DÉBORA ALVARES LEITE FIGUEIREDO

EFEITO DA ACIDIFICAÇÃO DA ÁGUA DO MAR NO SISTEMA IMUNE E NO BALANÇO ÁCIDO-BASE DE OURIÇOS-DO-MAR *LYTECHINUS VARIEGATUS* (LAMARCK, 1816) E *ECHINOMETRA LUCUNTER* (LINNAEUS, 1758).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Titulo de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

DÉBORA ALVARES LEITE FIGUEIREDO

EFEITO DA ACIDIFICAÇÃO DA ÁGUA DO MAR NO SISTEMA IMUNE E NO BALANÇO ÁCIDO-BASE DE OURIÇOS-DO-MAR *LYTECHINUS VARIEGATUS* (LAMARCK, 1816) E *ECHINOMETRA LUCUNTER* (LINNAEUS, 1758).

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Titulo de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

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

Versão Original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Figueiredo, Débora Alvares Leite.
Efeito da acidificação da água do mar no sistema imune e no balanço ácido-base de ouriços- do - mar Lytechinus variegatus (Lamarck, 1816) e Echinometra lucunter (Linnaeus, 1758) / Débora Alvares Leite Figueiredo. -- São Paulo, 2014.

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Histofisiologia Evolutiva.

Versão do título para o inglês: Effects of seawater acidification in the immune system and acid-base balance in sea urchin Lytechinus variegatus (Lamarck, 1816) and Echinometra lucunter (Linnaeus, 1758).

1. Acidificação oceânica 2. Mudanças climáticas 3. Ouriços-do-mar 4. Imunidade inata 5. Lytechinus variegatus 6. Echinometra lucunter I. Silva, Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB033/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Débora Alvares Leite Figueiredo.

Título da Dissertação: Efeito da acidificação da água do mar no sistema imune e no balanço ácido-base de ouriços- do - mar Lytechinus variegatus (Lamarck, 1816) e Echinometra lucunter (Linnaeus, 1758) .

Orientador(a): Prof. Dr. Jose Roberto Machado Cunha da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **481/11** referente ao projeto intitulado: "*Efeito da acidificação da água do mar no sistema imune ouriços-do-mar Lytechinus variegatus (Lamarck,1816) e Echinometra lucunter (Linnaeus, 1758)*" sob a responsabilidade de **Débora Alvares Leite Figueiredo,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 20 de setembro de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, Luiz e Sueli, à minha irmã Beatriz e aos meus avós Eulália e Antônio (In memoriam) pela dedicação, carinho e apoio; por me darem força e me incentivar sempre a estudar e a aprender.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva, pela oportunidade, orientação, por confiar em mim e no meu trabalho; por permitir que eu devolvesse minha autonomia e por tudo que tem me proporcionado e ensinado desde a iniciação científica.

Ao Prof. Dr. João Carlos Shimada Borges, por me apresentar ao Laboratório de Histofisiologia Evolutiva, também por confiar em mim e no meu trabalho desde a iniciação científica. Por todos os ensinamentos, pela amizade e por todas as inúmeras vezes que me socorreu no CEBIMar quando precisei.

À Paola Cristina Branco, por toda a ajuda desde as etapas iniciais deste projeto, sem ela este trabalho não teria saído do papel. Agradeço por confiar na minha capacidade e no meu trabalho; por abraçar este projeto e por tudo que me ensinou desde a minha chegada ao laboratório. Por me atender, mesmo nos fins de semana, sempre que batia o desespero e por acreditar que tudo iria dar certo. Obrigada de coração por tudo que fez por mim e pela amizade de todos os momentos!

Aos colaboradores deste trabalho, Paola Cristina Branco, Douglas Amaral dos Santos, Andrews Krupinski Emerencaino, Renata Stecca Iunes e João C. Shimada Borges, por todas as sugestões e ajuda, pela amizade, pelas risadas e por todas as noites não dormidas durante a padronização dos experimentos no CEBIMar.

Aos técnicos do Centro de Biologia marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar-USP) Alex, Eduardo, Elso, Joseilto, e Joseph (In memorian), por toda ajuda durante os experimentos, por todas as coletas, os cafés e conversas nos intervalos entre um experimento e outro.

Aos secretários Simone, Graça, Emerson e a todos os funcionários do CEBIMar–USP pela ajuda “burocrática” e pela companhia em todas as inúmeras estadias.

Ao Professor Álvaro Esteves Migotto pelo uso do microscópio durante os experimentos no CEBIMar-USP.

À Técnica de laboratório Emilia Ribeiro que tão gentilmente me acolheu quando cheguei ao laboratório, por toda à ajuda, amizade em todos esses anos e pelas milhares e milhares de vezes que salvou o dia!

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Marcio Custódio, Prof. Pedro Ismael da Silva Jr e Prof. Fábio Siviero pelas sugestões e correções.

Aos docentes do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, em especial ao Prof. Jarbas Bauer que tão carinhosamente me “adotou”. Por seus ensinamentos, seu amor e dedicação ao ensino.

Ao Prof. John M. Lawrence pelas observações, sugestões e dicas valiosas para a confecção e discussão deste manuscrito.

Aos colegas do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva: Alfonso, Andrews, Camila, Gabriel, Iury, Joana, João, Karina, Leandro, Ligia, Luciana, Paola, Paula, Renan, Renata, Ricardo, Tania e Yoel pela amizade, apoio, presença e pelos momentos de risadas e descontração.

À comissão organizadora do II Curso de Verão em Biologia Celular e do desenvolvimento do ICB-USP, Prof Fábio, Eloisa, Tatiana, Paola, Felipe, Ambart e Juliane por todos os momentos, por tudo que desenvolvemos e aprendemos.

Aos secretários do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Regina, Celiana e Paulo pela ajuda nesses dois anos e meio.

Aos funcionários da biblioteca e a todos os funcionários do ICB.

Aos colegas de departamento: Luciana, Fábio, Felipe, Eloisa, Tatiane, Maraysa e a todos os que me acompanharam durante o mestrado, pela companhia, apoio e por todas as conversas e risadas na copa.

À todos do laboratório de Química de Proteínas – CAT – Instituto Butantan, pela oportunidade, apoio, ajuda, pelos ensinamentos e pela companhia.

À Prof. Dr. Maria Martha Bernardi, por me apresentar à pesquisa e ao mundo científico, pelo entusiasmo que sempre demonstrou pela pesquisa e que sempre me inspirou.

À Professora Ana Cristina Pomarico por tudo que me ensinou, por confiar no meu trabalho e por apoiar e incentivar o desenvolvimento deste projeto. Agradeço pelas inúmeras vezes que permitiu que eu me ausentasse nas coletas e nos congressos, pela amizade e por tudo que me ensinou no Colégio Joana D’Arc.

Aos diretores e coordenadores do Colégio Joana D’Arc por compreender e permitir a minha ausência durante as coletas e congressos.

Aos amigos Ana Carolina, Juliana, Valeria, Luciana e Renato pelo apoio, incentivo, por todos os nossos momentos de risadas e pelas dificuldades que enfrentamos juntos, tanto na faculdade como na Pós Graduação.

Aos meus pais Luiz e Sueli, à minha irmã Beatriz e aos meus avós Antônio (In memoriam) e Eulália, pela dedicação e carinho, por estarem sempre comigo

me apoiando, torcendo e sempre me incentivando a fazer o meu melhor; mesmo sem entender muito bem o mundo da Pós Graduação.

Ao meu namorado Douglas Amaral por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, pela paciência, por apoiar minhas decisões, pelos conselhos e ajuda em todos os momentos. Por me manter sempre com os pés no chão e pelo senso de realidade (que tantas vezes precisei), sempre presente.

Aos familiares e amigos pelo apoio e carinho e a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.

Chico Xavier

RESUMO

Figueiredo DAL. Efeito da acidificação da água do mar no sistema imune e no balanço ácido-base de ouriços- do - mar *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) e *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758). [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A acidificação oceânica, resultante do aumento da concentração de CO_2 atmosférico, vem alterando a química dos oceanos resultando na diminuição de seu pH. Diversos estudos avaliaram as consequências dessa diminuição no pH oceânico nas taxas de calcificação, reprodução e desenvolvimento em diversos modelos marinhos, entretanto estudos relacionados a outros processos fisiológicos, como a imunidade, e estudos com indivíduos adultos são escassos. Ouriços-do-mar são espécies aderidas ao substrato, importantes para a ciclagem de nutrientes no ambiente marinho, sendo também animais utilizados como bioindicadores para monitoramento ambiental; assim o estudo da resposta imune inata desses animais frente à acidificação dos oceanos é de extrema importância para prever possíveis alterações fisiológicas desses animais e sua capacidade de adaptação. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as alterações provocadas pela acidificação oceânica na resposta imune e no balanço ácido – base de duas espécies de ouriço-do-mar tropicais: *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* durante as estações de verão e inverno; para isso foram analisados os índices fagocíticos, a capacidade de adesão e espraiamento celular dos amebócitos fagociticos além do balanço acido – base do liquido celomático após o período de 24 horas e cinco dias de exposição aos pHs 7,6 e 7,3. Foi também avaliada a capacidade de recuperação dessas espécies com o objetivo de verificar se os parâmetros alterados pela exposição conseguiam ser reestabelecidos. Os resultados mostraram que a redução no pH da água do mar alterou a proporção celular, reduziu a capacidade de fagocitose e espraiamento dos amebócitos fagocíticos assim como também afetou o balanço ácido-base do líquido celomático. Foram encontradas diferenças também entre as estações do ano sendo estas encontradas apenas na espécie *Lytechinus variegatus*. O teste de recuperação

mostrou que os parâmetros alterados pela exposição tendem a retornar aos valores controles, mostrando que em curto prazo essas alterações podem não ser irreversíveis, entretanto, mais estudos são necessários principalmente avaliando períodos de exposição prolongados. Juntos nossos resultados mostram que a acidificação oceânica prejudica parâmetros imunes extremamente importantes para a eliminação de patógenos e consequentemente a sobrevivência desses animais em um futuro oceano acidificado.

Palavras-chave: Acidificação oceânica. Mudanças climáticas. Ouriços-do-mar. Imunidade inata. *Lytechinus variegatus. Echinometra lucunter*.

ABSTRACT

Figueiredo, DAL. Effects of seawater acidification in the immune system and acid-base balance in sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) and *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758). [Master thesis (Tissue and cellular Biology)]. São Paulo: Instituto de ciências biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Ocean acidification due to increased atmospheric CO2 concentration is altering ocean chemistry resulting in the decrease of its pH. Several studies evaluated the effects of this decrease in ocean pH on calcification rates, reproduction and development in different marine models, however studies related to other physiological processes such as immunity and studies with adult animals are scarce. Sea urchins are species adhered to the substrate, important for nutrient cycling in the marine environment, also being used as bioindicators for environmental monitoring. Thus the study of the innate immune response of these animals due to the acidification of the oceans is extremely important to predict possible physiological changes of these animals and their ability to adapt to this condition. This study aimed to evaluate the changes caused by ocean acidification in the immune response and in the acid-base balance of two sea urchin tropical species: *Lytechinus variegatus* and *Echinometra lucunter* during seasons of summer and winter; for this, indexes of phagocytosis, cell adhesion and spreading ability were analized in addition to the acid-base balance of the coelomic fluid after 24 hours and five days of exposure to pH 7.6 and 7.3The recover ability of these species were also evaluated in order to verify if the parameters altered by exposition could be reestablished. The results shows that a reduction in the seawater pH changed the cell proportion, reduced the ability of phagocytosis and phagocytic amoebocyte spreading as well as affected the acid-base balance of the coelomic fluid. Differences were also found between seasons, but only in the specie *Lytechinus variegatus*. The recovery test showed that the parameters altered by exposure tend to return to control values, showing that in the short term these changes may not be irreversible, however, further studies are necessary mainly those related to

prolonged periods of exposure. Together our results show that ocean acidification impairs immune parameters extremely important for the elimination of pathogens and consequently the survival of these animals in a future acidified ocean.

Keywords: Ocean acidification. Climate change. Innate immunity. Sea urchin. *Lytechinus variegatus. Echinometra lucunter.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Interações entre o CO_2 e a água do mar.....24

Figura 2- pH da superfície oceânica.....25

Figura 3- Anatomia interna de um ouriço do mar 28

Figura 4- Celomócitos do ouriços-do-mar *Paracentrotus lividus* 29

Figura 5- Etapas do processo de fagocitose 31

Figura 6- Ouriços-do-mar das espécies *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter.* 35

Figura 7- Controlador automático de pH 36

Figura 8- Delineamento experimental.....37

Figura 9- Teste de viabilidade fúngica.....39

Figura 10- Proporção dos tipos celulares da espécie *Lytechinus variegatus* após exposição à águas acidificadas durante o inverno 44

Figura 11- Proporção dos tipos celulares da espécie *Echinometra lucunter* após exposição à águas acidificadas durante o inverno 45

Figura 12- Capacidade fagocítica das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o período de inverno.....46

Figura 13- Fagocitose observada sob microscopia de fase. 47

Figura 14- Índice fagocítico das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos a águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o período de inverno.....48

Figura 15- Valores de pH do liquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o período de inverno.....50

Figura 16- Proporção dos tipos celulares da espécie *Lytechinus variegatus* após exposição à águas acidificadas durante o verão 54

Figura 17- Proporção dos tipos celulares da espécie *Echinometra lucunter* após exposição à águas acidificadas durante o verão. 55

Figura 18- Capacidade fagocítica das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o verão. 56

Figura 19- Índice fagocítico das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o verão. 57

Figura 20- Valores de pH do liquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o verão. 59

Figura 21- Área de espraiamento celular da espécie *E. lucunter* após exposição à águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias. 61

Figura 22- Celomócitos da espécie *L. variegatus* (A, B e C) e *E. lucunter* (D, E e F) expostos por 24 horas e cinco dias ao pH 7,3, fotografados após período de espraiamento de 60 minutos. 62

Figura 23- Área de espraiamento celular das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o verão. 63

Figura 24- Proporção dos tipos celulares da espécie *Lytechinus variegatus* expostos à águas acidificadas durante o verão e o inverno.. A- Amebócitos fagociticos, B- Esferulócitos incolores, C- Esferulócitos vermelhos e D- Células vibráteis. 65

Figura 25- Proporção dos tipos celulares da espécie *Echinometra lucunter* expostos à águas acidificadas durante o verão e o inverno.. A- Amebócitos fagociticos, B- Esferulócitos incolores, C- Esferulócitos vermelhos e D- Células vibráteis. 66

Figura 26- Capacidade fagocítica das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas durante o verão e o inverno. 67

Figura 27- Índice fagocítico das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas durante o verão e o inverno 68

Figura 28- pH do líquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas durante o verão e o inverno. 69

Figura 29- Proporção dos tipos celulares da espécie *Lytechinus variegatus* após exposição à águas acidificadas e após o período de recuperação. A- Amebócitos fagociticos, B- Esferulócitos incolores, C- Esferulócitos vermelhos e D- Células vibráteis. 72

Figura 30- Proporção dos tipos celulares da espécie *Echinometra lucunter* após exposição à águas acidificadas e após o período de recuperação. A- Amebócitos fagociticos, B- Esferulócitos incolores, C- Esferulócitos vermelhos e D- Células vibráteis. 73

Figura 31- Capacidade fagocítica das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período cinco diase após período de recuperação, também de cinco dias. 75

Figura 32- Índice fagocítico das espécies *Lytechinus variegatus* (A) *e Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período cinco dias e após período de recuperação, também de cinco dias. 76

Figura 33- Valores de pH do liquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período de cinco dias e após período de recuperação, também de cinco dias.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Capacidade fagocítica (CF) dos ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* expostos a águas com diferentes pHs durante o período de inverno. 43

Tabela 2- Valores de pH do líquido celomático das espécies Lytechinus variegatus e *Echinometra lucunter* analisados após exposição à águas com diferentes pHs durante o inverno. Os valores são apresentados em média e desvio padrão. 49

Tabela 3- Proporção dos diferentes tipos celulares encontrados no liquido celomático de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* após exposição a águas com diferentes pHs durante o verão. Valores apresentados como média e desvio padrão. 51

Tabela 4- Capacidade fagocítica (CF) dos ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* expostos a águas com diferentes pHs durante o período de verão. Os valores são apresentados em média e desvio padrão. 53

Tabela 5- Valores de pH do líquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* analisados após exposição à águas com diferentes pHs durante o verão. 58

Tabela 6- Área de espraiamento dos amebócitos fagocíticos após 60 minutos de incubação em câmara úmida. 60

Tabela 7- Proporção dos diferentes tipos celulares encontrados no liquido celomático de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* após exposição a águas com diferentes pHs e após período de recuperação durante o verão. Valores apresentados como média e desvio padrão.....71

Tabela 8- Capacidade fagocítica (CF) dos ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* expostos a águas com diferentes pHs e após período de recuperação durante o período de verão 74

Tabela 9- Valores de pH do líquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* analisados após exposição à águas com diferentes pHs durante o verão. 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO_2	dióxido de carbono
CO_3^{-2}	carbonato
DIC	dissolved Inorganic Carbon (Carbono inorgânico dissolvido)
H_2CO_3	ácido carbônico
HCO_3^-	bicarbonato
IF	Índice fagocítico
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change (Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas)
ppm	partes por milhão
ups	unidade prática de salinidade

LISTA DE SÍMBOLOS

%	sinal matemático indicativo de porcentagem
µl	microlitros
µm	micrometro
mL	mililitro
mm	milímetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 23

1.1 Ouriços-do-mar 26

1.2 Imunidade inata 30

2 OBJETIVO 33

3 MATERIAIS E MÉTODOS 34

3.1 Coleta dos animais 34

3.2 Parâmetros físico-químicos da água do mar do biotério marinho 34

3.3 Variação do pH 35

3.4 Delineamento experimental 35

3.5 Contagem de celomócitos e leveduras 37

3.6 Análise de viabilidade celular 38

3.7 Teste de viabilidade fúngica 38

3.8 Ensaios de fagocitose in vitro 39

3.8.1 Índices de fagocitose 39

3.9 Análise de variação do pH do líquido celomático 40

3.10 Determinação da capacidade de adesão celular 40

3.11 Determinação da capacidade de espraiamento celular 40

3.12 Determinação da área de espraiamento celular 41

3.13 Teste de recuperação 41

3.14 Análise estatística 41

4 RESULTADOS 42

4.1 Experimento Inverno 42

4.1.1 Contagem diferencial dos celomócitos 42

4.1.2 Viabilidade celular e viabilidade fúngica 42

4.1.3 Índices fagocíticos 42

4.1.4 pH do líquido celomático 49

4.2 Experimento verão 51
4.2.1 Contagem diferencial dos celomócitos 51
4.2.2 Viabilidade celular e viabilidade fúngica 52
4.2.3 Índices fagocíticos 52
4.2.4 pH do líquido celomático 58
4.2.5 Capacidade de adesão e espraiamento celular 60
4.3 Verão X Inverno 64
4.4 Teste de recuperação 70
4.4.1 Contagem diferencial dos celomócitos 70
4.4.2 Índices fagocíticos 74
4.4.3 pH do líquido celomático 77
5 DISCUSSÃO 79
6 CONCLUSÃO 86
REFERÊNCIAS 87
ANEXO A: New insights into innate immune system of sea urchin: coelomocytes as biosensors for environmental stress 93

1 INTRODUÇÃO

As ações antropogênicas vêm causando alterações profundas na natureza, o aumento da concentração de CO_2 na atmosfera, por exemplo, está intimamente relacionado à mudanças na química dos oceanos. Desde a revolução industrial, a concentração de dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera vem aumentando consideravelmente (Kurihara et al., 2004a; Moulin et al., 2011), sendo este produzido em quantidades substanciais principalmente a partir da combustão de combustíveis fósseis, produção de cimento, agricultura e o desmatamento (Royal Society,. 2005; IPCC 2007).

Nos últimos 200 anos, os oceanos já absorveram cerca da metade do CO_2 produzido pelo homem. (Royal Society 2005). O CO_2 atmosférico se difunde passivamente na superfície do oceano, após a difusão ele reage com a água do mar formando ácido carbônico (H_2CO_3), essa molécula pode se dissociar liberando íons H^+ e bicarbonato (HCO_3^-), reações de dissociação podem ainda ocorrer com esta ultima molécula liberando novamente H^+ e formando CO_3^{2-} (Figura1), o acúmulo de íons H^+ e $H_2CO_3^-$, resultam na redução do pH da água do mar (Miles et al., 2007; Kurihara et al., 2004a), que é conhecida como acidificação oceânica. Ademais a concentração de carbonato (CO_3^{2-}) diminui, pois essas moléculas reagem formando HCO_3^- para tentar estabilizar o pH oceânico (Fabry et al., 2008), essa diminuição de CO_3^{2-} afeta diretamente organismos que utilizam essa substância na formação de suas conchas, carapaças e esqueleto.

De acordo com o último relatório publicado pelo IPCC (2007), medidas diretas e indiretas confirmam que o CO_2 atmosférico aumentou globalmente em cerca de 100 ppm ao longo dos últimos 250 anos, de uma taxa de 275-285 ppm na era pré-industrial para 379 ppm em 2005; e que o pH da superfície do oceano diminuiu 0,1 desde a era pré industrial (Caldeira, Wickett 2003), estando previsto para diminuir 0,3 a 0,4 até 2100 e 0,7 até 2300 (Caldeira, Wickett 2003; IPCC 2007). Essa redução de 0,1 unidades corresponde a um aumento de aproximadamente 30% na concentração de íons H^+.

Figura 1 – Interações entre o CO_2 e a água do mar.

Atmosfera		Era Glacial	Pré - Industrial	Atual
CO_2	[] pCO_2	180	280	380
$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$	[] H_2CO_3	7	9	13
$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$	[] HCO_3^-	1666	1739	1827
$HCO_3^- \rightleftharpoons H^+ + CO_3^-$	[] CO_3^-	279	222	186
	[] DIC	1952	1970	2026
Oceano	pH	8,32	8,16	8,05

Reações químicas entre o CO_2 e água, concentração dos diversos compostos formados e do pH do oceano nas eras glacial, pré-industrial e atual. É possível observar que ao longo do tempo, a concentração de H_2CO_3 e HCO_3^- aumentou, enquanto a concentração de CO_3^- e o pH diminuíram.
Adaptado de Fabry et al., (2008)

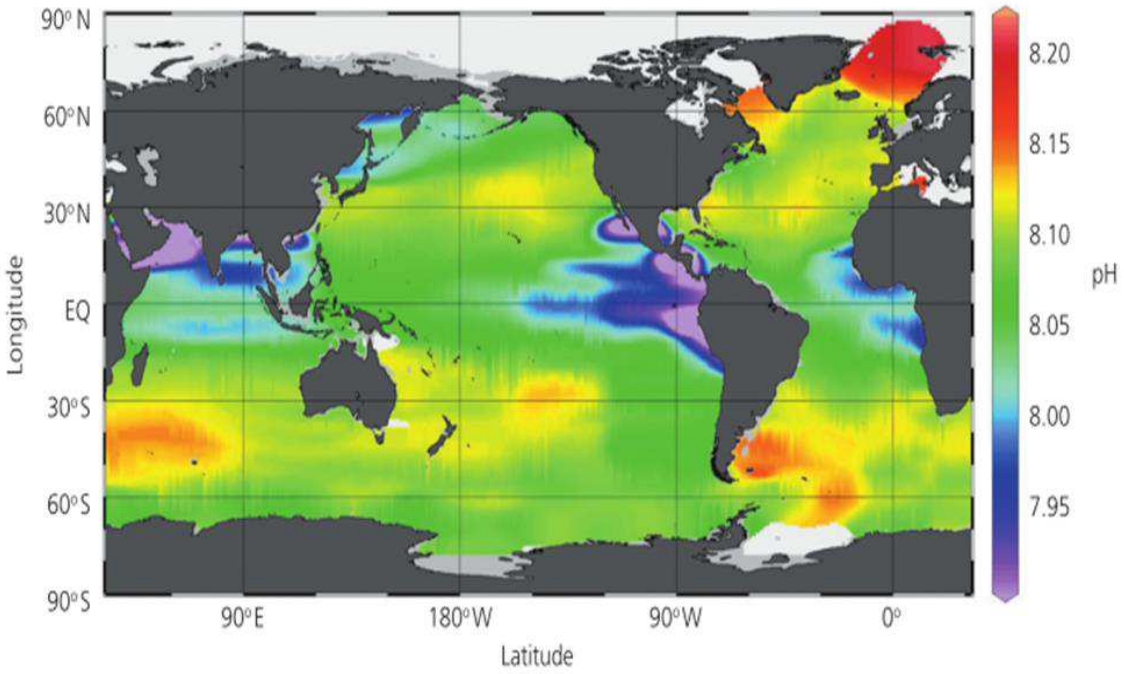
A acidificação oceânica inicialmente está relacionada às águas superficiais, uma vez que é nessa região que as trocas gasosas entre a água e a atmosfera ocorrem. A água do mar nessa região é ligeiramente alcalina, com o pH aproximadamente na faixa de 8,2 (Figura 2), variando ± 0,3 unidades dependendo do local, região ou estação do ano. É importante salientar que é exatamente nessa região onde ocorre intensa atividade biológica, uma vez que é a região onde se realiza a fotossíntese, sendo esta região também chamada de zona fótica. (Royal Society, 2005). Assim a acidificação oceânica pode afetar não somente os animais que vivem nesta região, mas também os animais de águas mais profundas que dependem direta ou indiretamente daquilo que é produzido nesta região. Dessa forma, os efeitos da acidificação oceânica podem ter consequências biológicas, fisiológicas e evolucionárias para toda a biota marinha em seus diferentes níveis de organização (Bibby et al., 2008).

Desde 1993 a literatura sobre impactos causados pelas mudanças climáticas tem crescido exponencialmente, porém os tópicos enfatizados nos anos 90

continuam a dominar a literatura sendo a maioria relacionado à temperatura (Harley et al., 2006); dos estudos referentes a diminuição do pH a maioria refere-se a como os organismos calcificados (como corais, ouriços-do-mar e fitoplâncton), serão afetados.

