R. (1966) The coelomocytes and coelomic fluids. *In:* **Physiology of Echinodermata.** Ed. Boolootian, R.A. New York : Interscience Publishers. pp. 301 - 321.

Fankboner, P.V. (1978) Self-suturing by a synaptide sea cucumber (Holothuroidea: Echinodermata). **Cell Mol Life Sci**. 34(6) : 729 - 730.

Fontaine, C.T. & Lightner, D.V. (1973) Observations on the process of wound repair in penaeid shrimp. **J Inv Path**. 22: 23 - 33.

Galliot, B. & Schimid, V. (2002) Cnidarians as a model system for understanding evolution and regeneration. **Int. J Dev Biol.** 46: 39 - 48.

Garcia-Arrarás, J.E. & Greenberg, M.J. (2001) Visceral Regeneration in Holothurians. **Microsc Res Tech** 55: 438 - 451.

García-Arrarás, J.E.; Schenk, C.; Rodrígues-Ramírez, R.; Torres, I.I.; Valentín, G. & Candelaria, A.G. (2006) Spherulocytes in the Echinoderm *Holothuria glaberrima* and their involvement in intestinal regeneration. **Dev Dyn** 235: 3259 - 3267.

Ginanova, T.T. (2007) participation of the coelomic epithelium of the body wall in muscle regeneration in *Apostichopus japonicas* (Holothuroidea: Aspidochirota). **Rus J Mar Biol.** 33(6): 411 - 416.

Glinski, Z. & Jarosz, J. (2000) Review: Immune Phenomena in Echinoderms. **Arch Immunol Ther Exp**. 48: 189 - 193.

Goss, R.J. (1969). **Principles of Regeneration.** New York: Academic Press.

Gross, P.S.; Clow, L.A. & Smith, L.C. (1999) SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes. **Immunogenetics** 51: 1034 - 1044.

Guo, Z.; Liu, Y.; Li, S. & Yang, Z. (2009) Interaction of bacteria and ion-exchange particles and its potential in separation for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric identification of bacteria in water. **Rapid Commun Mass Spectrom**. 23: 3983 - 3993.

Gurr, E. (1962) **Staining Animal Tissue – Pratical and Theoretical**. London: Leonard Books.

Gurtner, G.C.; Werner, S.; Barrandon, Y. & Longaker, M.T. (2008) Wound repair and regeneration. **Nature**. 435: 314 - 321.

Halanych, K.M. (2004) The new view of animal phylogeny. **Annu Rev Ecol Evol Syst.** 35: 229 - 56.

Hart, M. (2002) Life history evolution and comparative developmental biology of echinoderms. **Evol & Dev.** 4(1): 62 - 71.

Haug, T.; Kjuul, A.K.; Styrvold, O.B.; Sandsdalen, E.; Olsen, M. & Stensvag, C. (2002) Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). **J Inv Pathol.** 81: 94 - 102.

Hendler, G.; Miller, J.E.; Pawson, D.L. & Kier, M.E. (1995) **Sea stars, sea urchins and allies: echinoderms of Florida and the Caribbean**. Smithsonian Institution Press, Washington. 230pp.

Hetzel, H.R. (1963) Studies on holothurian coelomocytes. I. A survey of coelomocyte Type. **Biol Bull.** 125**:** 289 - 301.

Himes, V. & Hu, W. (1987) Attachment and growth of mammalian cells on microcarriers with different ion exchange capacities. **Biotechnol Bioengin.** 29(9): 1155 - 1163.

Holstein, T.W.; Hobmayer, E. & Technau, U. (2003) Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? **Developl Dyn.** 226: 257 - 267.

Hyman, L. H. (1955). **The Invertebrates: Echinodermata**. The Coelomate Bilateria. McGraw-Hill Book Company. 763 pp.

Jagoux, M. (1987). Diseases of Echinodermata. IV. Structural abnormalities and general considerations on biotic diseases. **Dis Aquat Org.** 3: 321-229.

Jans, D.; Dubois, P. & Jangoux, M. (1996) Defensive mechanisms of holothuroids (Echinodermata): formation, role, and fate of intracoelomic brown bodies in the sea cucumber *Holothuria tubulosa*. **Cell Tissue Res.** 283: 99 - 106.

Kierszenbaum, A.L. (2008) **Histologia e Biologia Celular. Uma introdução à patologia**. Tradução 2ª Edição. Elsevier. 667 pp.

Lawrence, J. (1987) **A functional biology of echinoderms**. Johns Hopkins University press. 623 pp.