Dos trabalhos conduzidos com ouriços-do-mar, a grande maioria, está focada em como a acidificação pode alterar o desenvolvimento embrionário e outros processos relacionados à fecundação. Estudos com animais adultos são escassos. Além disso, pouca atenção tem sido dada a outros processos biológicos (Kurihara et al., 2004 b), especialmente em relação à sensibilidade ao CO_2 nas funções imunes (Bibby et al., 2008). Estudos recentes têm demonstrado que a acidificação oceânica também afeta a expressão gênica de corais, ostras e ouriços-do-mar (Kaniewska et al., 2012; Liu et al., 2012; O'Donnell et al., 2010) reforçando a necessidade de se investigar os impactos da acidificação oceânica em processos além da calcificação, uma vez que muitos desses processos são afetados e alterados antes mesmo que alterações na taxa de calcificação sejam detectadas (Kaniewska et al., 2012).

Figura 2 – pH da superfície oceânica.



O pH na maior parte do oceano varia entre 8,05 e 8,01. As áreas em azul, são as chamadas zonas de ressurgência onde as águas profundas afloram e por isto o pH nessas regiões é ligeiramente menor.
(Retirado de Royal Society, 2005).

Os estudos conduzidos mostram que em embriões de ouriço-do-mar a taxa de fertilização, taxa de clivagem e tamanho das larvas plúteos diminuíram com o aumento da concentração de CO_2 (Kurihara et al., 2004ª; Moulin et al., 2011). Em estrelas do mar *Ophiothrix fragilis* uma diminuição de pH de 0,2 unidades causou mortalidade de 100% nos embriões após 8 dias (Dupont et al., 2008). Efeitos sub-letais foram observados também em copépodos adultos e uma diminuição do crescimento foi observado em moluscos *Mytilus galloprovincialis* (Michaelidis et al., 2005).

Outro ponto importante a ser destacado é que muitos estudos tem testado as respostas fisiológicas em pHs muito baixos, sendo extremamente necessário analisar os efeitos fisiológicos da acidificação oceânica em pequenas mudanças no pH como aquelas que estão previstas para acontecer nos próximos séculos (Fabry et al*.,* 2008).

1.1 Ouriços-do-mar

Os equinodermos são animais exclusivamente marinhos, possuem como características um esqueleto formado por ossículos calcários, geralmente coberto por espinhos ou tubérculos. O filo possui também o sistema ambulacral, que é exclusivo e os distinguem de todos os outros grupos animais. Seis classes compõe o filo sendo estas: Asteroidea, Ophiuroidea, Crinoidea, Holothuroidea Concentricycloidea e Echinoidea (Ruppert, Barnes 1996). Podem ser encontrados nos mais variados ambientes marinhos, ocupando desde regiões superficiais como entremarés, até profundidades maiores que 7000 metros, e em diferentes climas como a região equatorial e zonas polares (Durke, 1988).

Ouriços-do-mar são animais pertencentes à classe Echinoidea. Esses animais são herbívoros/pastadores vivendo geralmente aderidos ao substrato; importantes, pois atuam na reciclagem de nutrientes (Valverde et al., 2007). Seu corpo apresenta forma circular ou ovalada, com um espaçoso celoma e um sistema digestivo bem desenvolvido; apresentam geralmente um conjunto de cinco gônadas localizadas na região aboral; a respiração ocorre através de brânquias e os órgãos excretores estão ausentes (Figura 3) (Ruppert, Barnes 1996).

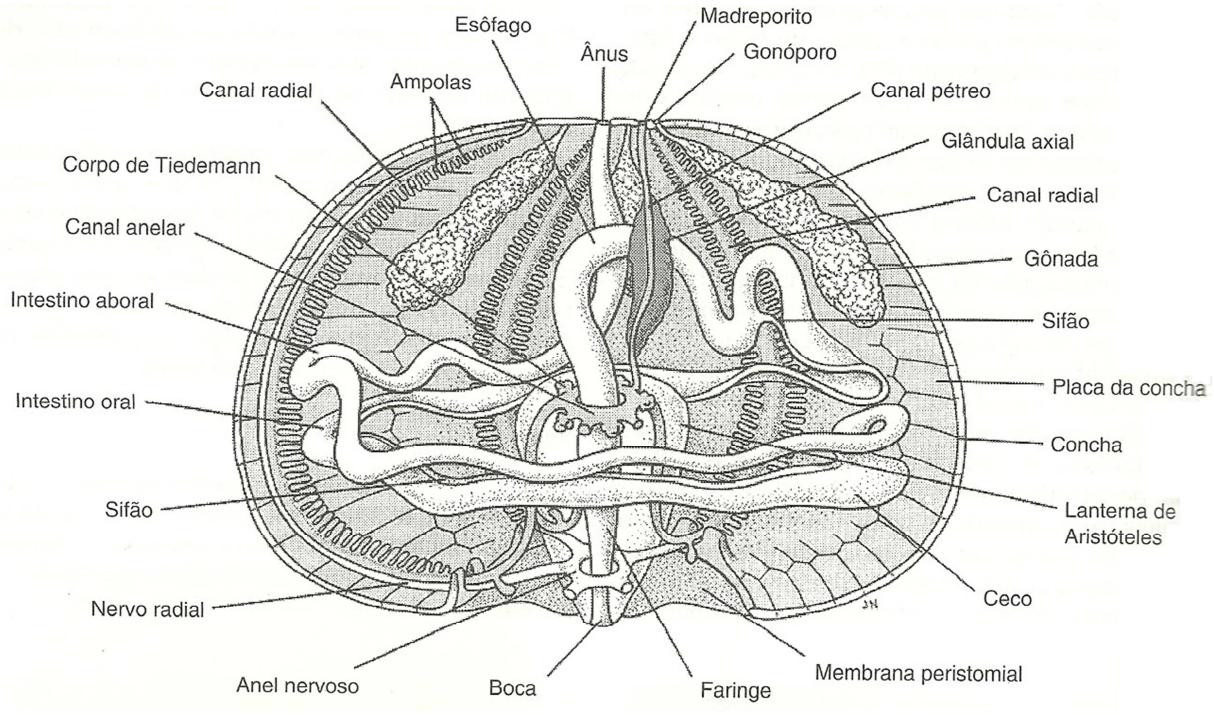
A circulação nesses animais ocorre através do fluido celômico, também chamado de líquido celomático, que preenche a cavidade celomática circundando os órgãos internos. O liquido celomático, apresenta composição semelhante à da água

do mar e contem populações de células livres chamadas de celomócitos (Chia, Xing 1996; Hyman, 1955). Basicamente quatro tipos de celomócitos podem ser encontrados na cavidade celômica, sendo eles: amebócitos fagocíticos, células vibráteis, esferulócitos vermelhos e esferulócitos incolores (Branco et al., 2014; Mangiaterra, Silva 2001; Matranga et al., 2005) (Figura 4), a proporção dessas células pode variar entre espécies e até mesmo entre indivíduos de mesma espécie dependendo de suas condições fisiológicas (Borges et al., 2005; Matranga et al., 2005).

Os esferulócitos são células ameboides com tamanho variando entre 8 e 20 µm dependendo da espécie, duas formas diferentes podem ser encontradas: o esferulócito incolor e o esferulócito vermelho (Chia, Xing 1996; Smith et al., 2006). As funções desempenhadas pelo esferulócito incolor ainda não são bem conhecidas, já o esferulócito vermelho está relacionado à atividade antimicrobiana, processos inflamatórios e reparo de feridas; além disso, essas células contem o Equinocromo-A um composto naftaquinonico responsável pela coloração dessas células e que possui características antioxidante e bactericida (Smith et al., 2006; Ramirez-Gomes, Gárcia-Arráras 2010).

As células vibráteis são células pequenas, variando entre 5 e 10µm, essas células possuem um flagelo e apesar de sua função ainda não ser conhecida, acredita-se que esta célula esteja relacionada à circulação e movimentação do liquido celomático (Chia e Xing 1996; Ramirez-Gomes, Gárcia-Arráras 2010; Smith et al., 2006).

Figura 3 – Anatomia interna de um ouriço-do-mar.



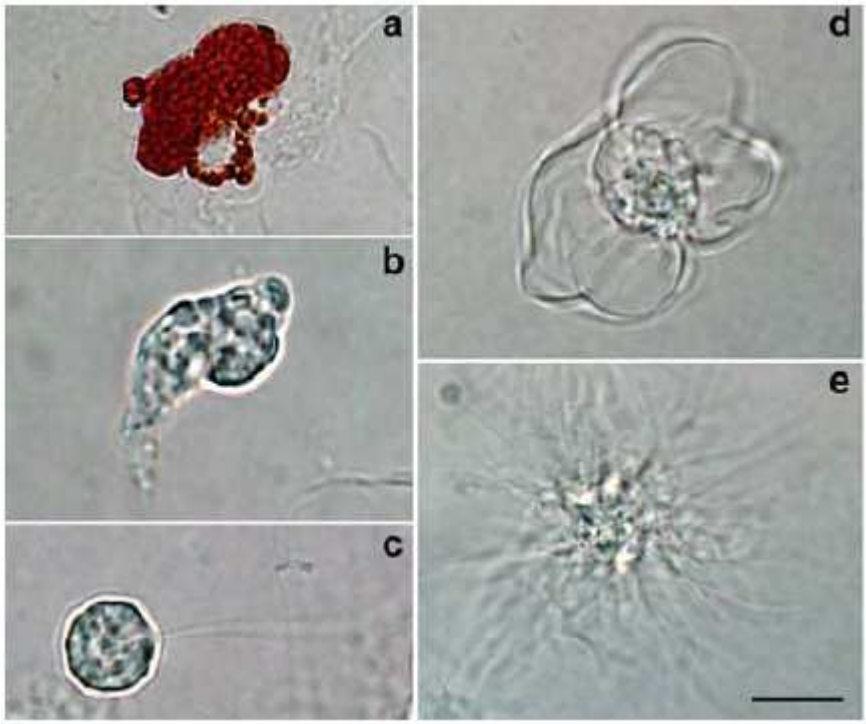
Retirado de Ruppert e Barnes (1996).

A célula encontrada em maior quantidade no liquido celomático é o amebócito fagocítico (Matranga 2005, Smith et al., 2006). Seu tamanho varia entre 10 e 40 µm, suas funções estão relacionadas a reações imunes, dentre elas provavelmente a principal é a fagocitose; os amebócitos fagociticos são considerados os principais efetores do sistema imune nesses animais (Ramirez-gomes, Gárcia-Arráras 2010). Baseado em sua morfologia, essas células podem ser subdivididas em duas formas: petaloide e filopodial (Chia, Xing 1996). Além da fagocitose, essas células são também responsáveis pela expressão de genes imunes, quimiotaxia, encapsulação, rejeição de enxertos e coagulação (Gross et al., 1999; Ramirez-gomes e Gárcia-Arráras 2010; Smith et al., 2006). Por estes motivos os amebócitos fagocíticos têm sido muito utilizados como ferramentas para avaliar as respostas imunes de ouriços do mar frente a fatores abióticos (Silva et al., 2013).

Ouriços-do-mar são extremamente sensíveis à mudanças no ambiente e de extrema importância para o ecossistema, pois uma vez herbívoros, podem induzir mudanças na taxa de distribuição de outras espécies marinhas e eventualmente causar segregação assim como especiação (Matranga et al., 2005). São animais de pouca mobilidade, essa característica os torna ótimos organismos para analisar

alterações ambientais em determinadas regiões, sendo assim considerados como excelentes bioindicadores ambientais (Kobayashi, Okamura 2004). Ademais, uma característica importante dos ouriços-do-mar que, diretamente aumenta sua significância para estudos é que os equinodermos são deuterostômios e, por isso, o grupo de invertebrados filogeneticamente mais próximos dos cordados (Smith et al., 2006; Sodergren et al., 2006). Estes animais vêm atraindo a atenção de pesquisadores que buscam encontrar mecanismos imunológicos primitivos que seriam filogeneticamente ancestrais dos vertebrados (Loker et al., 2004; Smith et al., 2006; Silva, 2013).

Figura 4 – Celomócitos do ouriços-do-mar



Paracentrotus lividus. (a) Esferulócito vermelho, (b) Esferulócito incolor, (c) Célula vibrátil, (d) amebócito fagocítico – forma petaloide e (e) amebócito fagocítico – forma filopodial. Barra de escala: 10 µm.
Retirado de Matranga et al., 2005.

Lytechinus variegatus e *Echinometra lucunter* são espécies facilmente encontradas na costa de São Paulo habitando diferentes regiões na costa; enquanto a espécie *Lytechinus variegatus* habita regiões de fundo arenoso com profundidade superior a 5m, a espécie *Echinometra lucunter* habita regiões mais superficiais do costão rochoso ficando geralmente exposto à variações de maré e temperatura. Assim, as duas espécies foram escolhidas para este trabalho, pois, uma vez que

estão em ambientes diferentes, sofrem variações ambientais distintas, e assim podem apresentar respostas fisiológicas diferentes frente a um mesmo agente estressor.

Além disso, em São Sebastião (litoral norte de São Paulo), foi observado por nossa equipe e também pelos técnicos do Centro de Biologia Marinha (CEBIMar-USP) que a população de ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* está em declínio e que esse fato não acontece com a espécie *Echinometra lucunter* (dados não publicados). Portanto faz-se necessária a pesquisa de possíveis fatores que possam explicar esses acontecimentos.

1.2 Imunidade Inata

A necessidade de lidar com a química, e os desafios biológicos no ambiente ocasiona a evolução de uma matriz de famílias de genes de defesa, um conjunto de mecanismos de proteção que envolve o sistema imunológico, e reage aos estressores bióticos como patógenos. A imunidade inata é o mecanismo de defesa filogeneticamente mais antigo contra microrganismos, ela é universal, está presente em todos os organismos, sendo a primeira a agir quando o organismo é desafiado (Abbas et al., 2008).

A maioria dos organismos invertebrados sobrevive apenas através dos mecanismos da imunidade inata, que responde a antígenos comuns na superfície de células de potenciais agentes patogênicos (bactérias, fungos e vírus); somente os vertebrados possuem sistemas alternativos para reconhecimento e eliminação do patógeno, chamado coletivamente de imunidade adaptativa (Beutler et al., 2004; Iwanga et al., 2005).

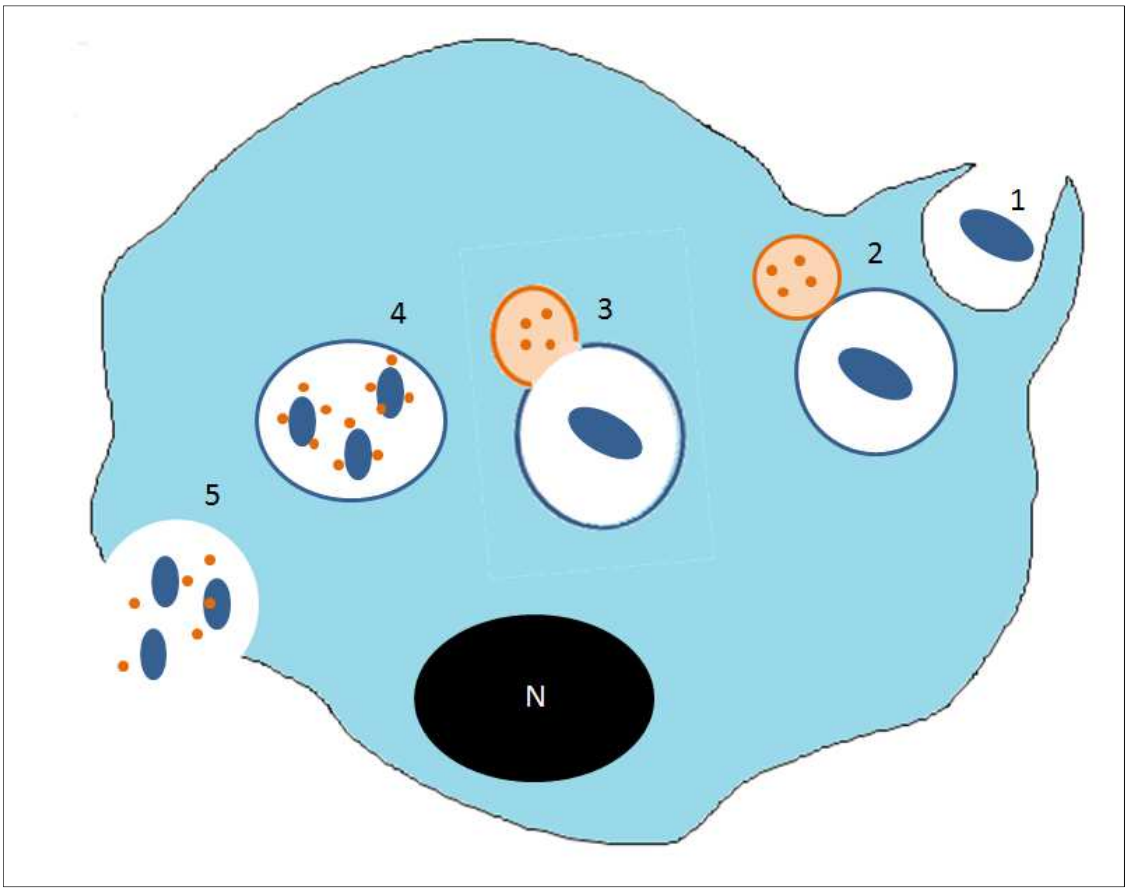
A primeira defesa contra infecções envolve uma barreira física à invasão por patógenos ou substâncias estranhas promovida pelo revestimento externo do corpo, no entanto, quando os patógenos conseguem penetrar essa barreira eles encontram moléculas genéricas ou específicas para restringir a infecção. A segunda resposta é composta por células capazes de fagocitar substâncias ou organismos patogênicos. A fagocitose é um processo complexo responsável pela degradação de microrganismos, este processo envolve várias etapas e modificações celulares. Inicialmente através da quimiotaxia a célula é atraída até a partícula a ser englobada, em seguida ocorre a adesão e opsonização – processo que aumenta a adesão celular e seguidamente ocorre a ingestão da partícula (Matranga et al.,

2005). Todos esses processos dependem do citoesqueleto celular, principalmente no que se refere à actina que é responsável pelas protrusões formadas pela membrana e a consequente captura da partícula (Botelho, Grinstein 2011)

Após a ingestão o fagossomo formado se une a um lisossomo formando o fagolisossomo, estes favorecem um ambiente ácido, possuem um lúmen oxidativo e peptídeos catiônicos que conseguem romper a membrana bacteriana e degradar a partícula internalizada (Botelho, Grinstein 2011). Seguido à destruição da partícula, ocorre a formação do corpo residual e o descarte dos restos celulares (Figura 5).

Em equinoides os celomócitos são os responsáveis por mediar a resposta celular através de fagocitose, citotoxidade, encapsulamento e produção de agentes microbianos. Existe também, uma variedade de fatores humorais presentes no liquido celomático importantes na defesa do hospedeiro como lecitinas, aglutininas e lisinas. (Gross et al., 1999).

Figura 5 – Etapas do processo de fagocitose.



O processo de fagocitose se inicia com a quimiotaxia até a partícula a ser fagocitada, ocorrendo em seguida a adesão, formação dos pseudopódios e ingestão da partícula (1).É formado então o fagossomo com a partícula completamente internalizada (2); com o objetivo

de destruir a partícula fagocitada um lisossomo se funde à membrana do fagossomo liberando suas enzimas digestivas (3). A partícula é então digerida (4) e o material que não é reaproveitado pela célula é descartado (5). N- núcleo.
Adaptado de Branco et al., (2014).

Assim, a avaliação da resposta imune inata é uma ferramenta de extrema importância uma vez que é o mecanismo responsável pela defesa do organismo contra patógenos, é também importante para avaliar a adaptação dos indivíduos em ambientes alterados e prever alterações na distribuição e na dinâmica populacional das espécies.

2 OBJETIVO

Verificar o efeito da acidificação da água do mar na imunidade inata e no balaço ácido - base de ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* submetidos a 2 diferentes pHs (7,6; 7,3), sendo o controle mantido a pH 8,0 no período de 24 h e 5 dias para ambas as espécies.

Para isso foram cumpridos os seguintes objetivos específicos:

- Análise do pH do liquido celomático;
- Contagem absoluta e relativa da população de celomócitos;
- Análise de viabilidade celular;
- Avaliação dos índices de atividade fagocítica *in vitro* (capacidade fagocítica e índice fagocítico), em ensaios de fagocitose, utilizando-se amebócitos desafiados com leveduras *Sacharomyces cereviseae*;
- Determinação da capacidade de adesão celular dos amebócitos fagocíticos;
- Determinação da capacidade de espraiamento dos amebócitos fagocíticos;
- Avaliação da capacidade de recuperação dos animais utilizando os parâmetros mencionados acima.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta dos animais

Exemplares dos ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* (Figura 6), (n=45 para cada espécie), machos e fêmeas com volume aproximado de 232 ± 60ml e 104,31 ± 50 ml respectivamente, foram colhidos manualmente por mergulho livre, a uma profundidade de 2 a 10m no Parcial da Praia Grande, no canal de São Sebastião-Ilha Bela (23º 51,200' Sul, 0,45º 24973' Oeste), litoral norte do estado de São Paulo. As coletas foram realizadas em duas estações do ano: verão (dezembro) e inverno (julho).

Os ouriços foram mantidos em caixas d'água de fibra de vidro (500 litros) renovadas com água do mar bombeada diariamente nos laboratórios do Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar-USP), Os animais foram aclimatados por pelo menos 1 semana antes do inicio dos experimentos com foto período natural. Os animais foram alimentados semanalmente *ad libitum* com algas marinhas (*Ulva sp.* e *Sargassum sp.*) colhidas no mesmo local da coleta.

3.2 Parâmetros físico-químicos da água do mar do biotério marinho

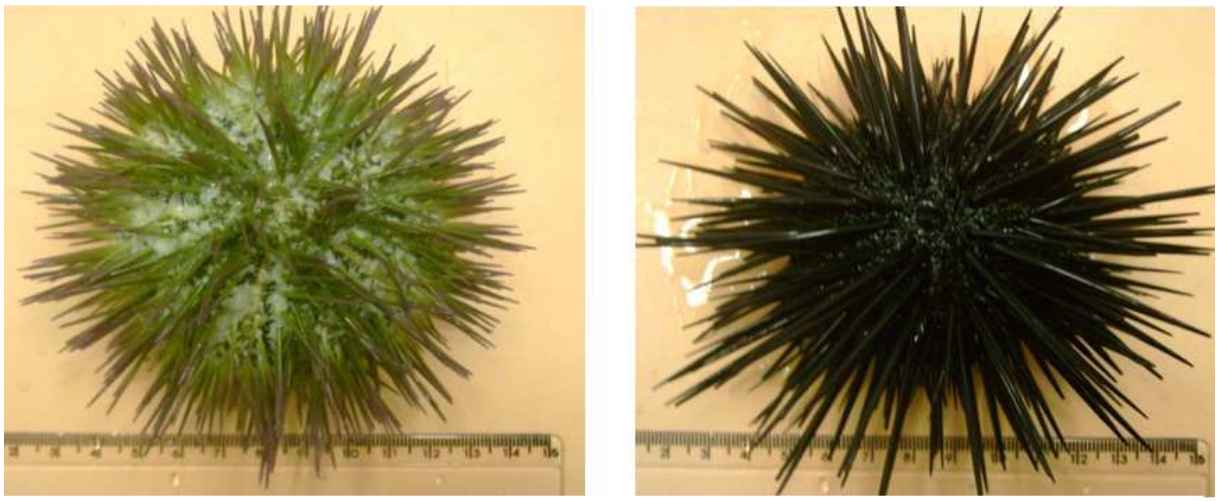
Após o período de aclimatação os animais foram transferidos para os tanques experimentais (100 litros), onde foram mantidos durante todo o experimento. Os tanques foram equipados com bombas submersas Master 100 (Master®), e aeradores (Big Air Super Pump A230).

Os parâmetros físico-químicos analisados (salinidade, temperatura, pH, nitrito e oxigênio dissolvido), foram monitorados diariamente pela manhã. A salinidade foi monitorada através de um refratômetro com compensação automática para temperatura (SR-3) e mantida em 35,0 ± 1 ups pela adição, quando necessária, de água destilada.

As leituras de temperatura foram realizadas, utilizando-se termostatos (Full Gauge), entretanto, uma vez que a água era renovada constantemente, a temperatura variava conforme a do ambiente mantendo-se a 25,2,0 ± 1,0 °C durante o verão e 21,5 ±1,0 durante o inverno. O oxigênio dissolvido foi monitorado através de oximetro DO 5519 (Lutron®) sendo mantido entre 8 e 11 ppm. Para garantir que não houvesse alteração nesse parâmetro, aeradores foram ligados aos tanques.

A concentração de nitrito foi monitorada através de teste de nitrito para água salgada (TetraTest®), mantido entre 0 e 0,1mg/l.

Figura 6 – Ouriços-do-mar das espécies *Lytechinus variegatus* (esquerda) e *Echinometra lucunter* (direita).



Lytechinus variegatus *Echinometra lucunter*

3.3 Variação do pH

A variação e controle do pH foi feita através do controlador automático de pH Sera Seramic pH controller (SERA®) pela infusão de CO_2 diretamente na água, (Figura 7). O equipamento é acoplado à um cilindro de CO_2, e possui um eletrodo que monitora o pH da água; ao atingir o pH desejado a emissão de CO_2 é interrompida.

A exposição dos animais foi realizada diminuindo o pH controle (pH da água do mar – 8,0) até os valores desejados.

3.4 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em grupos com cinco animais cada (Figura 8), e os períodos de exposição foram estabelecidos em 24 h e 5 dias para ambas as espécies durante as estações de verão e inverno. Os pHs experimentais foram escolhidos de acordo com as previsões previstas para ocorrer nos anos de 2100,

diminuição de 0,4 unidades, e 2300, diminuição de 0,7 unidades, Caldeira, Wickett 2003; (IPCC 2007). Uma vez que o pH da água do mar encontrava-se em 8,0 ,este valor foi utilizado como controle e os pHs experimentais foram estabelecidos em 7,6 e 7,3.

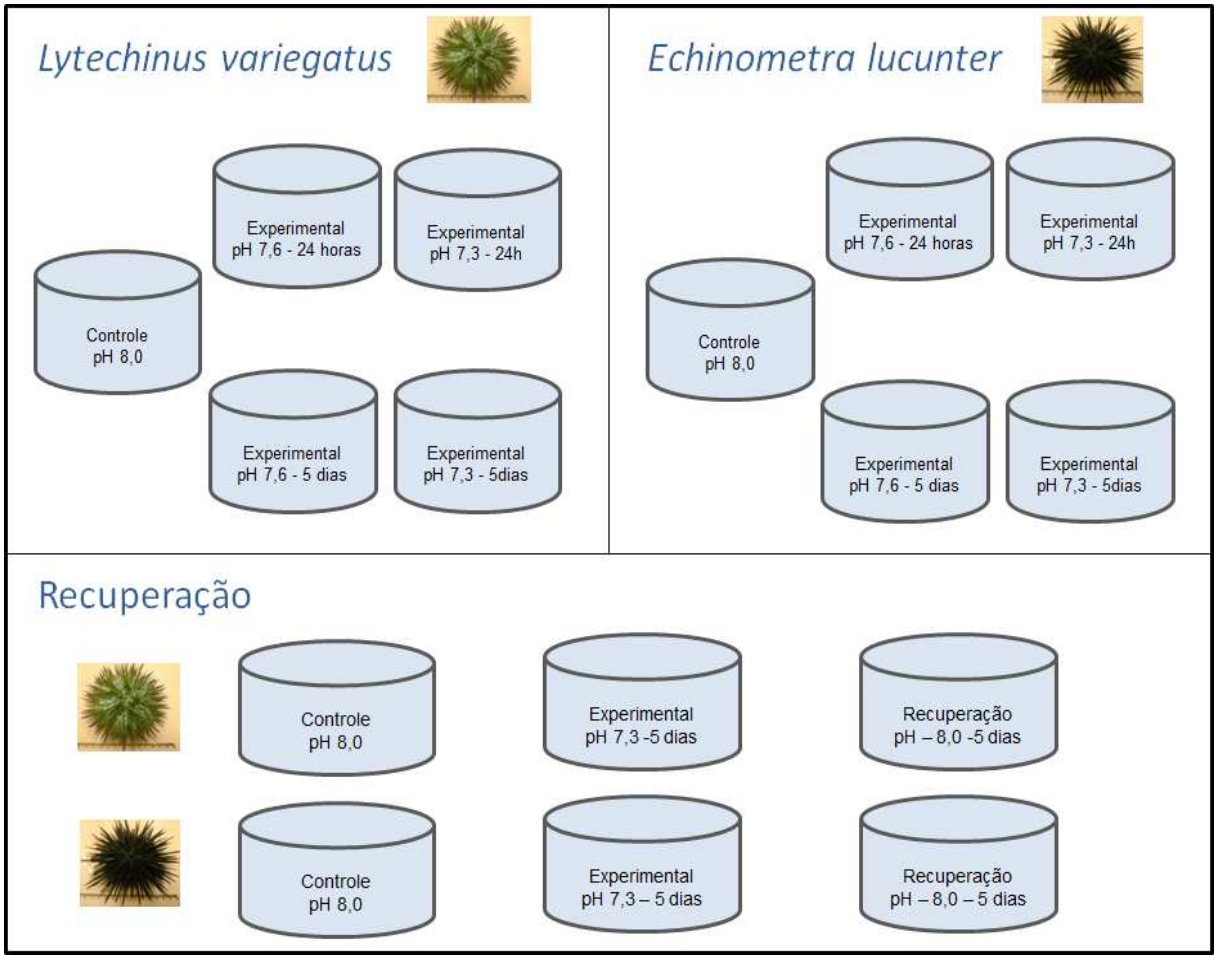
Todos os animais de todos os grupos iniciaram o experimento no pH controle e nos tanques experimentais foi adicionado CO_2 até pH desejado, de modo a evitar um choque de exposição.

Figura 7- Controlador automático de pH.

O controlador é acoplado ao tanque de exposição**.** Ao ser atingido o pH desejado, a válvula solenoide interrompe a injeção de CO_2 no tanque.

Todos os experimentos realizados obtiveram aprovação no Comitê de Ética e Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e foram aprovados também pelo IBAMA (Licença Nº 30422-2).

Figura 8 – Delineamento experimental



. n=5 pra cada grupo

3.5 Contagem de celomócitos e leveduras

Uma alíquota de 150 µL do líquido celomático foi retirada por punção via membrana peristomial e colocada sem diluição em câmara de Neubauer para contagem diferencial dos celomócitos (Borges et al., 2002), sob microscopia de contraste de fase (Carl Zeiss® - Fotomicroscópio II). Para a contagem total de leveduras uma alíquota de 100 µl foi também colocada em câmara de Neubauer com diluição de aproximadamente 1mg de leveduras comerciais (Itaiquara®) em 15 ml de água do mar.

3.6 Análise de viabilidade celular

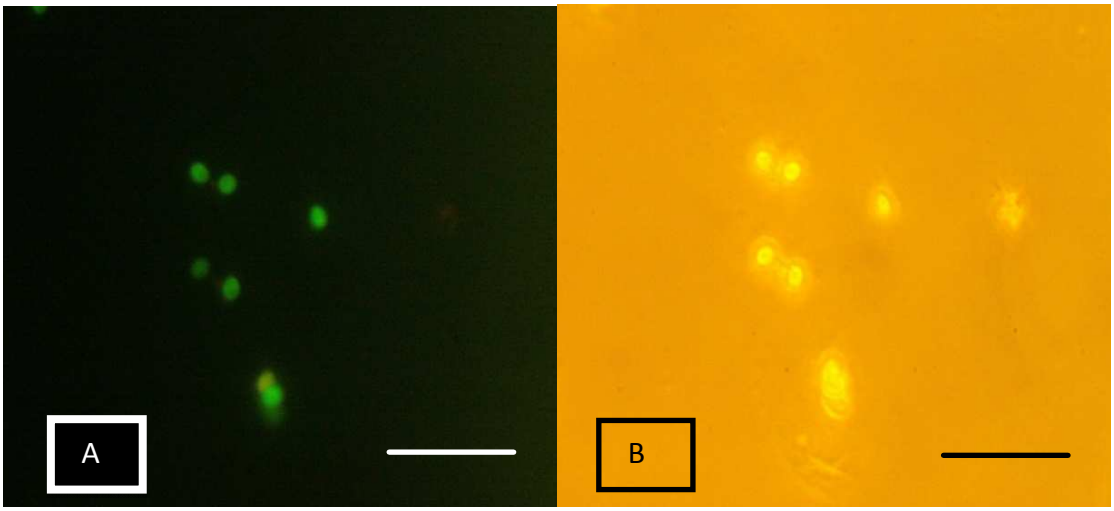
A viabilidade celular foi analisada baseada no protocolo de Freshney (1987): uma alíquota de 50µl de liquido celomático foi misturada à 50 µl da solução de azul de Tripan 0,4% (Sigma®) e analisado em Câmara de Neubauer. O azul de Tripan é um corante vital que penetra apenas nas células que apresentam lesões em sua membrana, assim, as células coradas pelo azul de Tripan são consideradas não viáveis. A proporção é feita através do número total de células contadas e o número de células consideradas não viáveis.

3.7 Teste de viabilidade fúngica

Utilizamos leveduras comerciais frescas *Saccharomyces cerevisae* (Itaiquara®) com viabilidade superior a 98%. A viabilidade das leveduras foi realizada nos diferentes pHs (8,0; 7,6 e 7,3) em água do mar.

Uma solução de diacetato de fluoresceína (Sigma®) em acetona (5 mg/ml) e brometo de etídeo (Sigma®) em água do mar (50 µg/ml) foi utilizada para identificar as leveduras vivas e mortas. As leveduras vivas emitem fluorescência verde devido à penetração de diacetato de fluoresceína, as leveduras mortas emitem fluorescência vermelha devido à penetração de brometo de etídeo (Figura 9). Fluorocromos (λ380-420nm) foram observados sob microscopia de fluorescência (Zeiss standard 25 – com fluorescência e filtro U-MWU). As leveduras foram escolhidas por serem microrganismos não patogênicos eficientes na indução de respostas inespecíficas de invertebrados (Silva, Peck 2000).

Figura 9 - Teste de viabilidade fúngica.



Leveduras *Saccharomyces cerevisae* sob microscopia de fluorescência (A) a cor verde (diacetato de fluoresceína) indica leveduras vivas. Leveduras sob contraste de fase (B) Barra de escala 50µm.

3.8 Ensaios de fagocitose in vitro

Alíquotas de 100 µL de líquido celomático foram adicionadas às lâminas de vidro as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 1h para a adesão e o espraiamento celular, em seguida foram homogeneizados com uma suspensão de leveduras *Saccharomyces cerevisae*. Três lâminas para cada animal foram incubadas por período de 1 hora e analisadas sob microscopia de contraste de fase (Carl Zeiss ® - Fotomicroscópio II) para posterior cálculo dos índices fagocíticos. A razão de leveduras por amebócito foi estabelecida em 10:1 em câmara de Neubauer (Silva, Peck 2000).

3.8.1Índices de fagocitose

Os índices de fagocitose foram calculados através das seguintes fórmulas (Silva, Peck 2000):

Capacidade Fagocitica: CF = $\frac{\text{nº de amebocitos fagocitando}}{\text{nº de amebócitos total}}$

Índice Fagocitico: IF = $\frac{\text{nº total de leveduras fagocitadas}}{\text{nº de amebócitos fagocitando}}$

3.9 Análise de variação do pH do liquido celomático.

Uma alíquota de 4 ml do liquido celomático dos animais controle e tratados foram coletados e imediatamente analisados em pHmetro (HI 2221 Calibration Check pH ORP meter - Hanna Instruments®)

3.10 Determinação da capacidade de adesão celular

Uma alíquota (100 µl) do líquido celomático de cada animal foi coletada após o período de exposição e colocada sobre lâminas de vidro, mantidas em câmara úmida por diferentes períodos (5, 10, 15 e 30 minutos). Em seguida, as lâminas foram lavadas com água do mar filtrada e fotografadas em microscópio de contraste de fase (Axioplan 2 imaging - Zeiss®). Cinco campos aleatórios de cada lâmina foram fotografados e o número de células aderidas foram contadas.

Foram consideradas células aderidas aquelas em formato circular e/ou espraiadas que não se desprenderam do vidro após lavagem com água do mar. (adaptado de Branco et al., 2012)

3.11 Determinação da capacidade de espraiamento celular

Após o período de exposição uma alíquota (100 µl) do líquido celomático foi colocado sobre lâminas de vidro e mantidas em câmara úmida por diferentes períodos (15, 20, 30 e 60 minutos). Em seguida, as lâminas foram lavadas com água do mar filtrada e fotografadas em microscópio de contraste de fase (Axioplan 2 imaging - Zeiss®).

A contagem de células espraiadas foi realizada em 5 campos aleatórios por lâmina e a porcentagem de células espraiadas foi determinada através da proporção de células que nos períodos analisados encontraram-se somente aderidas e o número de células que aderiram e espraiaram. Foram consideradas células espraiadas aquelas que apresentarem emissão de filopódios e/ou lamelipódios. (Adaptado de Branco et al., 2012).

3.12 Determinação da área de espraiamento celular

As fotos utilizadas para a determinação da capacidade de espraiamento celular foram também utilizadas para determinar a área de espraiamento das células. As medidas foram realizadas após 60 minutos de espraiamento. Dez células por animal foram analisadas com o programa Image J®, e as mensurações foram submetidas à análise estatística.

3.13 Teste de recuperação

O ensaio de recuperação foi realizado após o término dos experimentos mencionados acima, no período de inverno. Uma vez analisados os resultados desses experimentos decidimos avaliar a capacidade de recuperação dos animais após o período de exposição de 5 dias ao pH 7,3, por ser o menor pH testado e o maior período de exposição.

Para isso, nova coleta foi efetuada e os animais foram divididos em dois grupos (controle e 5 dias pH 7,3). Os animais foram então expostos por cinco dias ao pH 7,3 após esse período a injeção de CO_2 no tanque foi imediatamente interrompida e o pH foi naturalmente elevado através da renovação da água do mar no tanque evitando assim um choque de exposição. Após atingir o pH controle, os animais permaneceram por mais cinco dias nessas condições.

A proporção dos tipos celulares, os índices fagocíticos e o pH do líquido celomático foram analisados no controle, após os cinco dias de exposição ao pH 7,3 e novamente nos mesmos animais após o período de recuperação.

3.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA e o teste de Tukey, foram utilizados os programas GraphPad Instat ® e GraphPad Prisma®.

Os valores estão apresentados como média e foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento Inverno

4.1.1 Contagem diferencial dos celomócitos

Não houve alteração significativa na proporção de nenhum dos quatro tipos celulares analisados, em nenhum pH ou período testado, tanto para a espécie *L. variegatus* (Figura 10), quanto para a espécie *E. lucunter* (Figura 11).

4.1.2 Viabilidade celular e viabilidade fúngica

A viabilidade celular dos celomócitos se manteve superior a 98% em todos os animais, não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

O mesmo ocorreu com a viabilidade fúngica, que também se manteve superior a 98%.

4.1.3 Índices fagocíticos

Ambas as espécies apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$), neste parâmetro, em todos os grupos experimentais comparados ao controle (FIGURA 12).

Na espécie *L variegatus* o menor valor, foi encontrado após exposição ao pH mais baixo (7,3), após o período de cinco dias.

Na espécie *E. lucunter* os menores valores foram encontrados também no pH mais baixo porém em ambos os prazos analisados: 24 horas e cinco dias. (Tabela1).

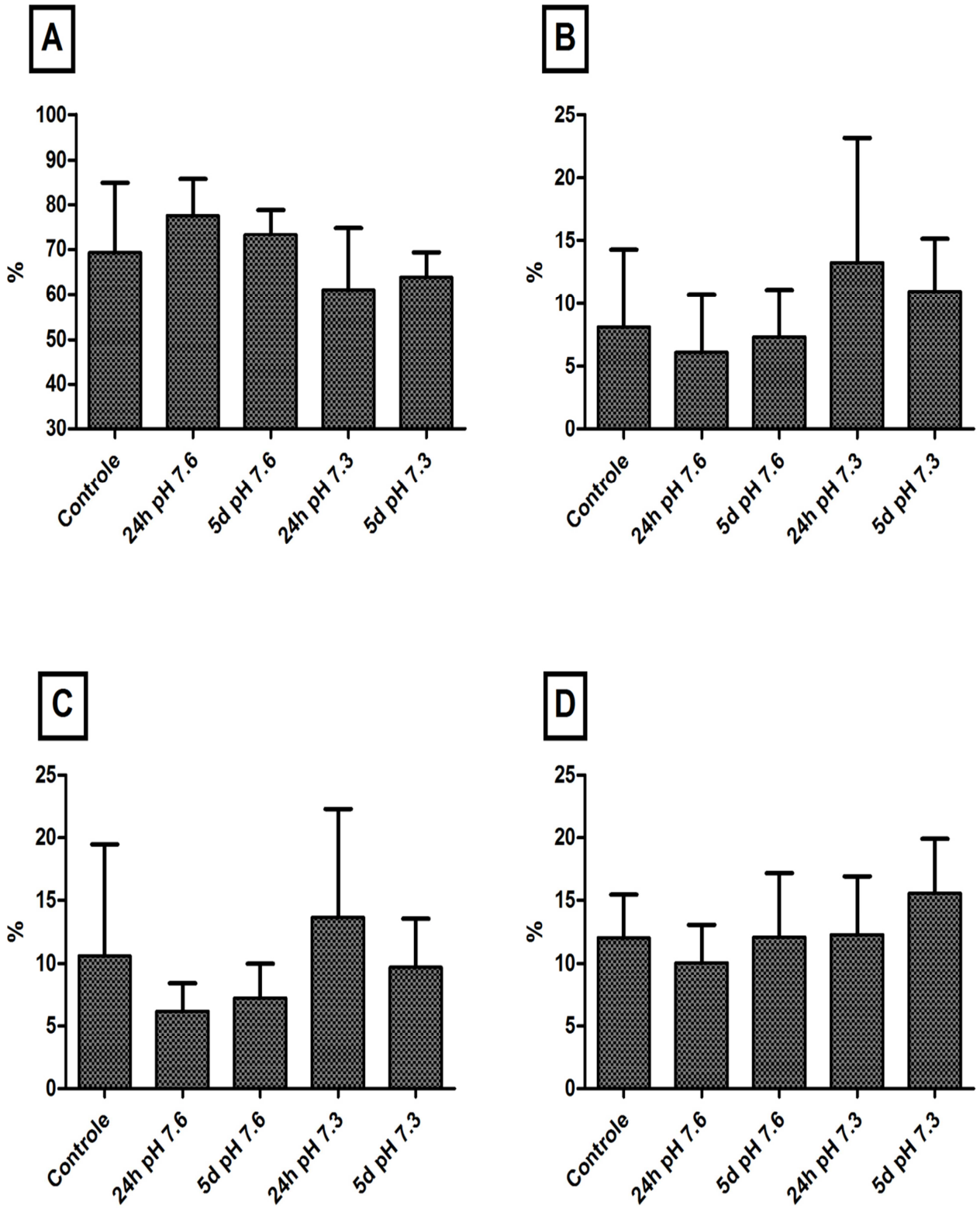
O índice fagocítico está relacionado à quantidade de leveduras que cada célula é capaz de fagocitar (Figura 13). Não houve diferenças significativas no índice fagocítico em nenhuma das espécies testadas em nenhum pH ou período analisado (Figura 14).

Tabela 1- Capacidade fagocítica (CF) dos ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* expostos a águas com diferentes pHs durante o período de inverno.

	Lytechinus variegatus	***Echinometra lucunter***
	CF	CF
Controle	67,82 ± 3,96	58,19 ±16,5
24h pH 7,6	57,25 ± 4,05	33,69 ± 9,08
5 dias pH 7,6	51,50 ± 4,87	36,85 ± 12,45
24h pH 7,3	57,00 ± 5,61	21,27 ± 5,28
5 dias pH 7,3	49,14± 5,65	21,82 ± 3,69

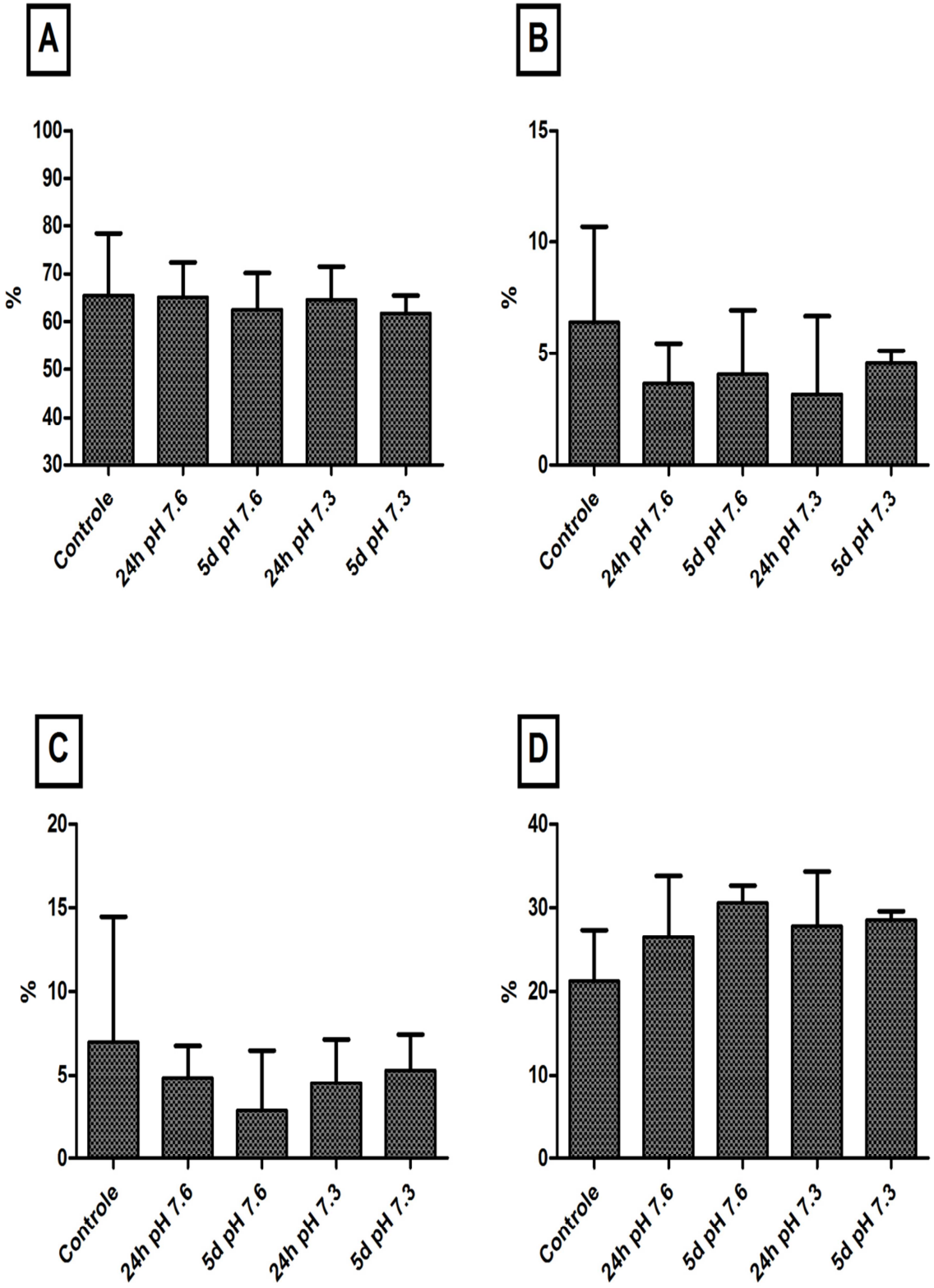
Os valores são apresentados em média e desvio padrão.

Figura 10 – Proporção dos tipos celulares da espécie *Lytechinus variegatus* após exposição à águas acidificadas durante o inverno.



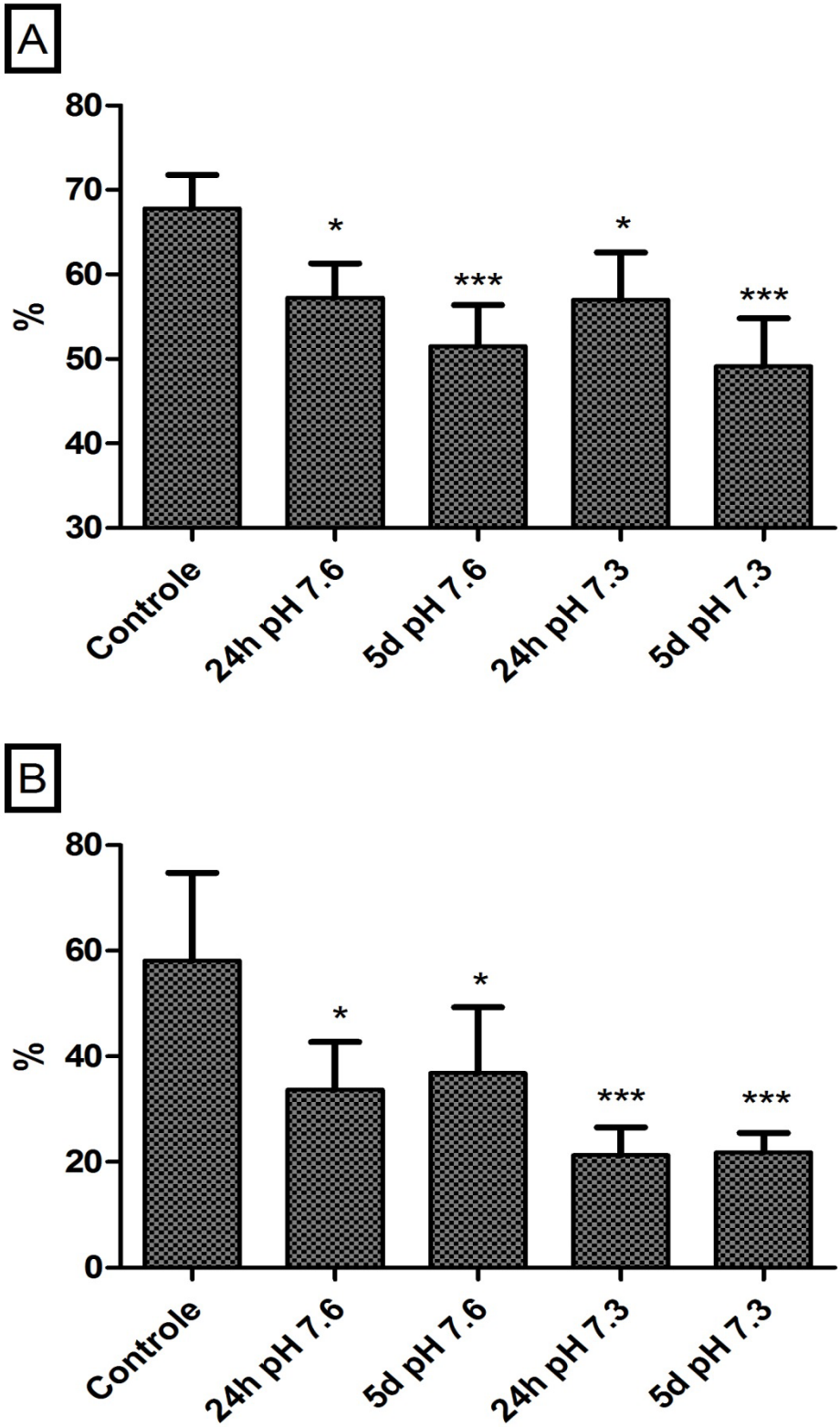
A- Amebócitos fagociticos, B- Esferulócitos incolores, C- Esferulócitos vermelhos e D- Células vibráteis.

Figura 11 – Proporção dos tipos celulares da espécie *Echinometra lucunter* após exposição à águas acidificadas durante o inverno.