Louden, D.; Whalan, S.; Evans-Illidge, E.; Wolff, C.; & de Nys, R. (2007) An assessment of the aquaculture potential of the tropical sponges *Rhopaloeides odorabile* and *Coscinoderma* sp. **Aquaculture** 270(1-4): 57 - 67.

Martin, P. (1997) Wound Healing - Aiming for Perfect Skin Regeneration. **Science.** 276: 75.

Martoja, R. & Martoja, M. (1967) **Initiation aux Techniques de l'Histologie Animale**. Masson et Cie. 354 pp.

Massin, C. (1980) Morphologic fonctionnelle du tube digestif d*'Holothuria tubulosa* Gemlin (Echinodermata: Holothuroidea). *In:* **Echinoderms: present and past. Proc European Colloqium on Echinoderms**. Jangoux, M.J. (ed). Balkema, Rotterdam. 261 - 270 pp.

Matranga, V.; Pinsino, A.; Celi, M.; Natoli, A., Bonaventura, R.; Schroder, H.C. & Müller, W.E.G. (2005). Monitoring chemical and physical stress

using sea urchin immune cells. *In:* **Echinodermata**, Matranga, V. (ed.) Springer, Heidelberg. 85 - 110 pp.

Mendonça, R.J & Coutinho-Netto, J. (2009). Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol.** 84(3): 257 - 62.

Menton, D. N. & Eisen, A. (1970). The structure of the integument of the Sea cucumber, *Thyone briareus*. **J Morph.** 131: 17 - 36.

Menton, D. N. & Eisen, A. (1973). Cutaneous wound healing in the sea cucumber, *Thyone briareus*. **J Morphol**. 141: 185 - 204.

Meszaros, A. & Bigger, C. (1999) Qualitative and quantitative study of wound healing processes in the coelenterate,plexaurella fusifera:spatial, temporal, and environmental (Light Attenuation) Influences. **J Inv Pathol**. 73(3): 321 - 331.

Meyer, D.L. (1985) Evolutionary implications of predation on recent comatulid crinoids from the Great Barrier Reef. **Paleobiology** 11: 154 - 64.

Miguel-Ruiz, J.E.S. & García-Arrarás, J.E. (2007) Common cellular events occur during wound healing and organ regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. **BMC Dev Biol** 7: 115.

Mochii, M., Taniguchi, Y. & Shikata, I. (2007). Tail regeneration in the *Xenopus* tadpole. **Dev Growth Differ** 49: 155 - 161.

Muñoz-Chapuli, R.; Carmona, R.; Guadix, J.A.; Macías, D. & Pérez-Pomares, J.M. (2005). The origin of the endothelial cells: an evo-devo approach for the invertebrate/vertebrate transition of the circulatory system. **Evo Dev.** 7(4): 351 - 358.

Noble, P. B. (1970) Coelomocyte aggregation in *Cucumaria frondosa*: effect of ethylenediaminetetraacetate, adenosine, and adenosine nucleotides. **Biol Bull**. 139: 549 - 556.

Odintsova, N. A.; Dolmatov, I. Yu. & Mashanov, V. S. (2004) Regenerating holothurian tissues as a source of cells for long-term cell cultures. **Mar Bio.** 146: 915 - 921.

Patruno, M.; Thorndyke, M.C.; Candia-Carnevali, M.D.; Bonasoro, F. & Beesley, P. (2001) Changes in Ubiquitin Conjugates and Hsp72 Levels During Arm Regeneration in Echinoderms. **Mar Biotechnol.** 3: 4 - 15.

Pawson, D.L. (2007) Phylum Echinodermata. **Zootaxa**. 1668: 749 - 764.

Pinsino, A.; Thorndyke, M.C. & Matranga, V. (2007) Coelomocytes and post-traumatic response in the common sea star *Asterias Rubens.* **Cell Stress Chap.** 12(4): 331 - 341.

Ramirez-Gomez, F.; Aponte-Rivera, F.; Méndez-Castaner, L. & Garcia-Arrarás, J.E. (2010). Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns. **Fish Shell Immu** 29: 175 - 185.

Ratcliffe, N. A. & Rowley, A. F. (1981) **Invertebrate blood cells**. New York: Academic Press.

Reite, O.B. & Evensen, O. (2006). Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. **Fish Shell Immu** 20: 192 - 208.

Röhlich, P.; Anderson, P. & Uvnäs, B. (1971) Electron Microscope Observations on Compound 48/80-Induced Degranulation in Rat Mast Cells. **J Cell Biol**. 51: 465 - 483.