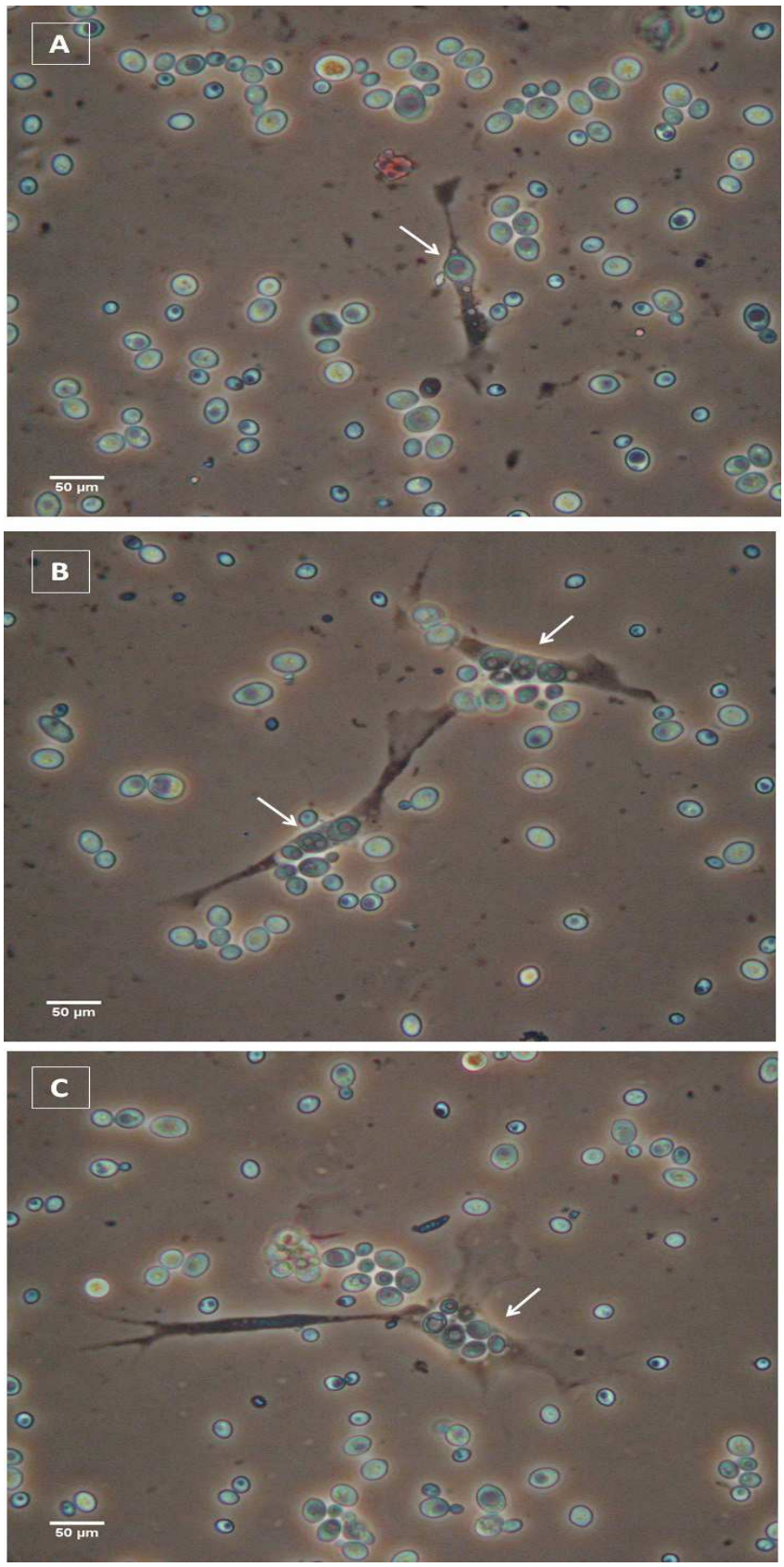
A- Amebócitos fagociticos, B- Esferulócitos incolores, C- Esferulócitos vermelhos e D- Células vibráteis.

Figura 12 - Capacidade fagocítica das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o período de inverno.



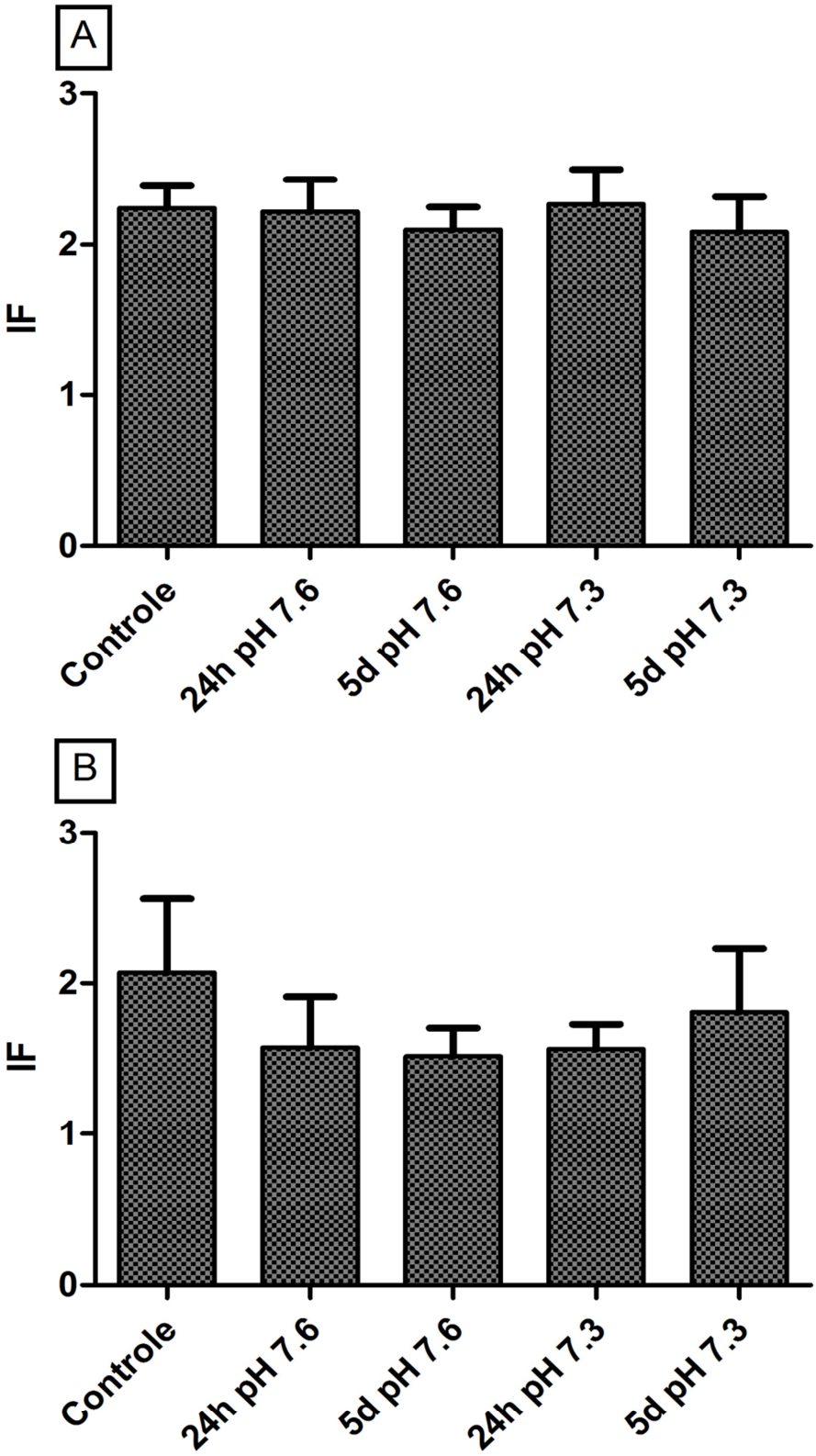
* indica diferença significativa comparado com o grupo controle, * p<0,05 e ***p<0,001.

Figura 13- Fagocitose observada sob microscopia de contraste de fase.



(A) -Amebócitos fagocíticos de ouriços-do-mar com uma , (B) três e (C) sete leveduras fagocitadas após o período de uma hora de incubação em câmara úmida.

Figura 14 - Índice fagocítico das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos a águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o período de inverno.



4.1.4 pH do líquido celomático

O pH do líquido celomático apresentou diminuição significativa em todos os grupos experimentais comparados ao controle, em ambas as espécies. Além disso, nas duas espécies houve diferença também entre os grupos experimentais.

Na espécie *L. variegatus* o menor valor observado foi encontrado no grupo exposto por 24 horas no pH de 7,3 (Tabela 2) . Foram encontradas também diferenças significativas entre os grupos expostos durante 5 dias ao pH 7,6 e 5 dias no pH 7,3 quando comparados ao grupo exposto por 24 horas ao pH 7,3 (Figura 15 A).

Na espécie *E. lucunter* o menor valor observado foi também encontrado no período de exposição de 24 horas porém no pH de 7,6 (Tabela 2). Este último apresentou diferenças significativas com todos os outros grupos experimentais analisados (Figura 15 B).

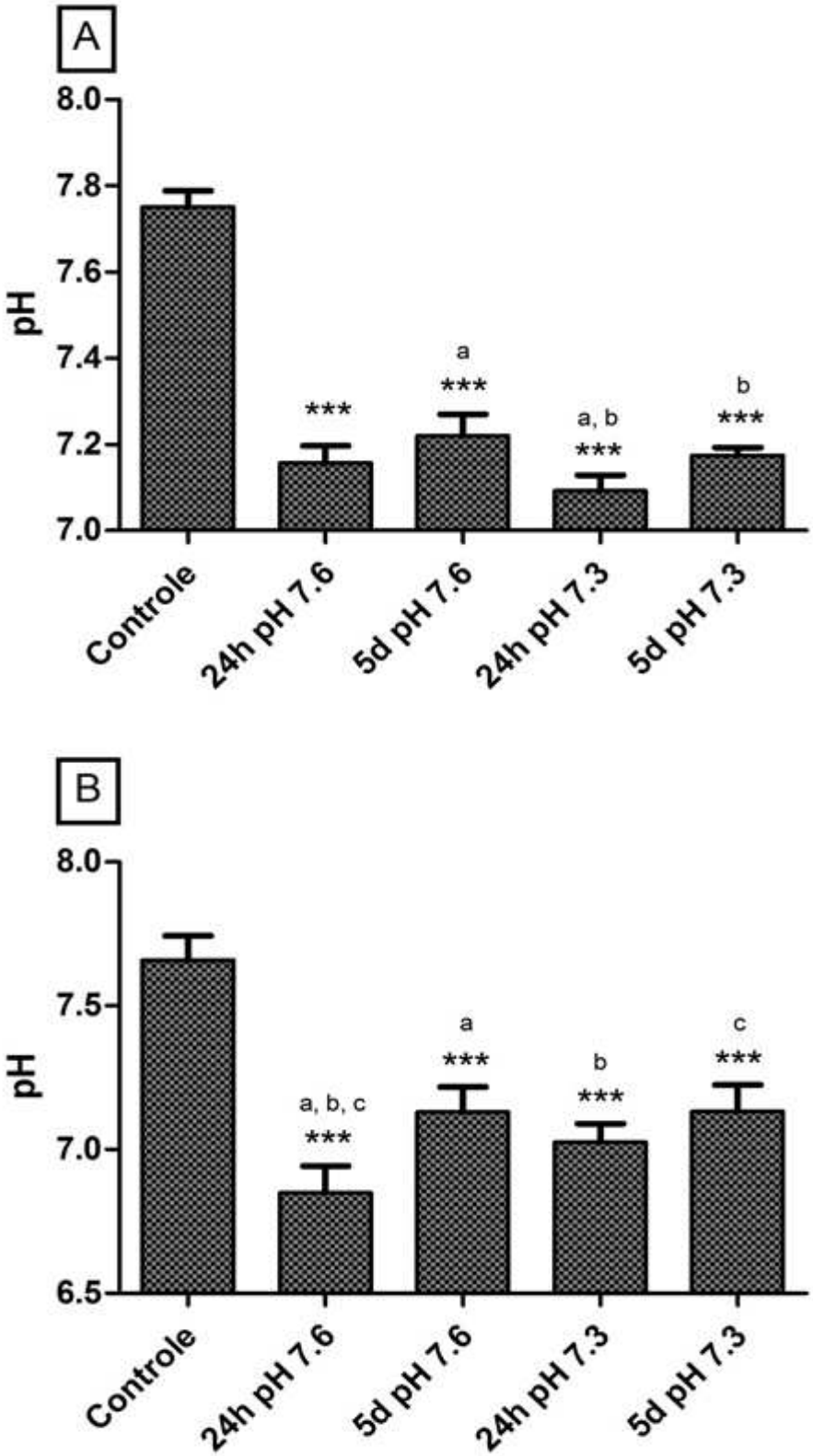
Um dado importante observado nas duas espécies durante o período de exposição de cinco dias foi que os espinhos dos animais ficaram mais fracos e quebradiços, sendo isto observado a partir do terceiro dia de exposição, ficando mais acentuado no quarto e principalmente no quinto dia, onde os espinhos se quebravam até mesmo com o manuseio / manipulação dos animais durante a coleta de liquido celomático.

Tabela 2- Valores de pH do líquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* analisados após exposição à águas com diferentes pHs durante o inverno.

	Lytechinus variegatus	***Echinometra lucunter***
	pH	pH
Controle	7,75 ± 0,03	7,66 ± 0,08
24h pH 7,6	7,15 ± 0,04	6,85 ± 0,09
5 dias pH 7,6	7,22 ± 0,04	7,13 ± 0,08
24h pH 7,3	7,09 ± 0,03	7,02 ± 0,06
5 dias pH 7,3	7,17 ± 0,01	7,13 ± 0,09

Os valores são apresentados em média e desvio padrão.

Figura 15 – Valores de pH do liquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o período de inverno.



* indica diferença significativa com o grupo controle; letras iguais indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. * p<0,05 e ***p<0,001.

4.2 Experimento Verão

4.2.1 Contagem diferencial dos celomócitos

Na espécie *L. variegatus*, assim como no experimento realizado durante o inverno, não houve diferença significativa em nenhum dos quatro tipos celulares analisados, em nenhum pH ou prazo testados (Figura 16). A proporção dos tipos celulares se manteve de acordo com a literatura para as duas espécies.

Já na a espécie *E. lucunter* dois tipos celulares apresentaram diferença significativa. Nos animais do grupo exposto por 24 horas ao pH 7,3 houve diminuição significativa na proporção de amebócitos fagocíticos sendo os menores valores encontrados após exposição de cinco dias ao pH 7,3 (Tabela 3).

Em contrapartida no mesmo grupo experimental houve um aumento significativo na proporção de células vibráteis, após a exposição (Figura 17), sendo os maiores valores encontrados após o período de exposição de cinco dias ao pH 7,3. (Tabela 3).

Tabela 3- Proporção dos diferentes tipos celulares encontrados no liquido celomático de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* após exposição a águas com diferentes pHs durante o verão. Valores apresentados como média e desvio padrão.

	Células			
	AF	EI	EV	CV
Controle	75,31 ± 7,27	6,39 ± 4,28	6,99 ± 7,46	17,97 ± 6,72
24h pH 7,6	68,95 ± 6,28	3,65 ± 1,80	4,86 ± 1,88	24,43 ± 4,59
5 dias pH 7,6	69,63±10,33	4,07 ± 2,85	2,90 ± 3,5	23,81 ± 8,62
24h pH 7,3	61,16 ± 3,07	3,18 ± 3,48	4,54 ± 2,58	25,53 ± 4,59
5 dias pH 7,3	63,37 ± 6,09	4,57 ± 0,55	5,31 ± 3,10	31,87 ± 4,59

AF- Amebócitos fagocíticos, EI – Esferulócitos incolores, EV – Esferulócitos vermelhos, CV – Células vibráteis.

4.2.2. Viabilidade celular e viabilidade fúngica

A viabilidade celular assim como a viabilidade fúngica mantiveram-se superior a 98%, não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos controle e experimentais.

4.2.3 Índices fagocíticos

Assim como no experimento realizado durante o inverno, a capacidade fagocítica diminuiu significativamente nas duas espécies analisadas.

No grupo controle da espécie *L. variegatus* ; todos os grupos experimentais, exceto o de 24 horas pH 7,6 apresentaram diferenças em relação ao grupo controle; foram encontradas também diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 18 A).

Na espécie *E. lucunter* a capacidade fagocítca apresentou padrão semelhante ao da espécie *L. variegatus*, onde somente o grupo exposto por 24 horas ao pH 7,6, não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, além disso foram também encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 18 B). .

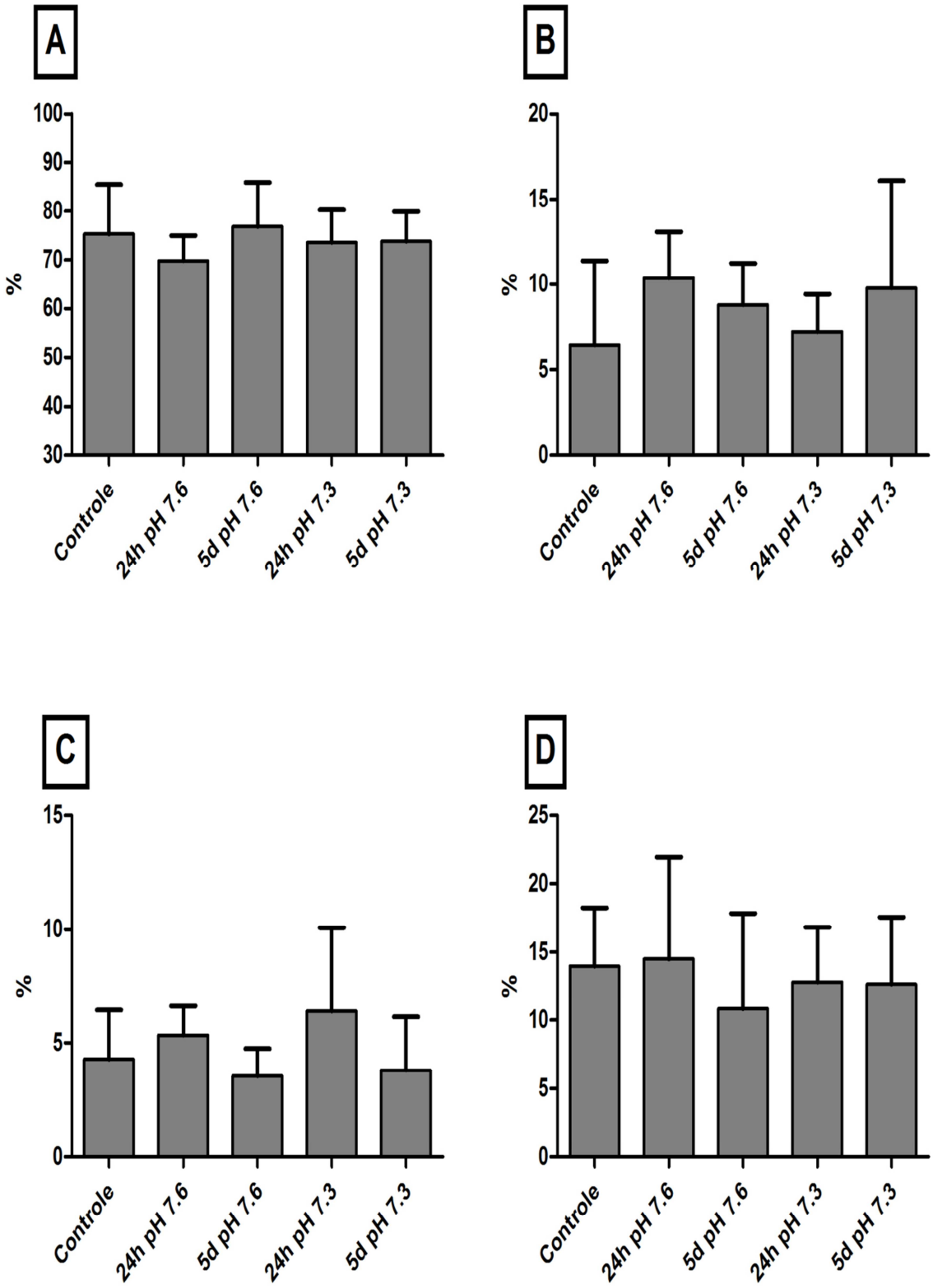
Em ambas as espécies os menores valores foram encontrados após a exposição ao menor pH no período de cinco dias (Tabela 4).

Com relação aos índices fagocíticos, assim como ocorreu no inverno, não houve diferenças significativas em nenhuma das espécies testadas em nenhum pH ou período analisados (Figura 19).

Tabela 4- Capacidade fagocítica (CF) dos ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* expostos a águas com diferentes pHs durante o período de verão. Os valores são apresentados em média e desvio padrão.

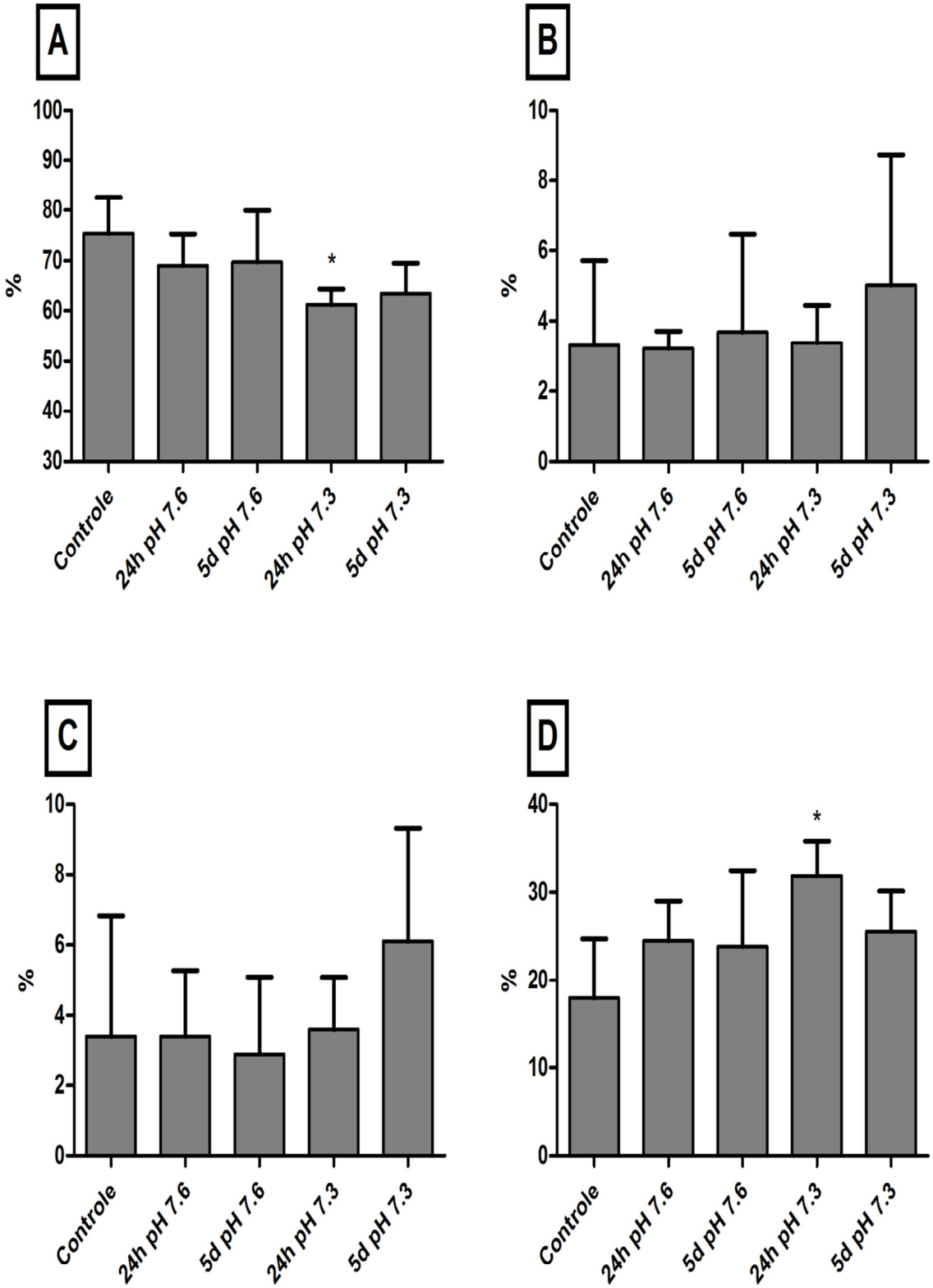
	Lytechinus variegatus	***Echinometra lucunter***
Tratamentos	CF	CF
Controle	48,56% ± 3,14	48,86 ± 5,69
24h pH 7,6	49,36 ± 6,92	48,61 ± 5,69
5 dias pH 7,6	29,31% ± 5,92	33,26% ± 9,43
24h pH 7,3	32,41% ± 11,94	25,98% ± 3,39
5 dias pH 7,3	24,51% ± 4,63	18,78% ± 6,74

Figura 16 – Proporção dos tipos celulares da espécie *Lytechinus variegatus* após exposição à águas acidificadas durante o verão



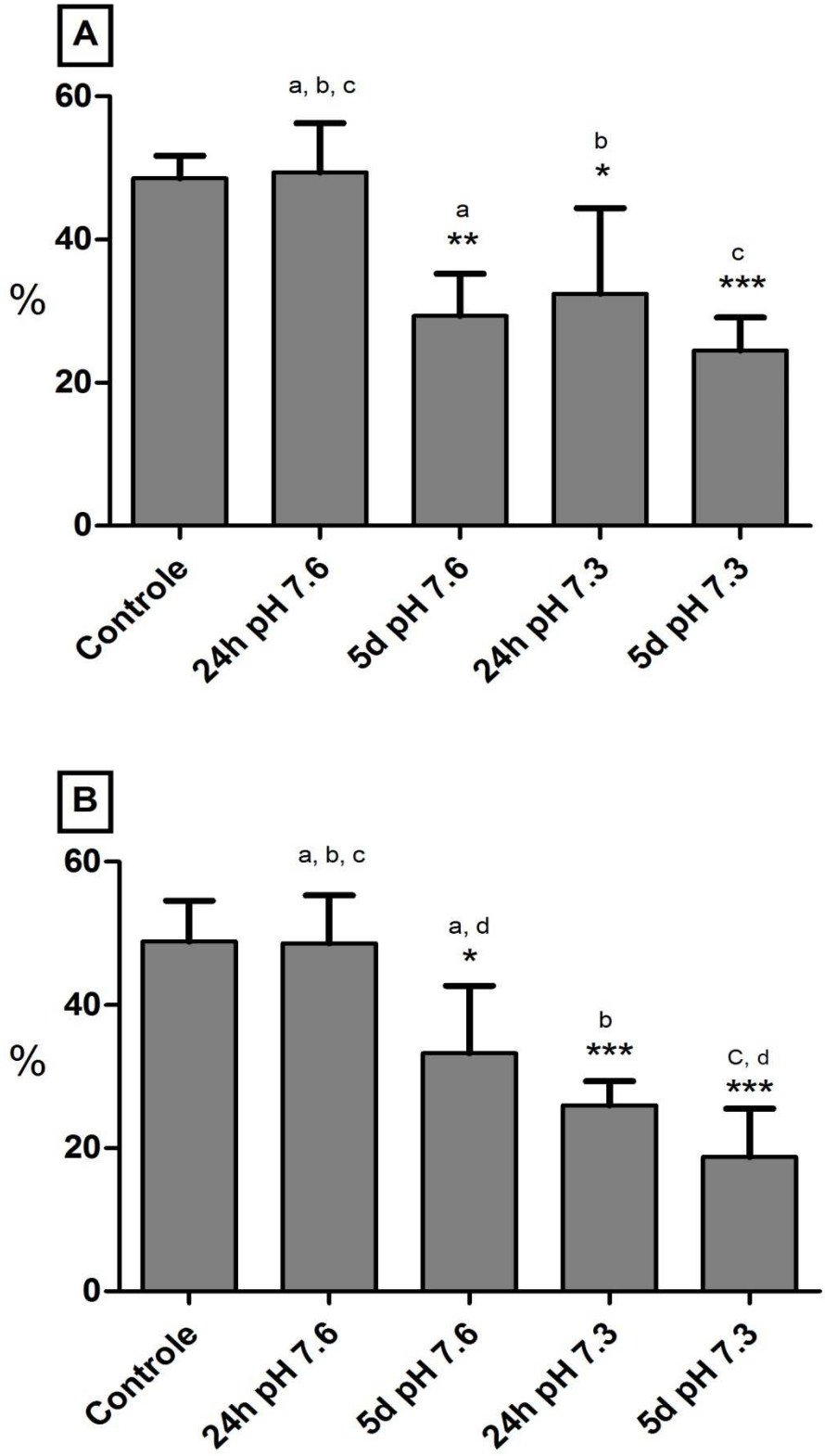
. A- Amebócitos fagociticos, B- Esferulócitos incolores, C- Esferulócitos vermelhos e D- Células vibráteis.

Figura 17 – Proporção dos tipos celulares da espécie *Echinometra lucunter* após exposição à águas acidificadas durante o verão.



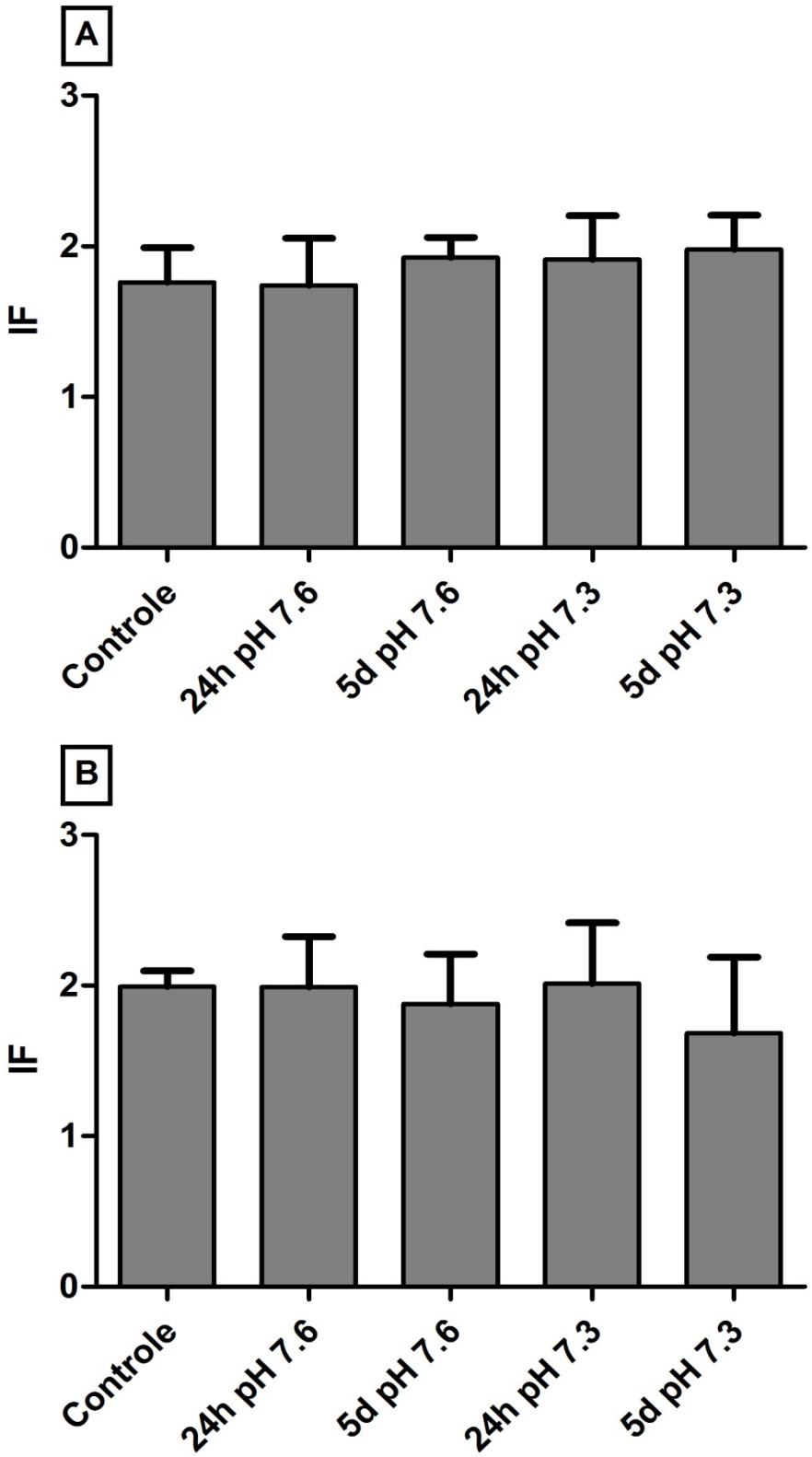
A- Amebócitos fagociticos, B- Esferulócitos incolores, C- Esferulócitos vermelhos e D- Células vibráteis.

Figura 18 - Capacidade fagocítica das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos a águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o verão.



* indica diferença significativa com o grupo controle; letras iguais indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. *p<0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001

Figura 19 - Índice fagocítico das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos a águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o verão.



4.2.4 pH do liquido celomático

O pH do liquido celomático apresentou diminuição significativa em todos os grupos experimentais comparados ao controle, nas duas espécies testadas.

Na espécie *L. variegatus* o menor valor foi encontrado após o período de 24 horas de exposição ao pH 7,3 (Tabela 5). Houve também diferenças significativas entre os grupos experimentais: os grupos expostos ao pH 7,3 por 24 horas, cinco dias, e o grupo exposto ao pH 7,6 por cinco dias, apresentaram diminuição significativa comparados ao grupo exposto ao pH 7,6 por 24 horas (Figura 20 A).

Para a espécie *E. lucunter* os menores valores foram encontrados nos grupos experimentais expostos por 24 horas tanto no pH 7,6, quanto no pH 7,3 (Tabela 5). Após a exposição por cinco dias o pH do líquido celomático aumentou no grupo de pH 7,6, e no grupo exposto ao pH 7,3; porém esse aumento não foi significativo (Figura 20 B).

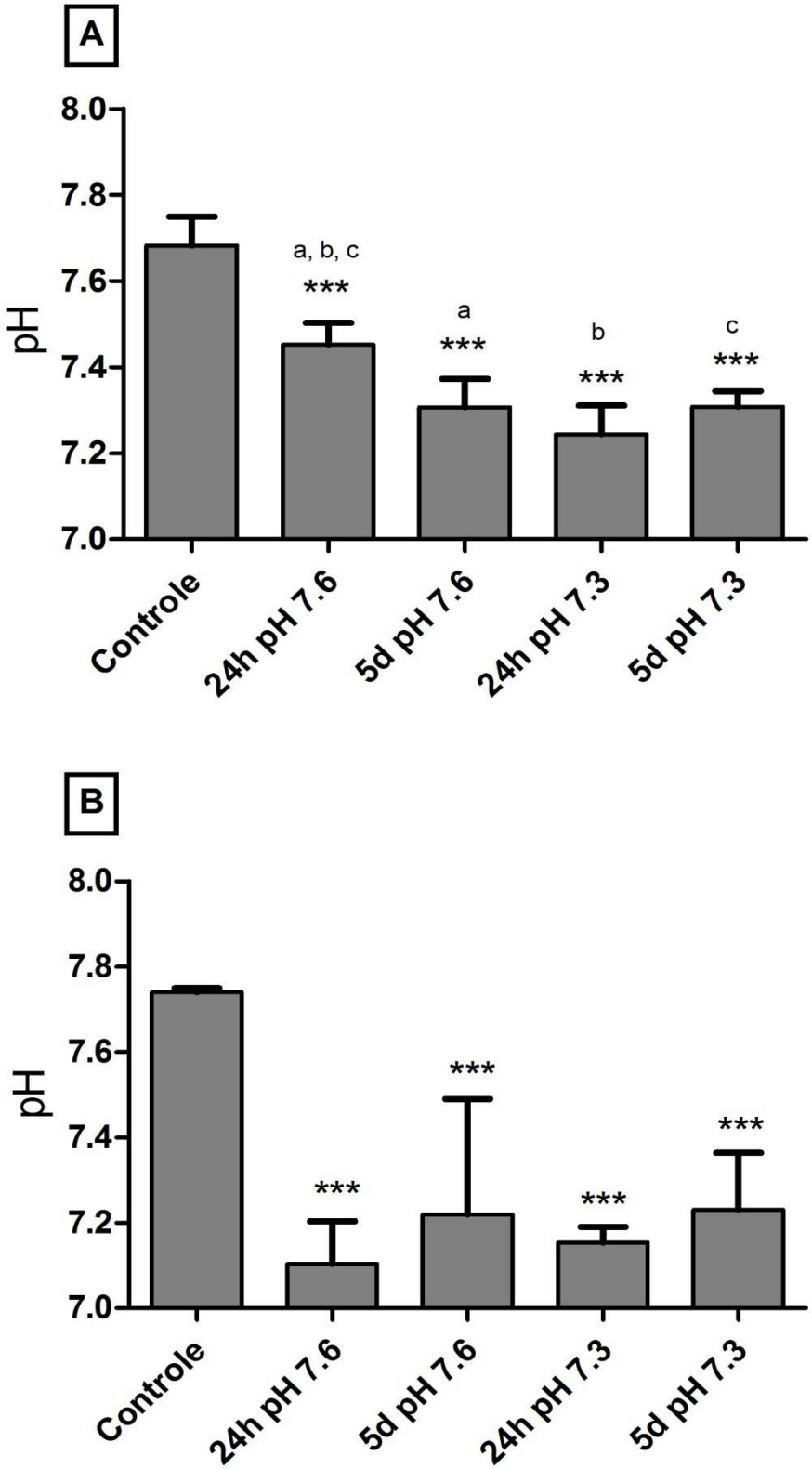
Durante a exposição dos animais, assim como observado no inverno, os espinhos dos animais ficaram fracos e quebradiços, sendo isto observado a partir do terceiro dia de exposição, principalmente ao pH mais baixo, ficando mais acentuado conforme o passar dos dias. No quinto dia de exposição os espinhos caiam e quebravam até mesmo durante a manipulação dos animais.

Tabela 5- Valores de pH do líquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* analisados após exposição à águas com diferentes pHs durante o verão.

	Lytechinus variegatus	***Echinometra lucunter***
	pH	pH
Controle	7,68 ± 0,06	7,74 ± 0,01
24h pH 7,6	7,45 ± 0,05	7,10 ± 0,09
5 dias pH 7,6	7,30 ± 0,06	7,22 ± 0,26
24h pH 7,3	7,24 ± 0,06	7,15 ± 0,03
5 dias pH 7,3	7,30 ± 0,03	7,23 ± 0,13

Os valores são apresentados em média e desvio padrão.

Figura 20 – Valores de pH do liquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o verão.



*** indica diferença significativa com o grupo controle ($p<0,001$); letras iguais indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais.

4.2.5 Capacidade de adesão e espraiamento celular

Com relação à capacidade de adesão celular, não houve diferenças significativas em nenhuma das espécies testadas em nenhum pH ou período analisados. Já na capacidade de espraiamento celular, a espécie *E. lucunter* apresentou uma diminuição significativa após cinco dias de exposição ao pH 7,6, somente no período de 60 minutos. (Figura 21).

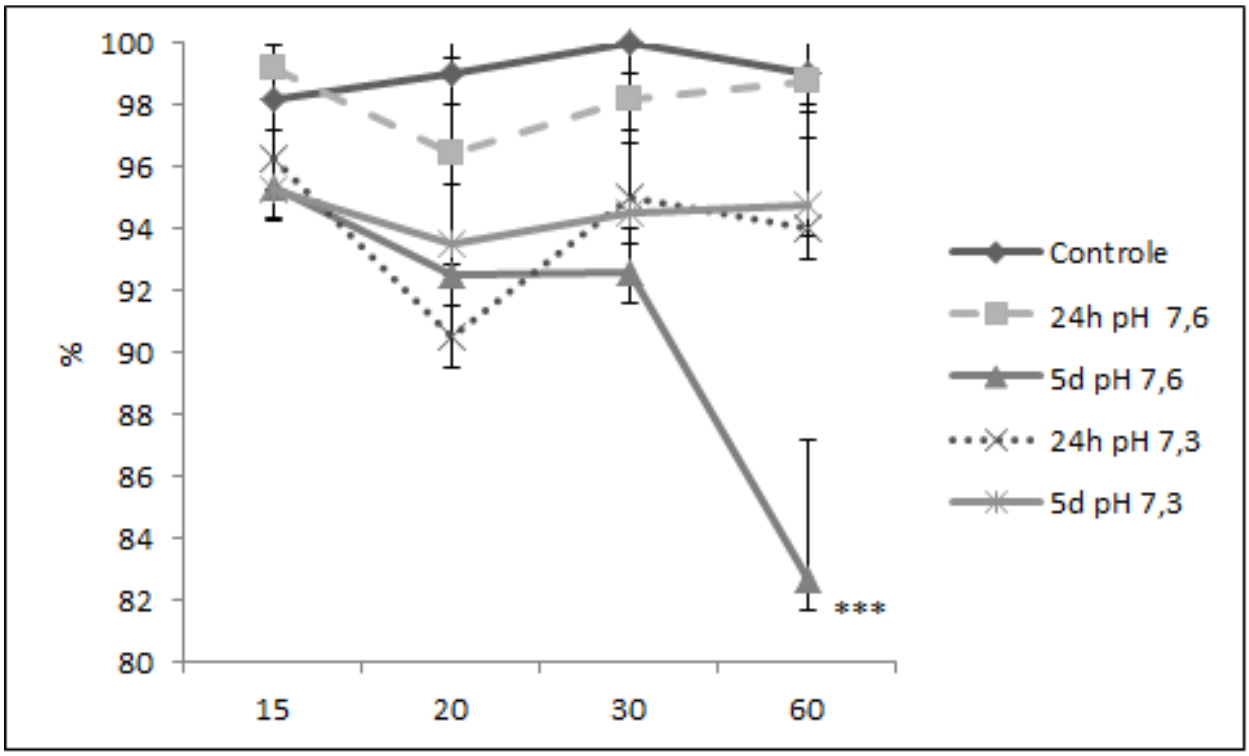
Não houve diferença significativa neste parâmetro para a espécie *L. variegatus*, porém ao analisar as fotos das duas espécies percebemos que as células, após o período de 60 minutos, estavam pouco espraiadas apresentando poucos lamelipódios e filopódios (Figura 22). Assim decidiu-se analisar também a área de espraiamento dessas células.

Ambas as espécies apresentaram diminuição significativa na área de espraiamento celular após o período de 60 minutos em todos os grupos experimentais (Figura 23). Os menores valores foram encontrados no período de exposição de 24 horas ao pH 7,6 na espécie *L. Variegatus* e no período de cinco dias também após exposição ao pH 7,6 na espécie *E. lucunter* (Tabela 6).

Tabela 6- Área de espraiamento dos amebócitos fagocíticos após 60 minutos de incubação em câmara úmida.

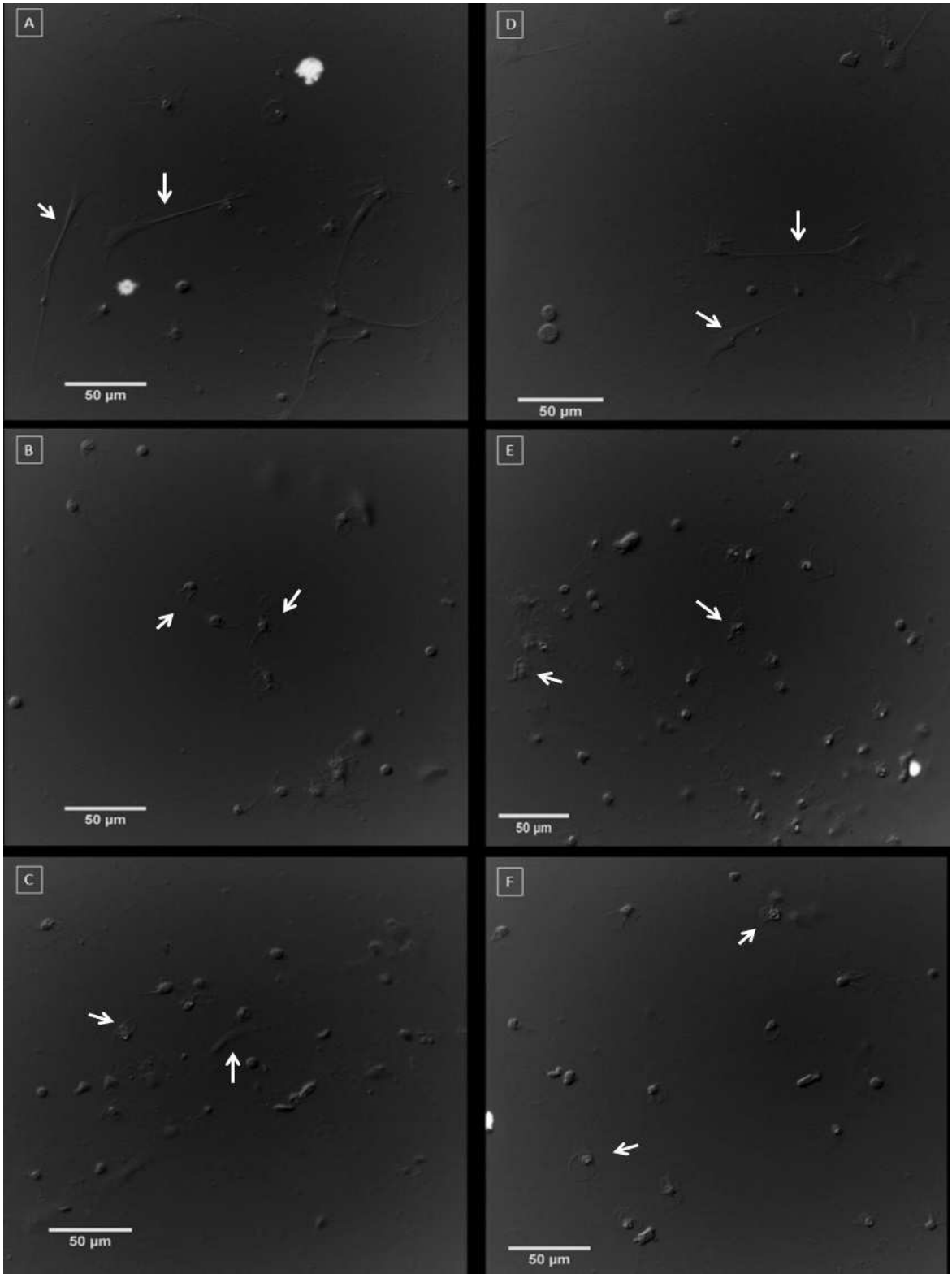
	Lytechinus variegatus	***Echinometra lucunter***
	µm	µm
Controle	487,04 ± 81,37	340,11 ± 127,43
24h pH 7,6	155,72 ± 45,67	189,94 ± 47,38
5 dias pH 7,6	232,23 ± 63,31	153,19 ± 5,29
24h pH 7,3	224,84 ± 33,26	209,32 ± 43,77
5 dias pH 7,3	219,46 ± 50,31	187,10 ± 24,69

Figura 21 – Área de espraiamento celular da espécie *Echinometra lucunter* após exposição à águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias.



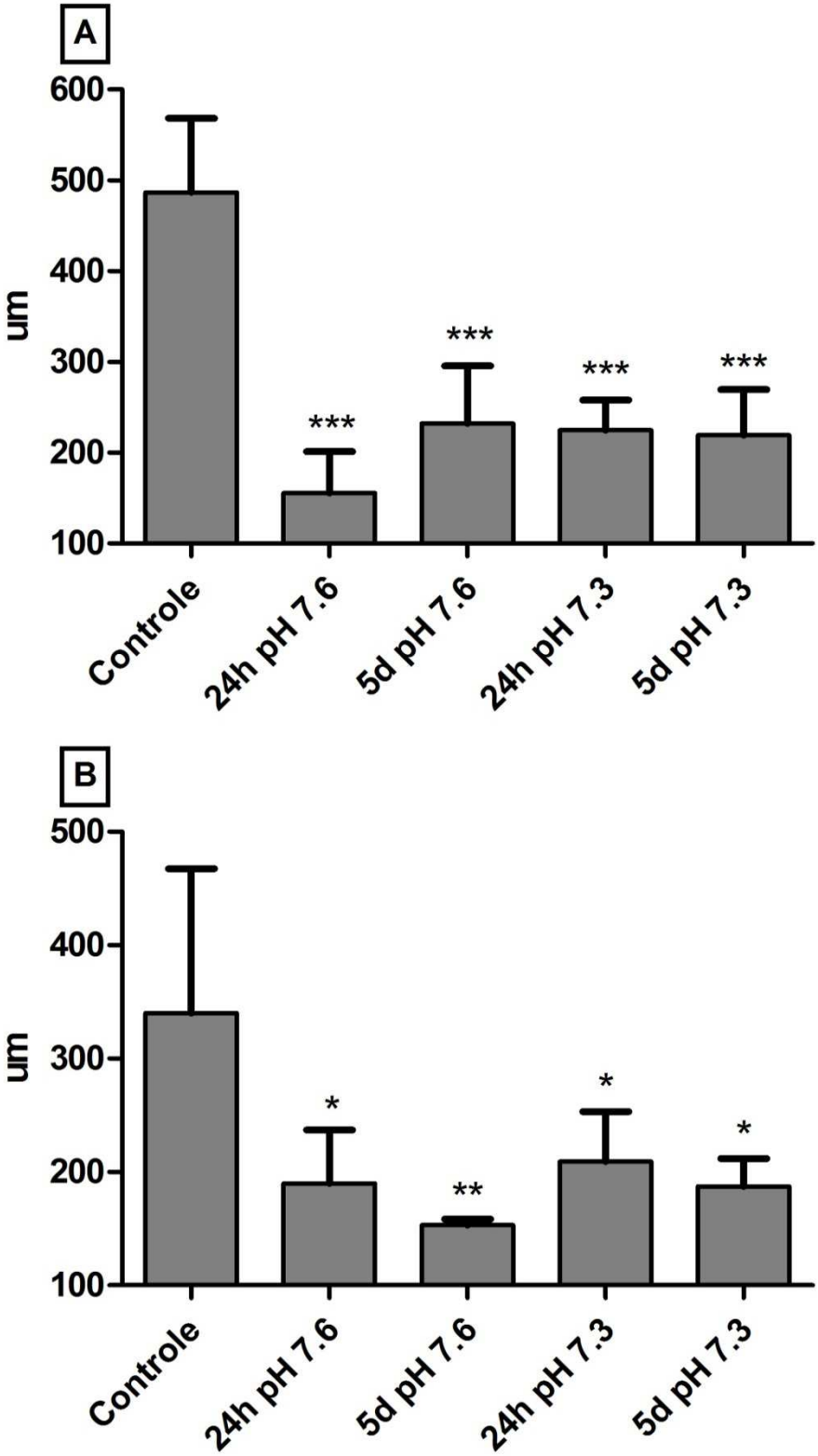
*** indica diferença significativa com o grupo controle (p<0,001).

Figura 22 – Celomócitos da espécie *L. variegatus* (A, B e C) e *E. lucunter* (D, E e F) expostos por 24 horas e cinco dias ao pH 7,3, fotografados após período de espraiamento de 60 minutos.



A, D - grupos controle; B, E - exposição por 24 horas; C, F - exposição por cinco dias. Setas indicam as diferenças na morfologia celular entre os grupos.

Figura 23 – Área de espraiamento celular das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra Lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período de 24 horas e cinco dias durante o verão.



* indica diferença significativa com o grupo controle. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

4.3 Verão X Inverno

Com a intenção de avaliar se existe uma resposta sazonal frente à acidificação oceânica, foi avaliado se havia alteração significativa nos parâmetros analisados entre as estações de verão e inverno onde a temperatura da água varia de 25 ºC ± 3 durante o verão e 22 ºC ± 2 durante o inverno (média das mensurações diárias realizadas pelos técnicos do CEBIMar-USP para as respectivas estações).

Não houve diferença na proporção dos tipos celulares em nenhuma das espécies comparadas nas duas estações do ano (Figuras 24 e 25). Com relação aos índices fagocíticos somente a espécie *L. variegatus* apresentou diferença significativa entre as duas estações do ano analisadas. A capacidade fagocítica foi superior durante o inverno em todos os grupos analisados, sendo essa diferença, significativa em todos os grupos exceto no grupo exposto por 24 horas ao pH 7,6 (Figura 26). Da mesma forma os valores de índice fagocítico encontrados no inverno foram superiores em todos os grupos analisados, havendo diferença significativa apenas no grupo controle e no grupo exposto por 24 horas ao pH 7,6 (Figura 27)

Já com relação ao pH do liquido celomático houve também diferenças significativas mas não de forma uniforme como ocorreu com a capacidade e os índices fagocíticos. O pH do liquido celomático, analisado durante o inverno, foi significativamente menor que o do verão nos grupos expostos por 24 horas ao pH 7,6 e por cinco dias ao pH 7,3 (Figura 28).