Roy, S. & Levesque, M. (2006) Limb regeneration in Axolotl: is it superhealing? **TSW Dev Embryo.** 1(1): 12 - 15.

Saló, E. & Baguñà, J. (2002) Regeneration in planarians and other worms: new findings, new tools, and new perspectives. **J Exp Zool.** 292: 528 - 539.

Sanchéz-Alvarado, A. (2000) Regeneration in the metazoans: why does it happen? **BioEssays** 22: 578 - 590.

Sanchéz-Alvarado, A. (2004) Regeneration and the need for simpler model organisms. **Phil Trans R Soc Lond B.** 359: 759 - 763.

Sanchéz-Alvarado, A. (2006). Planarian regeneration: Its End Is Its Beginning. **Cell.** 124: 241 - 245.

Simpson, T.L. (1984) **The cell biology of sponges**. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Smiley, S. (1994) Holothuroidea. *In:* Microscopic Anatomy of Invertebrates.Vol. 14: Echinoderrmata. Wiley-Liss, Inc.401 - 471.

Smith, G.N. (1971) Regeneration in the sea cucumber *Leptosynapta:* I. The process of regeneration. **J Exp Zool.** 177: 319 - 330.

Smith, L.C. & Davidson, E.H. (1992) The echinoid immune system and the phylogenetic occurrence of immune mechanisms in deuterostomes. **Immunol Today**. 13: 356–362.

Spirina, I.S. & Dolmatov, I.Y. (2003) Mitotic Activity in Tissues of the Regenerating Respiratory Tree of the Holothurian *Apostichopus japonicus* (Holothuroidea, Aspidochirota). **Rus J Mar Biol.** 29(2): 123 - 125.

Szulgit, G.K. & Shadwick, R.E. (2000) Dynamic mechanical characterization of a mutable collagenous tissue: response of sea cucumber dermis to cell lysis and dermal extracts. **J Exp Biol.** 203: 1539 - 1550.

Taupin, P. (2008) Electron microscopy of cell suspension. **Ann Microsc**. 8: 19 - 21.

Tettamanti, G.; Grimaldi, A.; Rinaldi, L.; Arnaboldi, F.; Congiu, T.; Valvassori, R. & Eguileor, M.(2004). The multifunctional role of fibroblasts during wound healing in *Hirudo medicinalis* (Annelida, Hirudinea). **Biol Cell.** 96: 443 - 455.

Theopold, U.; Schmidt, O.; Keneth, S. & Dushay, M.S. (2004). Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. **Trends Immunol.** 25 (6): 289 - 294.

Thorndyke, M.C. & Candia-Carnevali, M.D. (2001) Regeneration neurohormones and growth factors in echinoderms. **Can J Zool.** 79: 1171 - 1208.

Thurmond, F.A. & Trotter, J.A. (1996) Morphology and biomechanics of the microfibrillar network of sea cucumber dermis. **J Exp Biol.** 199: 1817 - 1828.

Trotter, J.A.; Lyons-Levi, G.; Thurmond, F.A. & Koob, T.J. (1995) Covalent composition of collagen fibrils from the dermis of the sea cucumber, *Cucumaria frondosa,*a tissue with mutable mechanical properties. **Camp Biochem Physiol.** 112(314): 463 - 478.

Trotter, J. A.; Chapman, J. A.; Kadler, K. E. & Holmes, D. F. (1998). Growth of sea cucumber collagen fibrils occurs at the tips and centers in a coordinated manner. **J Mol Biol.** 284: 1417 - 1424.

Tsonis, P.A. (2000) Regeneration in vertebrates. **Dev Biol.** 221(2): 273 - 284.

Ventura, C.R.R.; Lima, R.P.N.; Nobre, C.C.; Veríssimo, I. & Zama, P.C. (2006) Filo Echinodermata. *In:* **Biodiversidade bentônica da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira**. Lavrado, H.P. & Ignácio, B.L. (eds.). Museu Nacional, Rio de Janeiro, (Série Livros, 18), 389 pp.

Whitehead, G.G.; Makino, S.; Lien, C.L. & Keating, M.T. (2005) fgf20 is essential for initiating zebrafish fin regeneration. **Science** 310: 1957 - 1960.

Wiens, M. & Müller, W.E.G. (2006) Cell death in Porifera: Molecular players in the game of apoptotic cell death in living fossils. **Can J Zool.** 84(2): 307 - 321.

Wilkie, I.C. (2001) Autotomy as a Prelude to Regeneration in Echinoderms. **Mic Res Tech.** 55: 369 - 396.