Figura 24 – Proporção dos tipos celulares da espécie *Lytechinus variegatus* expostos à águas acidificadas durante o verão e o inverno. A- Amebócitos fagociticos, B- Esferulócitos incolores, C- Esferulócitos vermelhos e D- Células vibráteis.

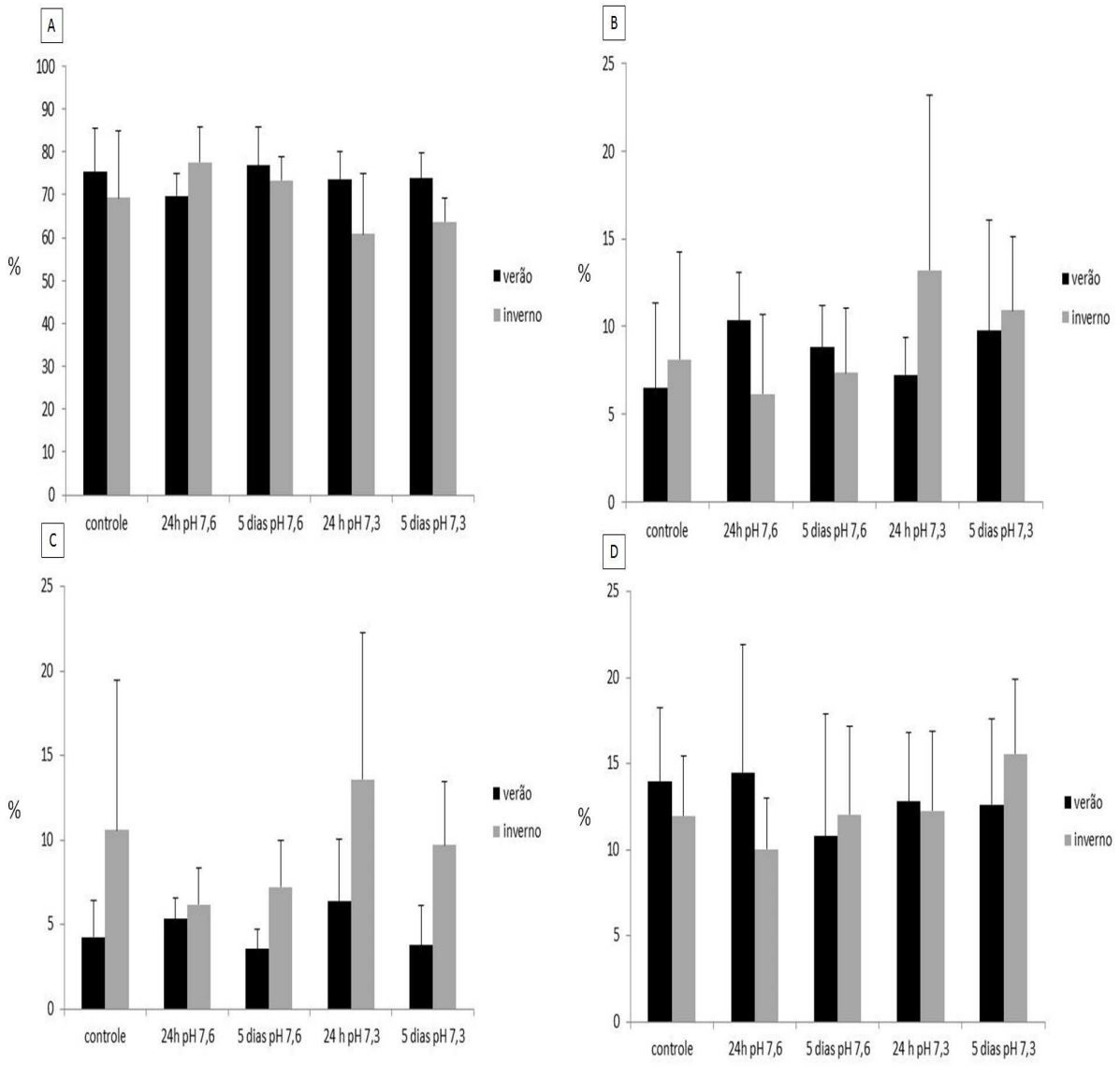


Figura 25 – Proporção dos tipos celulares da espécie *Echinometra lucunter* expostos à águas acidificadas durante o verão e o inverno. A- Amebócitos fagociticos, B- Esferulócitos incolores, C- Esferulócitos vermelhos e D- Células vibráteis.

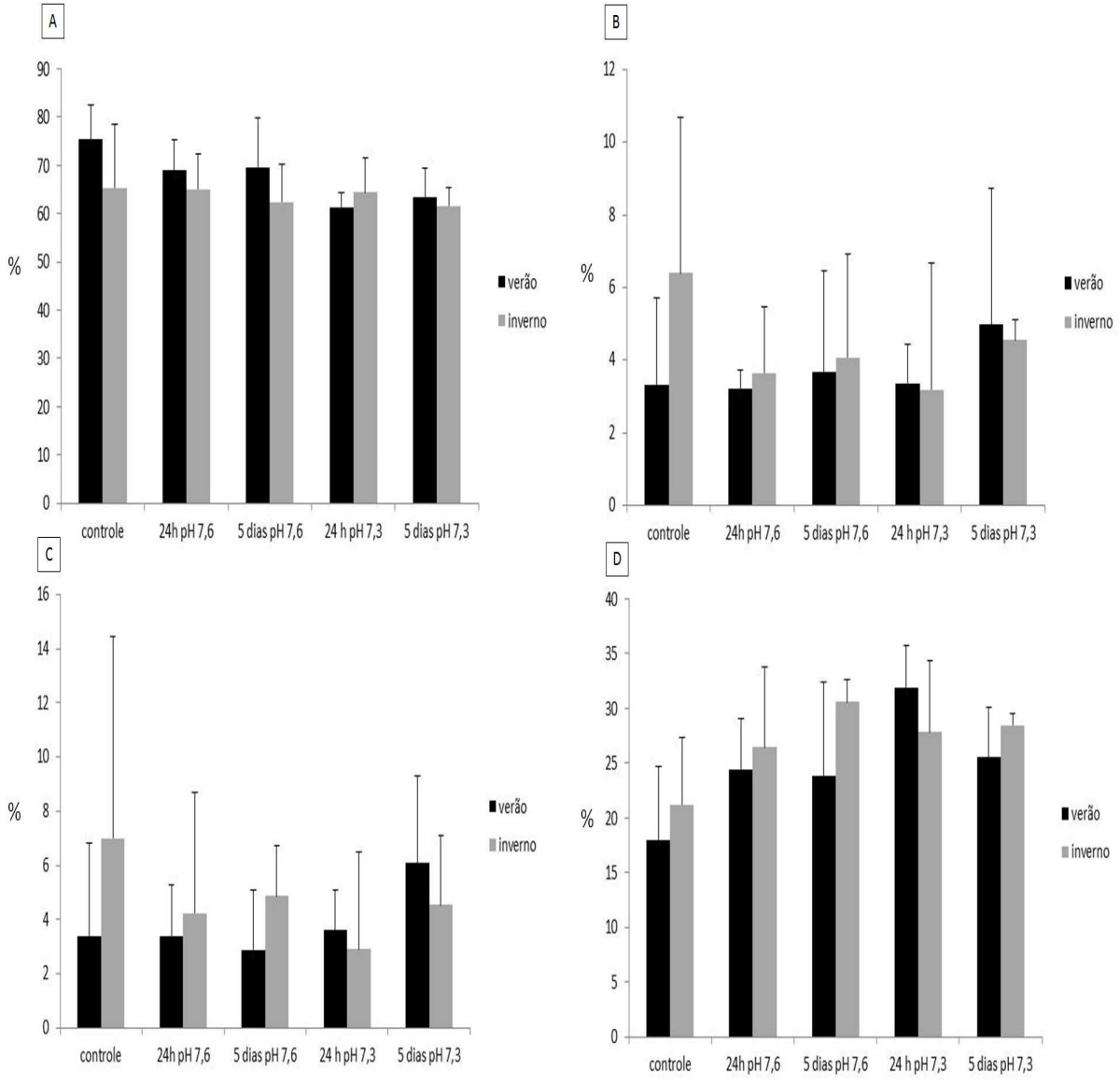
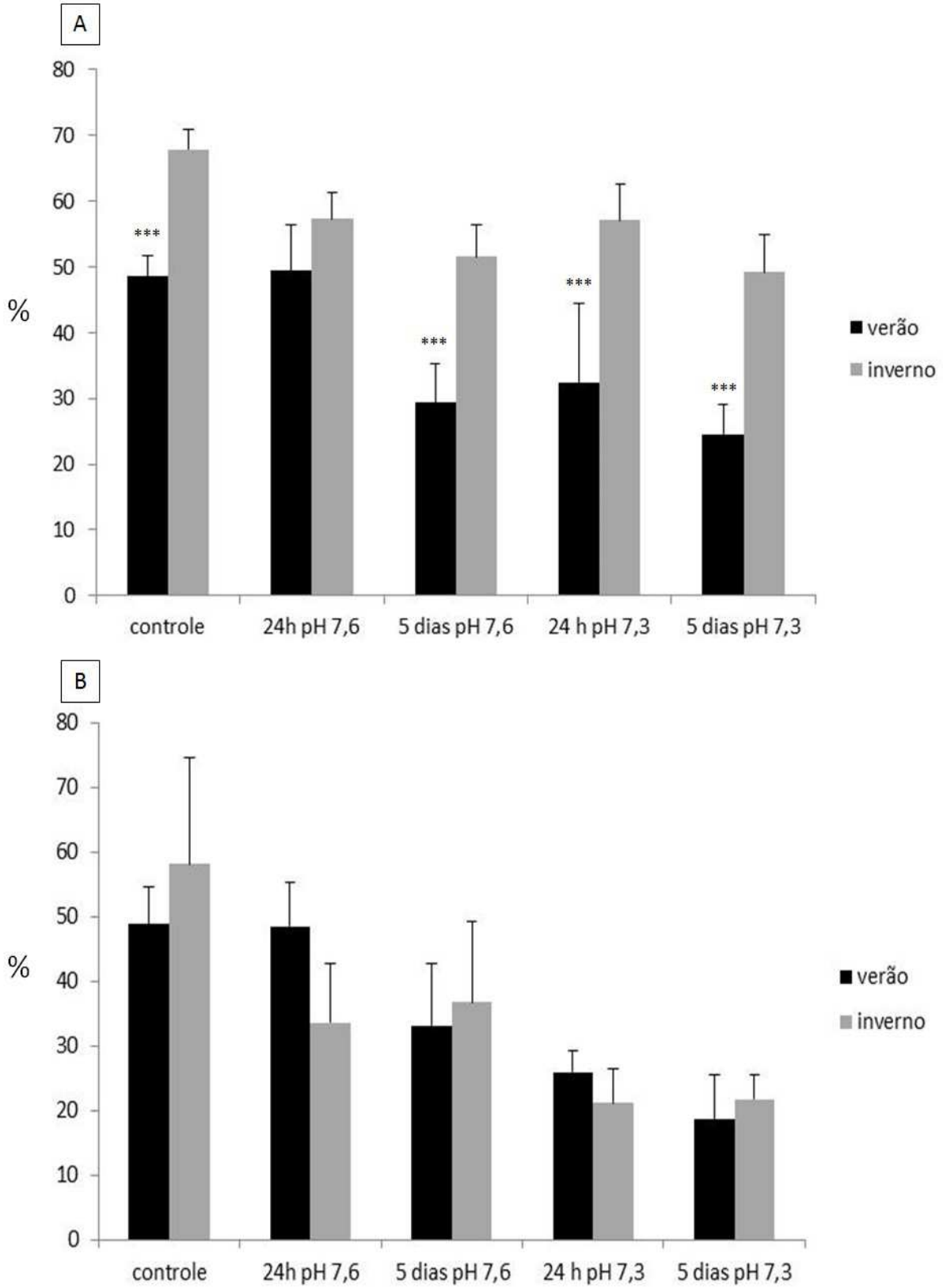
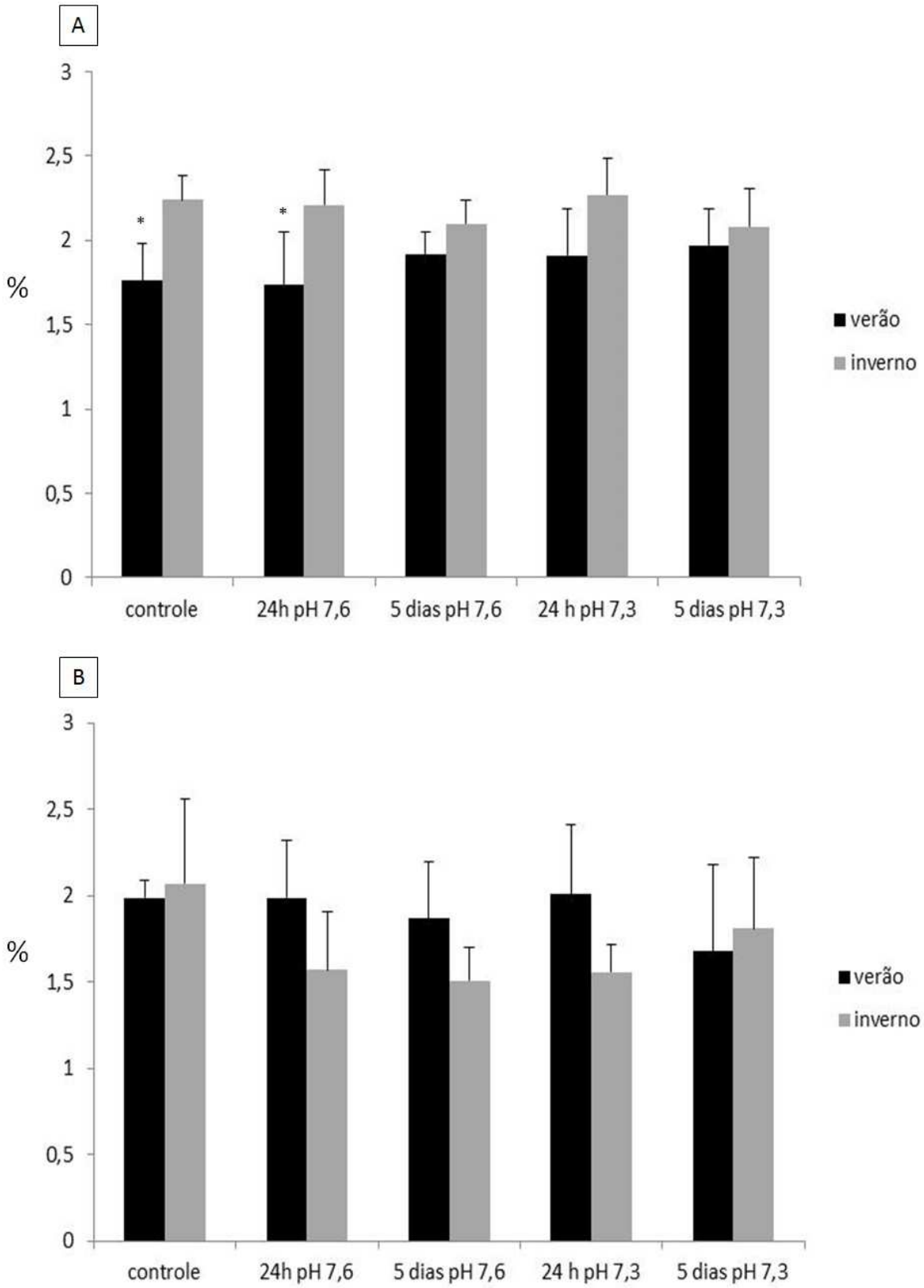


Figura 26 - Capacidade fagocítica das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas durante o verão e o inverno.



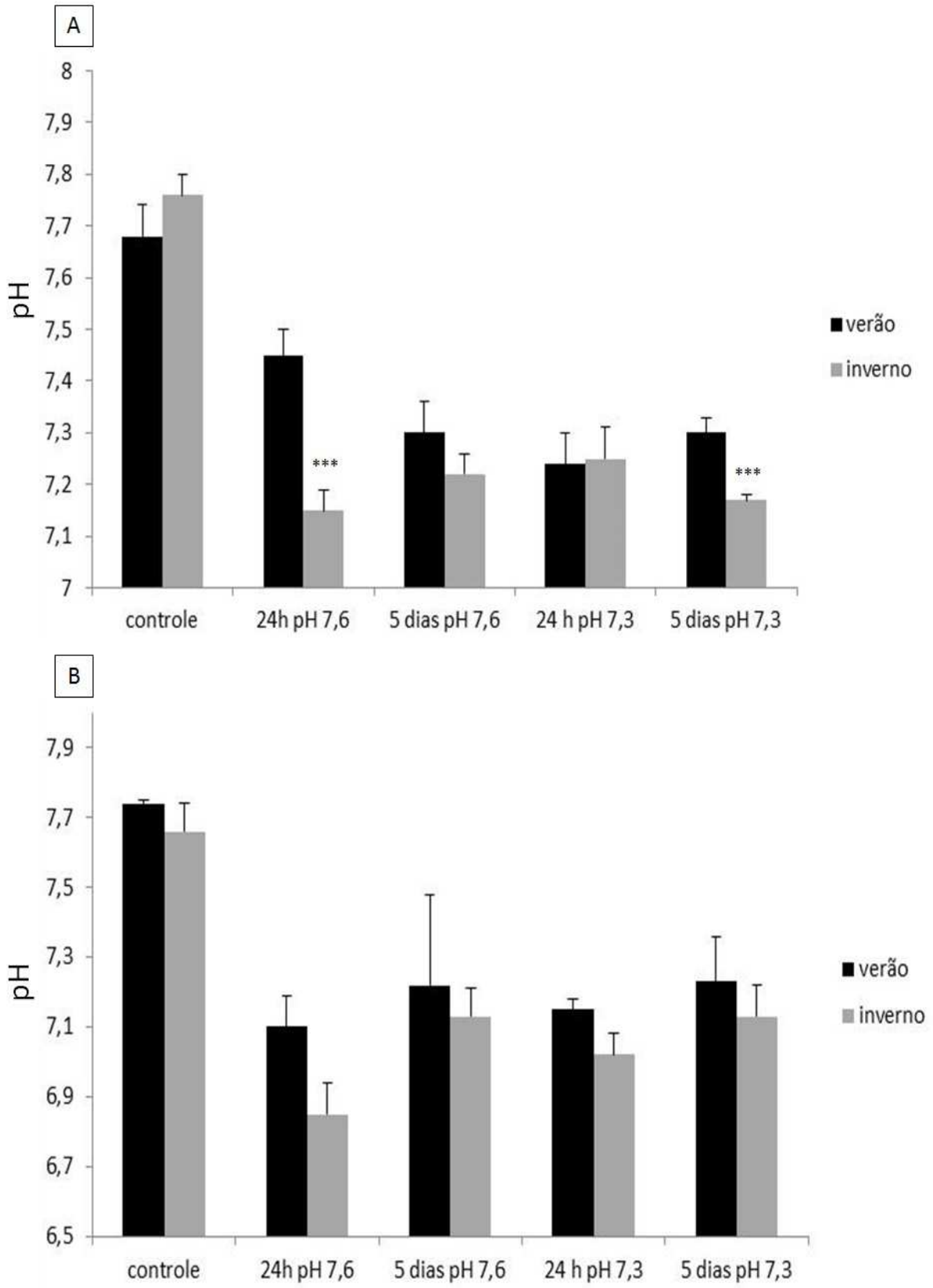
. *** indica diferença significativa entre os grupos comparados (p<0,001).

Figura 27 – Índice fagocítico das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas durante o verão e o inverno.



* indica diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos comparados.

Figura 28 – pH do líquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas durante o verão e o inverno.



*** indica diferença significativa entre os grupos comparados (p<0,001).

4.4 Teste de Recuperação

O teste de recuperação foi realizado após o término dos experimentos realizados durante o verão e o inverno e análise dos resultados, com a intenção de analisar se os animais conseguiam reestabelecer os parâmetros que foram alterados durante a exposição à águas acidificadas. Para o ensaio de recuperação foram analisados somente os grupos experimentais expostos por cinco dias ao pH 7,3, escolhido por ser o maior prazo e o menor pH.

4.4.1 Contagem diferencial dos celomócitos

Não houve alteração significativa em nenhum dos quatro tipos celulares analisados na espécie *L. variegatus* em nenhum dos tratamentos realizados, assim como ocorreu durante a exposição no inverno e no verão (Figura 29). Em contrapartida na espécie *E. lucunter* três tipos celulares apresentaram alterações significativas: amebócitos fagocíticos, esferulócitos vermelhos e esferulócitos incolores (Figura 30).

A proporção de amebócitos fagocítos diminuiu após a exposição de cinco dias ao pH 7,3 diminuiu novamente após o período de recuperação (Tabela 7).

Ao contrário dos resultados obtidos com os amebócitos fagocíticos os esferulócitos vermelhos tiveram um aumento significativo após o período de exposição ao pH 7,3 (fato que não havia ocorrido durante a análise do inverno e do verão), e aumentaram significativamente também após o período de recuperação (Figura 30 C e Tabela 7) .

A proporção de esferulócitos incolores também aumentou significativamente sendo as diferenças aqui encontradas entre o grupo controle e o grupo analisado após o período de recuperação; houve também um aumento significativo entre o grupo exposto ao pH 7,3 e o grupo que passou pelo período de recuperação (Figura 30 B e Tabela 7).

Tabela 7- Proporção dos diferentes tipos celulares encontrados no liquido celomático de ouriços-do-mar *Echinometra lucunter* após exposição a águas com diferentes pHs e após período de recuperação durante o verão. Valores apresentados como média e desvio padrão.

	Células			
	AF	EI	EV	CV
Controle	75,4 ±7,61	2,6 ± 1,09	2,58 ± 1,90	19,4 ± 6,67
5 dias pH 7,3	64,86 ± 3,27	3,89 ± 1,48	6,85 ± 2,0	22,61 ± 4,48
Recuperação	63,75 ± 6,64	8,36 ± 2,48	10,75 ± 3,10	17,12 ± 4,48

AF- Amebócitos fagocíticos, EI – Esferulócitos incolores, EV – Esferulócitos vermelhos, CV – Células vibráteis

Figura 29 – Proporção dos tipos celulares da espécie *Lytechinus variegatus* após exposição à águas acidificadas e após o período de recuperação. A- Amebócitos fagociticos, B- Esferulócitos incolores, C- Esferulócitos vermelhos e D- Células vibráteis.

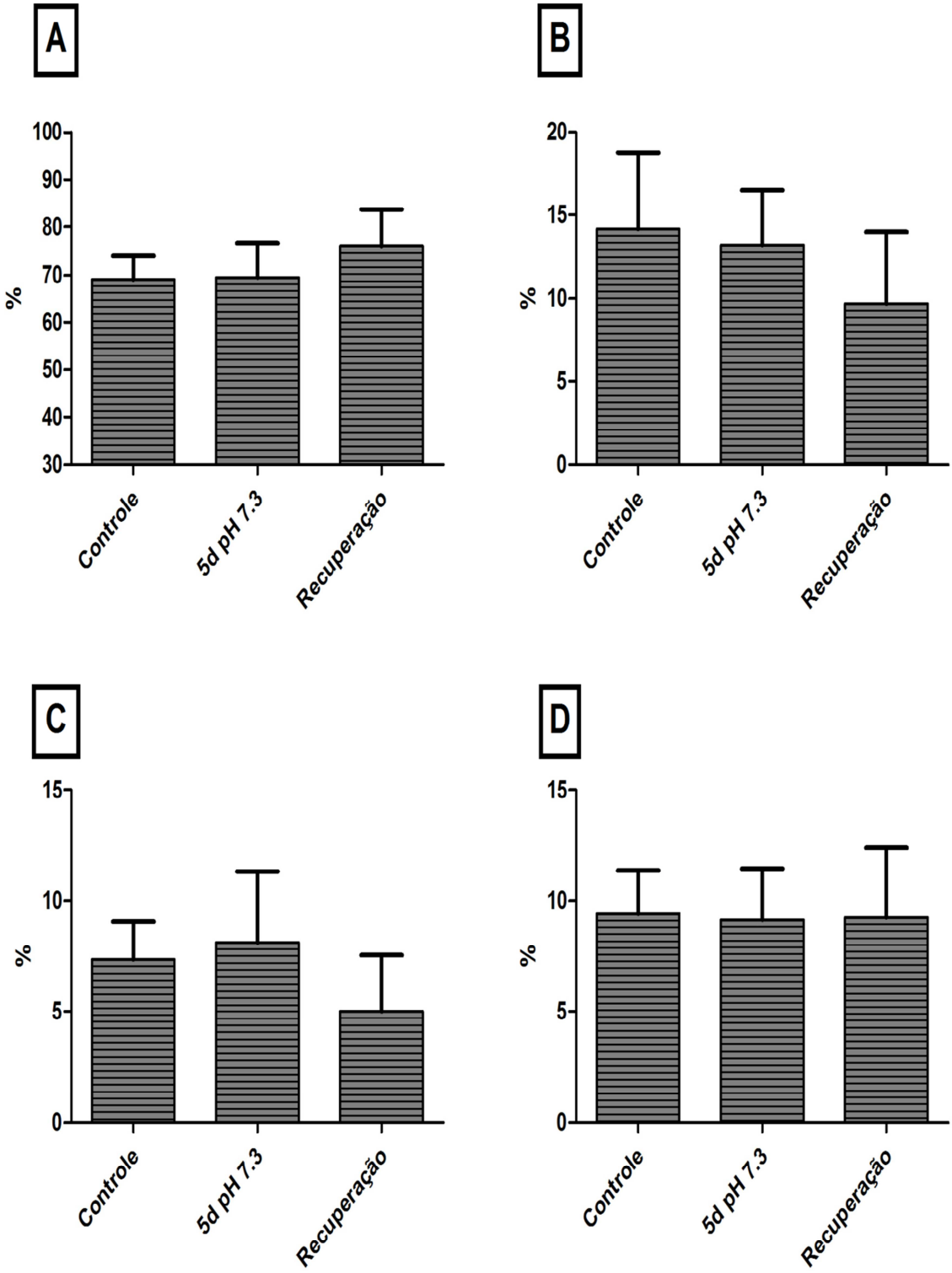
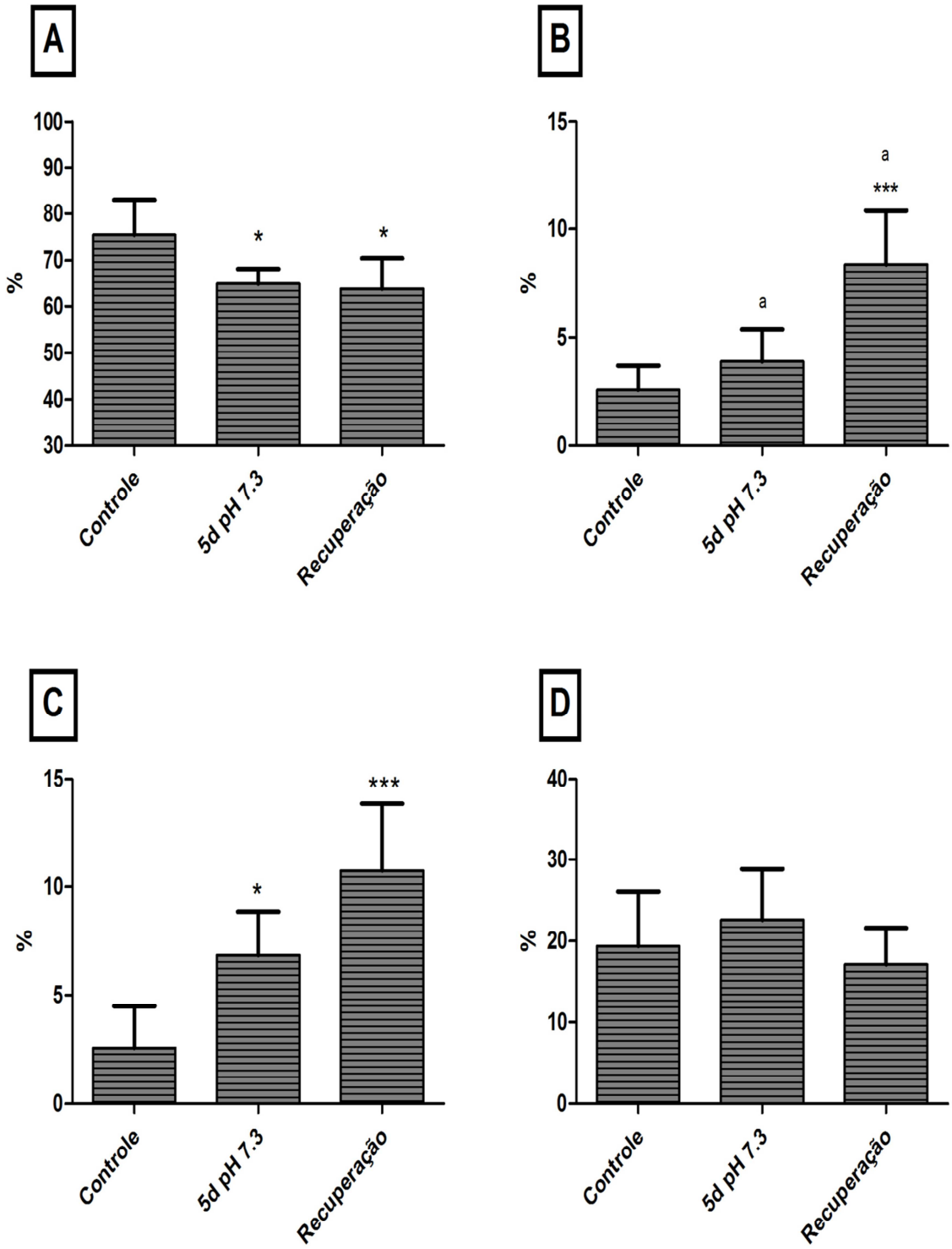


Figura 30 – Proporção dos tipos celulares da espécie *Echinometra lucunter* após exposição à águas acidificadas e após o período de recuperação. A- Amebócitos fagociticos, B- Esferulócitos incolores, C- Esferulócitos vermelhos e D- Células vibráteis.



* indica diferença significativa com o grupo controle; letras iguais indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. *p<0,05, ***p<0,001.

4.4.2 Índices fagocíticos

A capacidade fagocítica diminuiu significativamente nas duas espécies após o a exposição ao pH 7,3, assim como ocorreu nos experimentos realizados no inverno e no verão. Após o período de recuperação a capacidade fagocítica dos animais aumentou significativamente em relação aos grupos expostos ao pH 7,3, mas ainda permaneceu significativamente menor que a capacidade fagocítica dos grupos controles (Figura 31).

Para a espécie *E. lucunter* a capacidade fagocítica, diminuiu mais de 50% após a exposição ao pH 7,3 (Figura 31 B), subindo após o período de recuperação. Os valores encontrados em ambas as espécies encontram-se na Tabela 8.

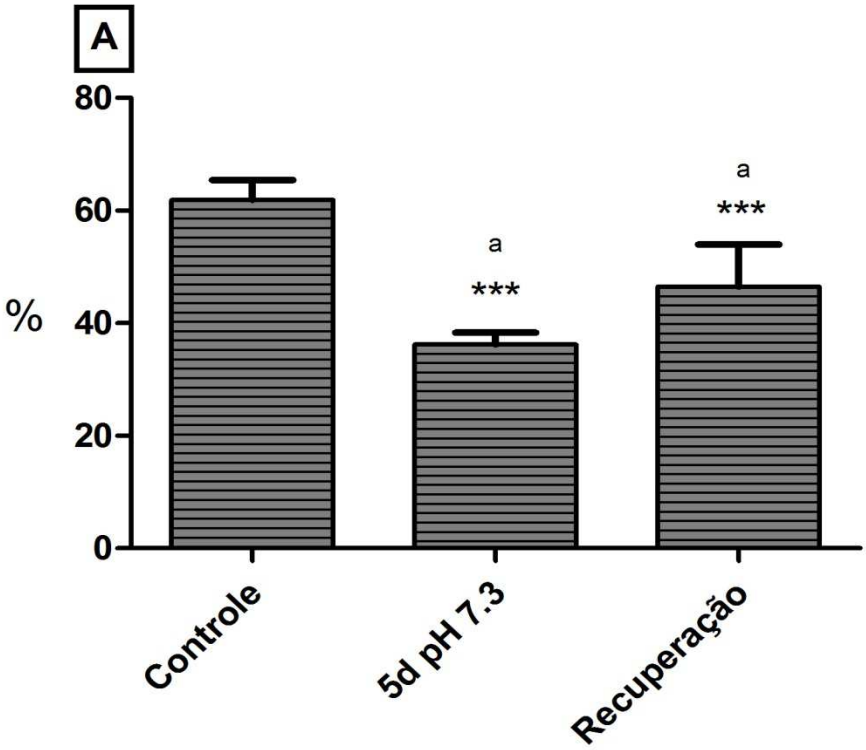
O índice fagocítico não apresentou diferença significativa em nenhum período analisado, em ambas as espécies, assim como nos experimentos realizados durante o verão e o inverno (Figura 32).

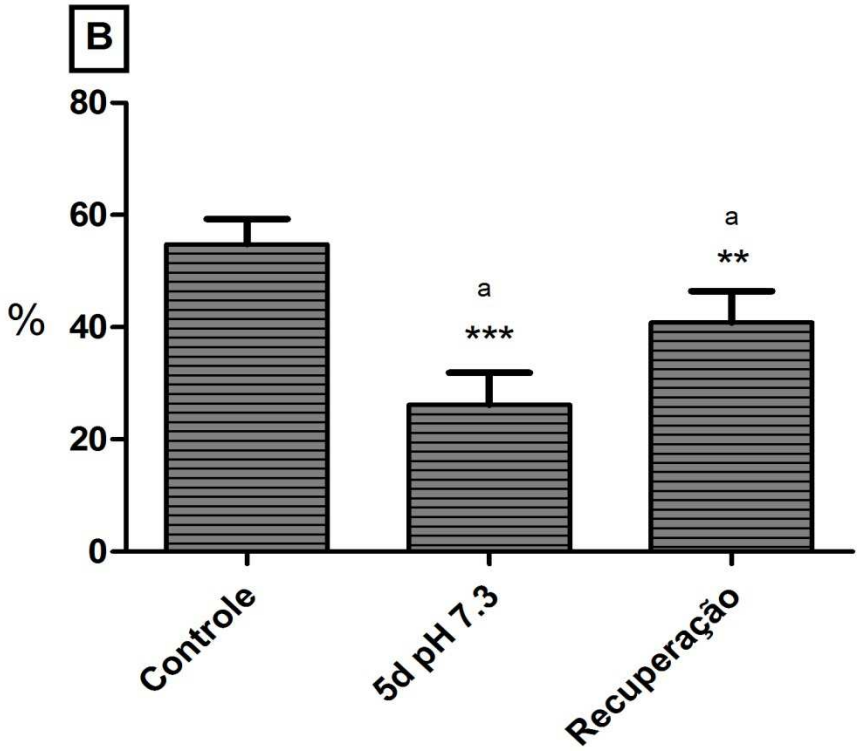
Tabela 8- Capacidade fagocítica (CF) dos ouriços-do-mar *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* expostos a águas com diferentes pHs e após período de recuperação durante o período de verão.

	Lytechinus variegatus	***Echinometra lucunter***
Tratamentos	CF	CF
Controle	61,89 ± 3,55	54,77 ± 4,5
5 dias pH 7,3	36,24 ± 2,0	26,13 ± 5,74
Recuperação	46,49 ± 7,44	40,83 ± 5,6

Os valores são apresentados em média e desvio padrão.

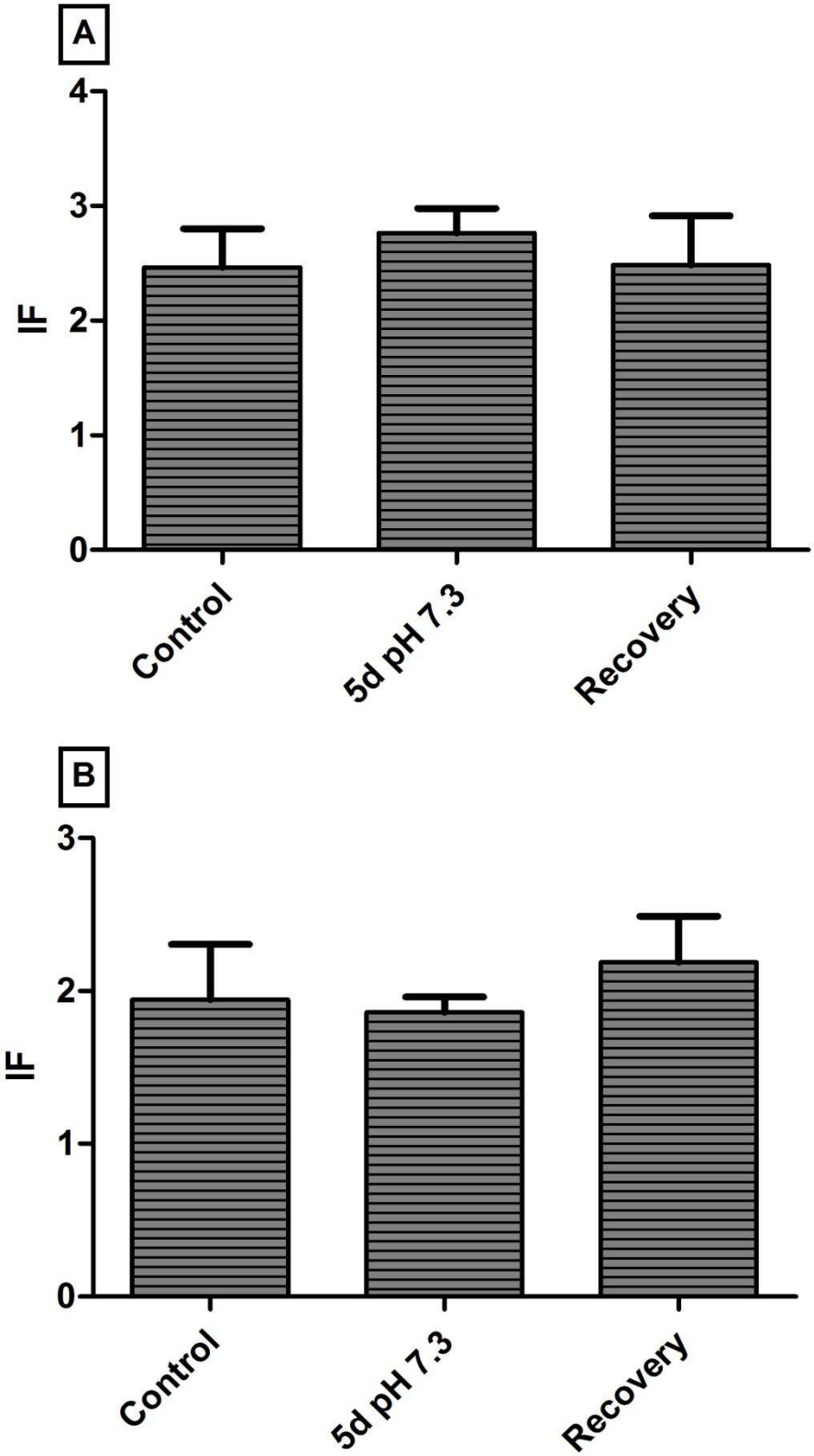
Figura 31 - Capacidade fagocítica das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período cinco diase após período de recuperação, também de cinco dias.





*** indica diferença significativa (p<0,001), com o grupo controle; letras iguais indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Figura 32 - Índice fagocítico das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período cinco dias e após período de recuperação, também de cinco dias.



4.4.3 pH do liquido celomático

O pH do liquido celomático na espécie *L. variegatus* apresentou o mesmo padrão encontrado na análise da capacidade fagocítica dessa espécie: o grupo exposto ao pH 7,3 apresentou diminuição significativa quando comparado ao grupo controle. Após o período de recuperação, o pH do liquido celomático teve um aumento significativo comparado ao grupo exposto, porém, o valor encontrado ainda era significativamente inferior ao valor encontrado no grupo controle (Figura 33 A).

Já na espécie *E. lucunter* houve diminuição significativa apenas no grupo exposto ao pH 7,3 em relação ao grupo controle. Os resultados encontrados após o período de recuperação, não apresentaram diferença significativa com nenhum dos outros grupos analisados, porém, houve neste grupo um aumento no valor do pH quando comparado ao grupo exposto ao pH 7,3 (Figura 33 B). Os valores encontrados em ambas as espécies encontram-se na Tabela 9.

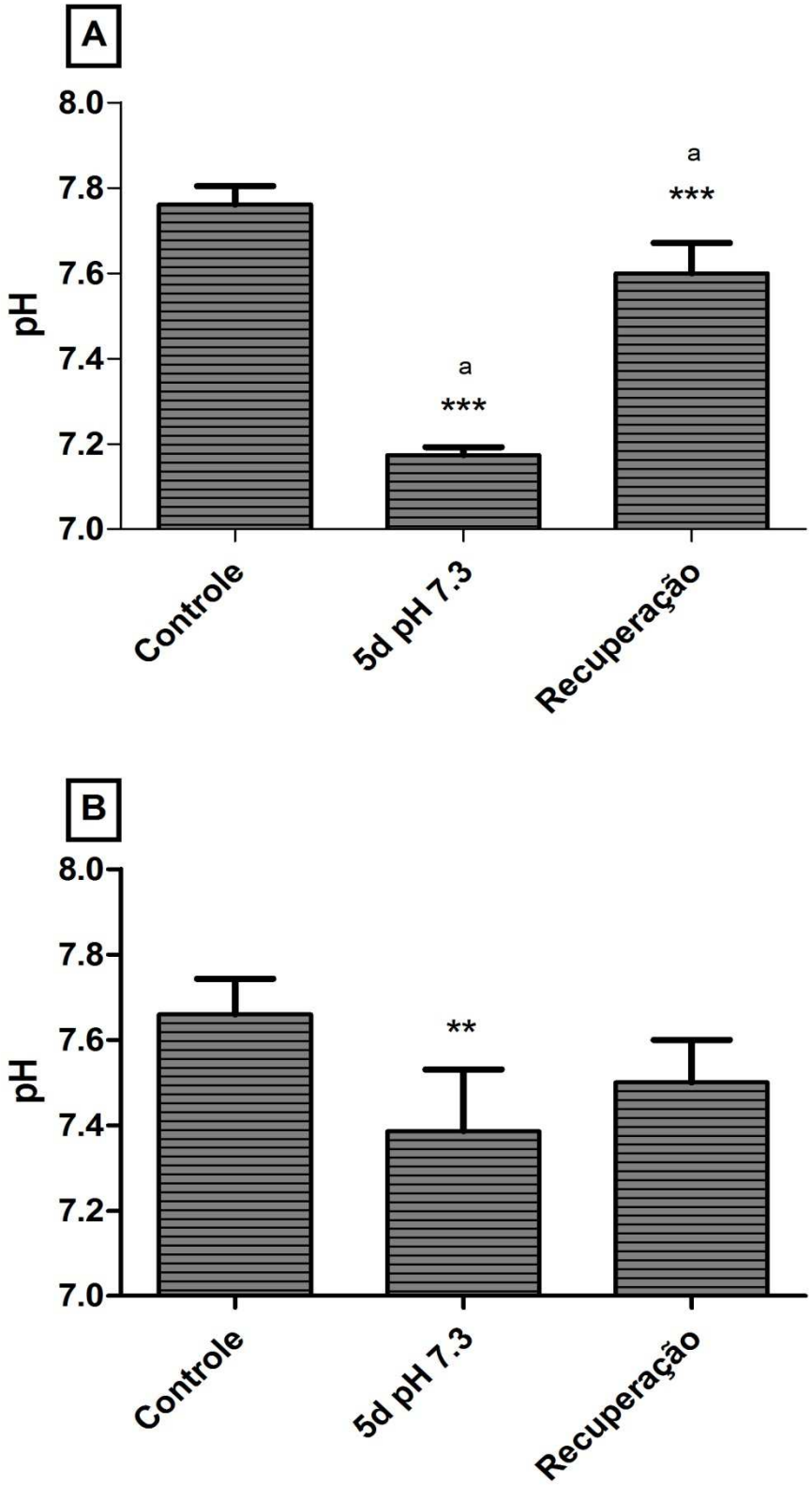
Foi também observada a queda e fragilidade dos espinhos, ocorrendo da mesma forma que nos outros experimentos. Entretanto após o período de recuperação não houve melhora aparente neste parâmetro, e a queda e quebra dos mesmos continuou durante todo o período de recuperação.

Tabela 9- Valores de pH do líquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* analisados após exposição à águas com diferentes pHs durante o verão.

	Lytechinus variegatus	***Echinometra lucunter***
Tratamentos	pH	pH
Controle	7,76 ± 0,04	7,66 ± 0,08
5 dias pH 7,3	7,17 ± 0,01	7,38 ± 0,14
Recuperação	7,6 ± 0,07	7,5 ± 0,10

Os valores são apresentados em média e desvio padrão.

Figura 33 – Valores de pH do liquido celomático das espécies *Lytechinus variegatus* (A) e *Echinometra lucunter* (B) expostos à águas acidificadas pelo período de cinco dias e após período de recuperação, também de cinco dias



. * indica diferença significativa com o grupo controle **p<0,01 e ***p<0,001; letras iguais indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais.

5 DISCUSSÃO

Os valores encontrados na contagem diferencial dos celomócitos, nos grupos analisados estavam de acordo com o descrito na literatura para ouriços-do-mar, apesar das diferenças estatísticas encontradas (Bertheussen, Seljelid 1978; Borges, 2002; Chia, Xing 2006; Faria, Silva 2007, Smith et al., 2006).

Essas alterações podem ser consideradas como uma resposta aguda à forte mudança de pH ocorrida, uma vez que essas alterações ocorreram após exposição ao pH mais baixo.

No ouriço-do-mar *Strogylocentrotus droebachiensis,* Dupont e Thorndyke (2012), descrevem dados contrários aos encontrados aqui, havendo aumento na proporção de amebócitos fagocíticos e diminuição na proporção de células vibráteis após exposição por cinco dias ao pH 7,7, essa espécie porém, habita regiões de clima temperado e essa diferença pode estar relacionada ao seu metabolismo enérgico diferenciado. Alterações na proporção dos celomócitos foram também descritas por Hernroth et al., (2011), na estrela do mar *Asterias rubens,* onde a concentração total de celomócitos diminuiu após os períodos de uma semana e seis meses de exposição a águas com pH 7,7; ainda de acordo com a literatura, a distribuição e concentração dos tipos celulares podem variar de espécie para espécie e eventualmente entre indivíduos da mesma espécie (Ramirez-Gomez, Garcia-Arrarás 2010; Smith et al., 2006). Além disso, as alterações foram encontradas apenas na espécie que habita a região de entremarés e está constantemente exposta a variações de temperatura e salinidade por exemplo; uma vez que essas alterações não foram encontradas durante o período de inverno, essas podem ser adaptações desses organismos frente à mudança de temperatura entre as estações do ano.

É importante notar que somente no teste de recuperação houve alteração significativa na proporção de esferulócitos vermelhos e incolores. Essas células são muito parecidas, apresentam basicamente o mesmo tamanho e realizam movimento ameboide (Smith et al., 2006); as funções dos esferulócitos incolores ainda não são bem conhecidas, entretanto, acredita-se que essas células e os esferulócitos vermelhos correspondem a diferentes estágios de maturação da mesma célula (Matranga, 2005).

Os esferulócitos vermelhos estão associados à atividade bactericida, à reações inflamatórias e de estresse, sendo hoje utilizados como marcadores de estresse e poluição ambiental, uma vez que encontram-se alterados frente ao aumento da temperatura (Branco et al., 2012, 2013), à contaminação por petróleo (Borges et al., 2010) e à contaminação por resíduos industriais (Matranga et al., 2000); sendo considerados como biomarcadores de estresse celular (Branco et al., 2014) . Não foram descritas até o momento, alterações neste tipo celular frente ao estresse causado pela diminuição do pH, contudo, assim como os resultados obtidos nos nossos experimentos, Dupont e Thorndyke (2012) também não encontraram alterações neste tipo celular, o que indica que provavelmente existam outras respostas associadas ao estresse causado por alterações no pH.

Uma provável causa para as alterações nestes dois tipos celulares podem estar relacionadas à um estresse de confinamento uma vez que para o teste de recuperação os animais ficaram expostos por um período total de 15 dias, e não cinco como ocorreu com todos os outros grupos analisados.

O único tipo celular capaz de realizar fagocitose foi o amebócito fagocítico, assim como descrito por Bertheussen, (1981) e Silva et al., (2013). Essas células estão relacionadas com o reconhecimento e eliminação de invasores, através da fagocitose, ocorrendo em todos os animais, sendo considerados importantes mecanismos de defesa inespecífica (Secombes, Fletcher 1992).

O índice fagocítico, que representa a quantidade de leveduras fagocitadas por cada amebócito, não apresentou diferença em nenhuma das espécies analisadas em nenhum período ou pH testados. Este parâmetro também não apresentou alterações após exposição à águas com temperaturas elevadas no ouriço antártico *Sterechinus neumayeri* (Branco et al., 2012). Em contrapartida Borges et al., (2002) observou um aumento nesse parâmetro conforme o aumento do tempo de avaliação, na mesma espécie polar, porém, sem exposição prévia a nenhum agente estressor

A capacidade fagocítica se refere à capacidade das células em realizar a fagocitose, mecanismo essencial nas reações de defesa de um organismo. Este parâmetro foi bastante afetado nas duas espécies analisadas tanto no verão quanto no inverno. Os estudos sobre os efeitos da acidificação oceânica no sistema imune são escassos, Hernroth et al., (2011) descreveram uma diminuição na capacidade fagocítica em *A. Rubens* após o período de uma semana e seis meses de

exposição à aguas acidificadas. Dupont e Thorndyke, (2012) analisaram a resposta immune de equinodermos antárticos através da proporção dos celomócitos e correlacionaram as alterações na proporção dessas células com a eficiência da resposta imune. Esta correlação, contudo, não se aplica aos resultados encontrados em nosso estudo, uma vez que não houve diferença significativa na proporção dos celomócitos em nenhuma das espécies analisadas durante o inverno, assim como na espécie *L. variegatus* durante o verão, todavia a capacidade fagocítica diminuiu significativamente nas duas espécies em praticamente todos os grupos analisados.

Dados interessantes foram encontrados no teste de recuperação, onde as duas espécies apresentaram resposta muito semelhante: após o período de exposição ao pH 7,3 a capacidade fagocítica diminuiu significativamente, porém após o período de recuperação houve um aumento significativo em relação ao grupo exposto. Os valores encontrados após o período de recuperação continuaram significativamente inferiores aos valores encontrados nos grupos controles, porém mostram que com o reestabelecimento do pH, a capacidade de realizar a fagocitose dessas células tende a aumentar. Talvez com um período de recuperação maior, essas células consigam retornar aos níveis detectados nos grupos controle.

A fagocitose é um mecanismo complexo, de extrema importância para a defesa e sobrevivência dos organismos, uma vez que é responsável pela captura e eliminação de microrganismos. Para a realização deste processo várias etapas são necessárias como a quimiotaxia, opsonização, adesão, ingestão e eliminação do microorganismo (Matranga, 2005). Assim para tentar encontrar mecanismos que pudessem explicar a grande diminuição na capacidade fagocítica, analisamos a capacidade de adesão e espraiamento dos amebócitos fagocíticos, uma vez que estes são importantes mecanismos durante o processo de fagocitose.

A adesão celular não sofreu alteração após exposição. Já com relação ao espraiamento celular somente a espécie *E. lucunter* apresentou diferenças significativas; as células de todos os grupos em ambas as espécies, apresentavam-se pouco espraiadas com aparente redução no número de lamelipódios e filopódios. Essas estruturas contêm filamentos de actina que são considerados como verdadeiros engenheiros celulares e são cruciais para a realização da migração celular (Lambrechts et al., 2004). Analisamos então a área de espraiamento dessas células para verificar se a diminuição observada era significante ou não; os resultados mostraram que todos os grupos experimentais apresentaram diminuição

significativa na área de espraiamento após o período de 60 minutos, nas duas espécies analisadas, assim, essa diminuição no espraiamento celular pode indicar alterações no citoesqueleto celular.