Wilkie, I.C.; Parma, L.; Bonasoro, F.; Bavestrello, C.; Cerrano, C. & Candia-Carnevali, M.D. (2006) Mechanical adaptability of a sponge extracellular matrix: evidence for cellular control of mesohyl stiffness in *Chondrosia reniformis* Nardo. **J Exp Biol.** 209: 4436 - 4443.

Xing ,J. & Chia, F.S. (2000) Opsonin-like molecule found in the coelomic fluid of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota*. **Mar Biol** 136: 979 - 986.

Xing, K., Yang, H.S. & Chen, M.Y. (2008). Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicus*. **Aquat Biol.** 2: 85 - 92.

Figura 1. Quadro resumo da presença de processos regenerativos nos diferentes níveis de organização. Modificado de Bely & Nyberg 2010.

Figura 2. Principais formas de regeneração: Epimorfia e Morfalaxia. (A) Regeneração epimórfica de um membro de anfíbio. (B) Regeneração morfalática em *Hydra*. (Modificado de Agata *et al.* 2007).

Figura 3. Árvore filogenética mostrando a relação entre Echinodermata e outros grupos animais (Segundo Halanych 2004).

Figura 4. *Holothuria grisea,* espécie de pepino-do-mar comum em todo o litoral brasileiro. Caracterizada por uma parede do corpo espessa, com presença de pequenas verrugas e pés ambulacrais concentrados na região dorsal. Geralmente é encontrada na região entre marés entre pedras e enterrada no sedimento (Foto: Patrícia Lacouth).

Figura 5. (A) Desenho esquemático mostrando a região onde foi realizada a lesão. (B, C) Esquema de um corte transversal de *H. grisea* mostrando a organização dos tecidos da parede do corpo.

Figura 6. Esquema das regiões onde as células foram quantificadas. (A) Lâmina contendo os cortes histológicos seriados. (B) Regiões da parede corporal usadas para as contagens de células.

Figura 7. Fotomicrografias da parede do corpo de *H. grisea*, coradas com T. de Mallory. (A) Visão geral mostrando epiderme, derme superficial e derme central em condições normais. (B) Detalhe da epiderme e da derme superficial em condições normais, onde se observa a presença de amebócitos e fibroblastos. (C) Detalhe da hipoderme em condições normais, com presença de esferulócitos I e II. (D) Visão geral da área 12h após a lesão, mostrando o canal formado. (E) Canal da lesão após 12h, sendo invadido por celomócitos. (F) Esferulócitos tipo II e fibroblastos entrando no canal da lesão com 12h. (*ds*: derme superficial; *dc*: derme central; *ep*: epiderme; *fib*:

fibroblastos; *amb*: amebócito; *esfI:* esferulócito I; *esfII*; esferulócito II; *: canal da lesão).

Figura 8. Fotomicrografias da parede do corpo lesionada de *H. grisea* . (A) Visão geral da área lesionada após um dia. (B) Detalhe da degeneração da área epiderme e derme superficial após um dia, mostrando a presença de esferulócitos II nesta área. (C) Canal da lesão após um dia sendo preenchido por celomócitos. (D) Visão geral da área lesionada com dois dias, mostrando uma área de degeneração na epiderme e derme superficial. (E) Canal da lesão após dois dias sendo possível observar novas fibras de colágeno. (F) Esferulócitos II na hipoderme dois dias após a lesão (*fib*: fibroblastos; *esfI:* esferulócito I; *esfII*; esferulócito II *: canal da lesão).

Figura 9. Fotomicrografias da parede do corpo de *H. grisea*, quatro dias após a lesão, coradas com Tricromo de Mallory. (A) Visão geral da cicatrização da ferida. (B) Epitélio e derme superficial degenerados. (C) Novas fibras de colágeno preenchendo o canal da lesão. (D) Esferulócitos I e II na hipoderme (*esfI*: esferulócito I; *esfI*I: esferulócito II; *: canal da lesão.

Figura 10. Fotomicrografias do processo de cicatrização em *H. grisea* 10 dias (A, B e C) e 15 dias (D, E e F) após a lesão. (A) Visão geral da região lesionada 10 dias depois da lesão. (B) Detalhe da formação de uma nova camada de células epiteliais. (C) Detalhe da presença de fibras de colágeno orientadas perpendicularmente às fibras antigas. (D) Visão geral da região lesionada 15 dias após a lesão. (E) Reorganização do epitélio e da derme superficial. (F) Canal da lesão completamente fechado pelas fibras de colágeno. *ep*: epiderme; *: canal da lesão.

Figura 11. Fotomicrografia da parede do corpo de *H. grisea*, 30 dias após a lesão. Ainda é possível perceber onde a lesão foi realizada, porém todos os tecidos que compõe a região estão reestruturados na área da

ferida. (*ep*: epiderme; *ds*: derme superficial; *dc*:derme central; *hip*: hipoderme; *: Canal da lesão)

Figura 12. Gráfico da dinâmica das populações de fibroblastos, amebócitos e esferulócitos I e II na derme superficial ao longo dos 30 dias após a lesão

Figura 13. Gráfico da dinâmica das populações de fibroblastos, amebócitos e esferulócitos I e II na derme central ao longo dos 30 dias após a lesão.

Figura 14. Gráfico da dinâmica das populações de fibroblastos, amebócitos e esferulócitos I e II na hipoderme ao longo dos 30 dias após a lesão.

Figura 15. Esferulócitos observados no liquido celomático de *H. grisea*. (A) Esferulócito I corado com Tricromo de Mallory e (B) Azul de Toluidina. (Escala: 2 µm).

Figura 16. Esferulócitos observados no liquido celomático de *H. grisea*. Diferentes estágios de diferenciação do esferulócito II. (A-D) Corados com Tricromo de Mallory e (E-H) corados com Azul de Toluidina. n= núcleo (Escala: 2 µm).

Figura 17. Fotos de microscopia eletrônica de transmissão dos esferulócitos encontrados no líquido celomático de *H. grisea*. (A) Esferulócito I. (B) Esferulócito II. *n:* núcleo.

Figura 18. Foto em microscopia de luz mostrando celomócitos ligados aos grânulos de resina. A seta branca indica o grânulo de resina e a seta vermelha mostra os celomócitos ligados ao grânulo.

Figura 19. Foto em microscopia de luz de citocentrifugados feitos com as frações coletadas, após a separação das células por troca aniônica, e corados com Tricromo de Mallory. (A) Fração 1 contendo os esferulócitos I indicados pelas setas brancas. (B) Fração 3 contendo os esferulócitos II apontados pelas setas pretas.

Figura 20. Perfis obtidos no HPLC dos extratos com substâncias de massa maior que 30kDa.

Figura 21. Perfis obtidos no HPLC dos extratos com substâncias de massa entre 10kDa e 30kDa.

Figura 22. Perfis obtidos no HPLC dos extratos com substâncias de massa menor que 10kDa.

Figura 23. Espectometria de massas do conteúdo dos esferulócitos I, mostrando as substâncias que ocorrem exclusivamente nesta população de células.

Figura 24. Espectometria de massas do conteúdo dos esferulócitos II, mostrando as substâncias que ocorrem exclusivamente nesta população de células.

Figura 25. Desenho esquemático resumindo os principais eventos que ocorreram durante o processo de cicatrização em *H. grisea*. (A) Organização da parede do corpo antes da injúria, mostrando a cutícula, a epiderme, as três camadas que formam o tecido conjuntivo (*Ds*: derme superficial, *Dc*: derme central e *Hp*: Hipoderme) e a distribuição dos tipos celulares. Os amebócitos estão restritos à região da derme superficial e esferulócitos II se concentram na hipoderme. (B) Parede do corpo 12 horas após a lesão. Não ocorrem mudanças até este período e a ferida continua aberta. (C) Vinte e quatro horas após a lesão, há uma contração da parede do corpo, fechando a ferida. Amebócitos já são observados na hipoderme e derme central, evidenciando sua possível origem a partir do liquido celomático, também é observada uma zona de degeneração (*DZ*) na região da epiderme e derme superficial, com participação ativa dos amebócitos fagocíticos. Celomócitos, principalmente esferulócitos II, estão presentes no canal da lesão. (D) Quatro dias após a injúria já há a presença de matriz extracelular e fibras de colágeno no canal da lesão. Neste período o número de esferulócitos I aumenta e estes se

distribuem nas três camadas do tecido conjuntivo e na lesão. O número de fibroblastos na derme superficial também aumenta. (E) No décimo dia a epiderme foi reconstituída e o canal da lesão selado com nova matriz extracelular e fibras de colágeno. No entanto, estas estão organizadas perpendicularmente às fibras dos tecidos normais, e não é possível observar a diferenciação entre as camadas do tecido conjuntivo. Porém a ferida está completamente cicatrizada.

Tabela 1. Resumo dos eventos registrados durante o processo de cicatrização em diferentes espécies de holotúrias.

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

HEPES – Ácido Hidroxietil-piperazineetasulfonico

HPLC – Cromatografia Liquida de Alta Performance.

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfóxido

Tris-HCl – Tris-Hidrocloreto