Em um estudo realizado com corais, Kaniewska et al., (2012) analisaram o perfil de expressão de diversos genes e demonstraram que após exposição à águas acidificadas a actina assim como diversas outras proteínas relacionadas ao citoesqueleto são suprimidas . Dentre suas diversas funções, a actina desempenha importante papel na migração celular, contratilidade, secreção e endocitose (Kaniewska et al., 2012). Para espraiar a célula emite protrusões (filopódios) que entram em contato com determinada superfície formando adesões que irão posteriormente induzir o movimento celular (Price et al., 1998). A migração celular é um processo de extrema importância nas reações imunes de um organismo (Lambrechts et al., 2004), as alterações no espraiamento celular aqui encontradas podem estar relacionadas com a diminuição na capacidade fagocítica, uma vez que a célula não consegue chegar até o microrganismo a ser fagocitado, ademais se há alteração no citoesqueto, este processo, assim como a fagocitose em si podem também estar comprometidos.

O pH do liquido celomático foi, severamente afetado pela acidificação da água do mar, nossos dados corroboram com os resultados encontrados por Miles et al., (2007) Hernroth et al., (2011) e Stumpp et al., (2012) em três diferentes espécies de equinodermos. Os menores valores encontrados nas duas espécies, analisadas foram durante o período de 24 horas de exposição, o que pode estar relacionado com uma resposta aguda à mudança de pH. Na espécie *E. lucunter* isto ocorreu nos dois pHs analisados, sendo observado um aumento neste valor após o período de cinco dias, porém, não significativo; na espécie *L. variegatus* isto foi observado apenas na exposição ao menor pH. Spicer et al., (2011) encontrou resultados muito semelhantes no ouriço-do-mar *Strongylocentrotus dröebachiensis* após exposição à águas acidificadas, corroborando com nossos resultados.

Esse aumento no pH do liquido celomático após uma diminuição aguda, é considerado como um mecanismo compensatório parcial utilizado como forma de sobrevivência dos animais, e é descrito na literatura ocorrendo através do acúmulo de bicarbonato (HCO^-_3) que é utilizado como tampão (Miles et al., 2007; Stumpp et al., 2012). O'Donnell et al., (2010) observaram que os genes envolvidos na regulação ácido-base apresentavam padrão de expressão diferenciado após

exposição á águas acidificadas onde a expressão de alguns transportadores como o de Na^+/K^+ ATPase estavam suprimidos outros como Ca^+ ATPase e *Slc4a3* (transportador de bicarbonato) foram induzidos.

Duas teorias, entretanto, têm sido utilizadas para explicar a origem do bicarbonato utilizado pelos animais: Spicer et al., (2007, 2011), Stumpp et al., (2012) e Dupont e Thorndyke (2012), acreditam que o bicarbonato é proveniente da dissolução da carapaça; sendo que, com exceção do trabalho de Dupont e Thorndyke (2012), todos os autores citados acima registraram um aumento na concentração de bicarbonato no liquido celomático após exposição à águas acidificadas.

Em contrapartida, Holtmann et al., (2013) acreditam que em períodos curtos de hipercapnia (aumento da pressão parcial de CO_2) o bicarbonato pode ser obtido através da dissolução da carapaça, porém, após um período maior de exposição o bicarbonato provém da reabsorção através do epitélio intestinal. Mecanismos de reabsorção através do epitélio intestinal também foram descritos por Vidolin et al., (2007). Catarino et al., (2012) também sugere a existência de um sistema carbonato responsável pela capacidade de tamponamento do liquido celomático, contudo, este não ocorre através da dissolução da carapaça, podendo ocorrer também pelo conteúdo proteico.

Acreditava-se que os ouriços-do-mar não tinham capacidade de regular seu sistema ácido-base, entretanto, apesar das diferentes teorias, os resultados desses estudos mostram que esses animais possuem certa capacidade regulatória; Dupont e Thorndyke, (2012) mostraram que na espécie polar *S. droebachiensis* a compensação no pH do liquido celomático foi total, sendo agora necessários estudos com longos períodos de exposição para verificar se esses parâmetros se mantêm a longo prazo e para analisar se esta compensação total pode ser um mecanismo conservado em outras espécies.

O teste de recuperação mostrou que com o retorno do pH ao valor normal, o pH do liquido celomático também aumentou, porém ainda com valores abaixo dos encontrados nos grupos controle; da mesma forma que ocorreu com a capacidade fagocítica, indicando que essas alterações podem ser reversíveis com o reestabelecimento do pH.

A dissolução da carapaça mencionada anteriormente pode estar também relacionada com a queda de espinhos, observada nas duas espécies analisadas.

Essa queda e fragilidade dos espinhos foi também observada por Holtmann et al., (2013), os autores sugerem também que devido ao contato com a água acidificada pequenas fraturas podem ocorrer no epitélio que recobre os espinhos, permitindo o contato destes com a água ácida, induzindo assim, uma dissolução parcial dos mesmos. Outra possível explicação pode estar relacionada com a expressão gênica desses animais, Todgham e Hofmann (2009) descrevem uma diminuição na expressão de genes envolvidos na biomineralização e no metabolismo energético em *S. purpuratus*. Da mesma forma Liu et al., (2012) demonstrou supressão em genes relacionados à calcificação na ostra *Pinctada fucata*. É importante lembrar que os espinhos são também mecanismos de defesa e sua fragilidade é prejudicial para a sobrevivência desses animais.

A redução do pH alterou respostas fisiológicas importantes nas duas espécies analisadas neste trabalho. Não é possível afirmar se uma espécie é mais resistente que outra uma vez que pouco se sabe ainda sobre os efeitos da acidificação oceânica nesses animais. Os experimentos foram realizados durante duas estações do ano, verão e inverno, com a intenção de avaliar se havia diferença no comportamento dessas espécies em condições opostas de temperatura.

A comparação dos resultados obtidos nas duas estações mostram que durante o verão a capacidade fagocítica da espécie *L. variegatus* foi significativamente menor que a do inverno em praticamente todos os grupos testados assim como o índice fagocítico, em contrapartida, o pH do liquido celomático foi significativamente menor no inverno em dois prazos analisados. A espécie *E. lucunter* não apresentou diferença em nenhum dos parâmetros analisados, esta resposta parece estar relacionada com o ambiente que essas espécies habitam: *L. variegatus* habita regiões de leitos de algas marinhas, ficando entre profundidades de 5 a 17 metros (Cobb, Lawrence 2005), enquanto *E. lucunter* habita regiões de águas rasas ficando geralmente no ambiente do entremarés (McClanaham, Muthiga 2007), assim esses animais estão frequentemente expostos à variações de temperatura e salinidade por exemplo, isto explicaria o fato de não haver diferenças nas respostas entre as estações do ano nesta espécie assim como nas diferenças encontradas entre a proporção dos tipos celulares no verão.

Mais estudos são necessários para compreender melhor as reações e os impactos fisiológicos observados nesses animais após exposição à águas acidificadas, principalmente estudos com prazos maiores de exposição, que poderão

ajudar a compreender se as alterações aqui observadas são realmente flutuações fisiológicas ou se podem se tornar alterações patológicas irreversíveis

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou parâmetros fisiológicos, imunes e celulares das espécies tropicais *L. variegatus* e *E. lucunter* em resposta à exposição a águas acidificadas. Nossos resultados mostraram que a exposição à águas acidificadas altera a capacidade e o índice fagocítico assim como o pH do liquido celomático, além da taxa e a área de espraiamento celular. Os resultados mostraram também respostas diferentes entre as espécies tal como entre as diferentes estações do ano analisadas. O teste de recuperação, por sua vez, mostrou que essas alterações, podem ser consideradas como uma flutuação fisiológica intermitente, uma vez que os parâmetros analisados tendem a retornar à valores próximos aos controles.

Juntos nossos resultados mostram que a acidificação oceânica pode afetar o balanço ácido-base e parâmetros imunes desses animais, prejudicando sua homeostasia e sua capacidade de combater organismos nocivos. Essas alterações podem afetar a sobrevivência das espécies analisadas, o que pode acarretar sérias consequências para todo o ecossistema marinho.

REFERÊNCIAS[1]

Abbas AK, Lichtman A H, Pillai S. Imunologia celular e molecular. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 564p

Bertheussen K. Endocytosis By Echinoid Phagocytes in vitro. I. Recognition of foreign matter. Dev Comp Immunol. 1981; 5: 241-50.

Beutler B. Innate immunity: an overview. Mol Immunol., 2004; 40(12), 845-59.

Bibby R, Widdicombe S, Parry H, Spicer,J, Pipe R. Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel Mytilus edulis. Aquat Biol. 2008; 2: 67-74

Borges JCS, Branco PC, Pressinotti LN, Severino D. Silva JRMC. Intranuclear crystalloids of Antarctic sea urchins as a biomarker for oil contamination. Polar Biol 2010; 33(6):843–49

Borges JCS, Jensch-Junior BE, Garrido PAG, Mangiaterra MBBCD, Silva JRMC. Phagocytic Amoebocyte Sub Populations in the Perivisceral Coelom of the Sea Urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). J Exp Zool. 2005; 303A: 241-48

Borges JCS, Porto-Neto LR, Mangiaterra MBBCD, Jensch-Junior BE, Silva JRMC. Phagocytosis in vitro and in vivo in the Antartic sea urchin *Sterechinus neumayeri* at 0ºC. Polar Biol. 2002 ; 25: 891-97

Botelho RJ, Grinstein S. Phagocytosis. Curr Biol. 2011; 21(14) 533-38.

Branco PC, Figueiredo DAL, Silva JRMC. New insights into innate immune system of sea urchin: coelomocytes as biosensors for environmental stress. OA Biology: 2014 No Prelo

Branco PC, Pressinotti LN, Borges JCS, Iunes RS, Kfoury JR, Silva MO, Gonzalez M, Santos MF, Peck LS, Cooper EL, Silva JRMC. Cellular biomarkers to elucidate

[1] International Comitee of Medical journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org

global warming effects on Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri.* Polar Biol, 2012; 35: 221-29

Caldeira E. Wickett K. Anthropogenic carbon and ocean pH. Nature 2003; 465: 365

Catarino AI, Bauwens M, Dubois P. Acid-base balance and metabolic response of the sea urchin Paracentrotus lividus to different seawater pH and temperatures. Environ Sci Pollut Res. 2012; 19: 2344-53

Chia F, Xing J. Echinoderm Coelomocytes. Zool Stud. 1996; 35(4): 231-54.

Cobb J, Lawrence JM. Diets and coexistence of the sea urchin Lytechinus variegatus and Arbacia punctulata (Echinodermata) along the central Florida gulf coast. Mar Ecol Prog Ser. 2005; 295: 171-82.

Dupont S, Thorndyke M. Relationship between CO2-driven changes in extracellular acid–base balance and cellular immune response in two polar echinoderm species. J Exp Mar Biol Ecol. 2012; 424-425: 32-37

Dupont SC, Havenhand J, Thorndyke W, Peck L, Thorndyke M. Near-future level of CO2-driven ocean acidification radically affects larval survival and development in the brittlestar *Ophiothrix fragilis*.. Mar Ecol Prog Ser. 2008; 373: 285-94

Durke RD, Mladenov PV Lambert P, Parsley RL. Echinoderm Biology: procedings of the sixth international echinoderm conference. Victoria - A.A. Balkema 1988

Fabry VJ, Seibel BA, Feely RA, Orr JC. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. ICES J Mar Sci. 2008; 65(3), 414-32.

Faria MT, Silva JRMC. Innate immune response in the sea urchin Echinometra lucunter (Echinodermata). J Invertebr Pathol. 2007; 98: 58-62

Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique, 2nd edn. New York 1987

Gross PS, AL-Sharif WZ, Clow LA, Smith LC. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. Dev Comp Immunol. 1999; 23(4-5), 429-42.

Harley CDG, Randall Hughes A, Hultgren KM, Miner BG, Sorte CJB, Thornber CS, Rodriguez LF, Tomanek L, Willians L. The impacts of climate change in coastal marine systems. Ecol Lett. 2006; 9(2), 228-41

Hernroth B, Baden S, Thorndyke M, Dupont S. Immune suppression of the echinoderm *Asterias rubens* (L.) following long-term ocean acidification. Aquat Toxicol. 2011; 103: 222-24

Holtmann WC, Stumpp M, Gutowska MA, Syré S, Himmerkus N, Melzner F, Bleich M. Maintenance of colemic fluid pH in sea urchins exposed to elevated CO2: the role of body cavity epithelia and stereo dissolution. Mar Biol. 2013; 160: 2631-45.

Hyman LH. The Invertebrates: Echinodermata, The coelomate Bilateria Vol.6 New York: McGraw-Hill Book Company, INC; 1955

IPCC (2007) Climate Change: the fourth assessement report of the IPCC Cambridge University Press. Cambridge 2007

Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. J biochem mol biol. 2005; 38(2), 128-50.

Kaniewska P, Campbell PR, Kline DI, Rodriguez-Lanetty M, Miller DJ, Dove S, Hoegh-Guldberg O. Major Cellular and Physiological Impacts of Ocean Acidification on a Reef Building Coral. PloS ONE 2012; 7 (4): e34659

Kobayashi N, Okamura H. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. Part 2. Interactive toxic effects of heavy metals in synthetic mine effluents. Chemosphere. 2004; 61: 1198-203

Kurihara H, Shirayama Y. Effects of increased atmospheric CO2 on sea urchin early development. Mar Ecol Prog Ser. 2004; a; 274, 161-69.

Kurihara H, Shimode S, Shirayama Y. Sub-Lethal Effects of Elevated Concentration of CO2 on Planktonic Copepods and Sea Urchins. J Oceanogr. 2004 b; 60(4), 743-50

Lambrechts A, Troys MV, Ampe C. The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. Int J Biochem. Cell Biol.. 2004; 36: 1890-909.

Liu W, Huang X, Lin J, He M. Seawater Acidification and Elevated Temperature Affect Gene Expression Patterns of the Pearl Oyster *Pinctada fucata*. PloS ONE 2012; 7(3): e33679

Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Kepler TB. Invertebrate immune systems—Not homogeneous, not simple, not well understood. Immunol Rev. 2004; 198, 10–24

Mangiaterra MBBCD, Silva JRMC. Induced inflammatory process in the sea urchin (*Lytechinus variegatus*). J Inv. Biol. 2001; 120(2):178–84.

Matranga V. Echinodermata, progress in molecular and subcellular biology. Springer Berlin Heidelberg 2005

Matranga V, Toia G, Bonaventura R, Müller WEG. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. Cell stress chaperones. 2000; 5(2): 113-20

McChanaham TR, Muthiga NA. Ecology of Echinometra. J.M. Lawrence (Ed.), Edible sea Urchins: Biology and Ecology Amsterdam ,(2.Ed) Elsevier. 2007

Michaelidis B, Ouzounis C, Paleras A, Pörtner H. Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels Mytilus galloprovincialis. Mar Ecol Prog Ser. 2005; 293: 109-18.

Miles H, Widdicombe S, Spicer JL, Hall-Spencer J. Effects of anthropogenic seawater acidification on acid-base balance in the sea urchin *Psammechinus miliaris*. Mar Pollut Bull. 2007; 54(1), 89-96.

Moulin L, Catarino AI, Claessens T, Dubois P. Effects of seawater acidification on early development of the intertidal sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). Mar Pollut Bull. 2011; 62(1), 48-54.

O'Donnell MJ, Todgham AN, Sewell MA, Hammond LM, Ruggiero K, Fangue NA, Zippay ML, Hofmann GE. Ocean acidification alters skeletogenesis and gene expression in larval sea urchins. Mar Ecol Prog.Ser. 2010; 398: 157-71

Price LS, Leng, J, Schwartz MA, Bokoch GM. Activation of Rac and Cdc42 by Integrins Mediates Cell Spreading. Mol biol cell. 1998; 9:1863-71

Ramírez-Gómez F, Garcia-Arrarás JE. Echinoderm immunity. ISJ 2010; 7: 211-20.

Royal Society. Ocean acidification due to increasing atmo- spheric carbon dioxide. Policy Document 12/05, The Royal Scoety, London 2005

Ruppert EE, Barnes RD. Zoologia dos Invertebrados 6. Ed – São Paulo: Roca; 1996

Secombes CJ, Fletcher TC. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. Ann Rev Fish Disease 1992; 2:53–71.

Silva JRMC. Immunology in sea urchins. In: Lawrence JM. (Ed.,), Sea urchins: biology and ecology. 3.ed. San Diego: Academic Press, 2013, p.187-95

Silva JR, Hernandez-Blazquez F J, Porto-Neto LR, Borges JCS. Comparative study of in vivo and in vitro phagocytosis including germicidal capacity in *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 0ºC. J invertbr pathol., 2001; 77(3), 180-85

Silva JRMC, Peck L. Induced in vitro phagocytosis of the Antarctic starfish *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 0 ºC. Polar Biol 2000; 23(4):225–30

Smith LC, Rast JP, Brocton V, Terwilleger DP, Nair SV, Bucley K M, Majestke AJ.The sea urchin immune system. ISJ 2006; 3:25-29.

Sodergren E, Wein- stock GM, Davidson EH, Cameron RA, Gibbs RA, Angerer RC, Angerer LM, Arnone MI et al., The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus.* Science 2006; 314:941– 52.

Spicer JJ, Rafoo A, Widdicombe S. Influence of CO_2-related seawater acidification on extracellular acid-base balance in the velvet swimming crab *Necora puber*. Mar Biol 2007; 151:1117-25.

Spicer JJ, Widdicombe S, Needham HR, Berge JA. Impact of CO_2-acidified seawater on the extracellular acid-base balance of the northern sea urchin *Strongylocentrotus dröebachiensis*. J Exper Mar Biol. Ecol. 2011; 407: 19-25.

Stump M, Trübenbach K, Brennecke D, HU MY, Melzner F. Resource allocation and extracellular acid-base status in the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in response to CO_2 induced seawater acidification. Aquat Toxicol. 2012; 194-207

Todgham AE, Hofmann GE. Transcriptomic response of sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* to CO2-driven seawater acidification. J Exp Biol 2009; 212, 2579–94.

Valverde LC, Meurer BC, Análise espacial de três espécies de echinoidea (echinodermata) em costões rochosos do litoral do Rio de Janeiro RJ - Congresso de Ecologia do Brasil. Anais.1-2. 2007

Vidolin D, Santos-Gouvea IA, Freire CA. Differences in ion regulation in the sea urchin *Lytechinus variegatus* and *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea) Mar Biol. 2007; 87: 769-75.

ANEXO A

Artigo: New insights into innate immune system of sea urchin: coelomocytes as biosensors for environmental stress

Publicado em: OA Biology. No Prelo

New insights into innate immune system of sea urchin: coelomocytes as biosensors for environmental stress

Paola Cristina Branco[1#], Debora Alvares Leite Figueiredo[1], José Roberto Machado Cunha da Silva[1,2]

1. Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo.
2. Marine Biology Center of University of Sao Paulo – CEBIMar-USP

Corresponding author: Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, CEP 05508-000, Sao Paulo, SP – Brazil

E-mails:
Paola C Branco: pbranco@usp.br
Débora A L Figueiredo: debora.figueal@gmail.com
José RMC Silva: jrmcs@usp.br

Manuscript type: Critical Review
All authors contributed to conception and design, manuscript preparation, read and approved the final manuscript.
Competing interests: none declared
Conflict of interests: none declared

Abstract

Introduction

In the last decade several studies reinforced the use of sea urchin as model for immunological purposes due to their phylogenetic proximity to chordates and also due to the diverse immune genes common to vertebrates. Since the year of 2000, the use of sea urchin as bioindicators for environmental stress has been suggested, especially regarding the use of their immune cells, also referred to as coelomocytes. In this critical review, we provide a brief but consistent review covering the most studied topics of innate immune system of sea urchin emphasizing the use of coelomocytes as biosensors for environmental disorders.

Conclusion

The use of coelomocytes as biomarkers is a very useful and sensitive tool to evaluate marine environmental stress. However the mechanisms by which these conditions lead to an upregulation of coelomocytes, either increasing its number or increasing the proteins or genes expressed by them, are poorly understood. We reinforce that further studies aiming to answer these questions are necessary.

Keywords: Biomarkers, innate immune system, sea urchin, coelomocytes, environmental stress

Introduction

Sea urchins belong to the deuterostome clade, sharing with chordates a common ancestry. This feature has been more explored since 2006, when the genome of *S. purpuratus* was sequenced. In this pioneer study, a sophisticated immune system mediated by an immense repertoire of innate pathogen recognition proteins has been described, containing more than 200 members of Toll Like Receptors (TLR), NOD-like receptors and Scavenger Receptors (1).

A gene family that plays an important role in immunity for sea urchins is the Sp185/333 that encodes a diverse array of putative immune response proteins. This family is readily induced in immune cells of the sea urchin in response to immune challenge (2).

Another important issue that justifies the use of sea urchins in scientific research is their use as bioindicators for environmental stress. The aim of this critical review is to provide a general view of innate immune system of sea urchin and assess the use of their coelomocytes as biosensors for environmental stressful conditions.

Sea urchin: basic characteristics and model for scientific studies

Sea urchins are benthonic animals that belong to the Echinodermata phylum, constituting the Echinoidea class. The word Echinodermata comes from the Greek *Echino=spine* and *Derma=tegument.* They present pentameric radial symmetry during their adult phase. They possess an aquatic vascular system, a simple and radial nervous system, and sexual reproduction with external fecundation (3). They are exclusively marine and are endowed with very limited capacity of locomotion, justifying their use as environmental bioindicators (4).

The classification of the Echinodermata has suffered many alterations and, in 1875, Huxley proposed the Deuterostomata clade and four phyla were introduced: Chaetognatha, Echinodermata, Hemichordata and Chordata (5). At this time the phylogenetic proximity of echinoderms and chordates was evidenced (Figure 1).

The role of sea urchins for early development studies is well known, however they became model for other areas of scientific studies such as: efflux transport (6); autophagy and apoptosis (7) and, due to its phylogenetic proximity to chordates, they became a very interesting model for the study of immune system (8, 9, 10) (Figure1).

Innate immune system in sea urchin: general aspects

The word “immune” was used to indicate that the Catholic Pope (and nowadays to the politicians during their mandates) was not liable to men’s laws, being protected and free from penalties. The concept was transferred to organisms, and refers to their effort to maintain homeostasis after injury or infection of microorganism/parasites or even allografts (11).

In the late nineteenth century, the Russian biologist Elie Metchnikoff (1854–1916) observed that some cells present in the perivisceral coelom of echinoderms were able to move and engulf inert or even live particles. Metchnikoff observed this phenomenon in various taxa, although not in cephalochordates (11) Metchnikoff is the creator of the metaphysical concept (as we use today) of the immune system as an active process mediated by some animal cells (12).

Sea urchins have an innate immune system that works through cellular and humoral response. Cellular response is mediated by coelomocytes, cells with free circulation in the coelomic cavity which can infiltrate tissues and organs besides being the first mediators of allograft rejections; they act in response to host invasion, injury and cytotoxic agents (13). Cellular components will be described in the next section.

Humoral Factors

A wide range of immune molecules are expressed by sea urchin coelomocytes and released in the coelomic fluid; they are subject of extensive research and most molecules are homologous to the vertebrate immune system, such as lectins, cytokines, profilins and others. These humoral components are capable of destroying or damaging invading microorganisms. Each molecule is associated with a specific function like neutralizing pathogens, recognizing foreign material, opsonization (enhance of cellular response) and wound healing (13). Altogether, these molecules contribute to a complex and efficient defense mechanism.

Agglutinins are humoral factors involved in phagocyte aggregation to form clots and encapsulation of foreign material, besides participating in wound repair. A study in *P. lividus* showed that the presence of hemagglutin enhanced *in vitro* adhesion of autologous coelomocytes and appears to be involved in cell-cell and cell-matrix interactions (13).

Hemolysins are molecules capable of interacting with membranes and recognizing self from nonself particles like lipopolysaccharides (LPS), zymosan and erythrocytes (14)

Lectins are important defense molecules responsible for identification and opsonization of foreign cells; these molecules are also related to clot formation, and wound repair. They recognize carbohydrate fragments on cell surface (self and non-self) and on extracellular matrix (14).

Complement system

This system is basically composed by the alternative and the lectin pathways and its function is related to opsonization. Homologue of C3 (SpC3) has been indentified (15). They are produced by phagocytes and can be induced by LPS stimulation, which was the first complement molecule identified in an echinoderm (14). Another complement protein discovered is SpBf (B Factor), also expressed by coelomocytes. It is a complement receptor and its function is thought to be similar to the human Bf which interacts with C3 to form the enzyme C3 convertase (13,15).

AMPs – Antimicrobial peptides

AMPs are molecules with short amino-acid sequences and their composition can present different conformations and molecules (16,17)

In echinoderms AMPs are found mainly in coelomocytes, and their functions are associated with the capacity to kill bacteria and act in immunoregulatory mechanisms like the production and release of cytokines. They can act both in cell membrane and in internal sites and have the capacity to permeabilize and form pores in membranes, and thus have the potential to act in slow or non-growing bacteria; besides, they can alter the adhesive features of abiotic surfaces affecting initial adhesion of microbial cells (17).

The first AMP described for sea urchin was a cysteine-rich AMP, from the green sea urchin *S. droebachienses,* the so called Strongylocins (1 and 2) (16), with potent activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The same group found two recombinant peptides in *S. purpuratus:* SpStrongylocin 1 and SpStrongylocin 2, and two new peptides in *S droebachienses*: Centrocins (1 and 2) with either activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria beyond the fungal activity of centrocins.

These findings demonstrate the diverse immune molecules present in the sea urchin immune system; these molecules are responsible for different response mechanisms to different pathogens, suggesting that they are extremely important for host defense.

Coelomocytes: morphology and citophysiology

Sea urchins have four coelomocyte types in the coelomic fluid: phagocytic amoebocytes (PA), red spherule cells (RSC), colorless spherule cells (CSC) and vibratile cells (VC) (Table 1 and Figure 2).

Phagocytic Amoebocyte: Considered the main effector of sea urchin immune system, this cell is in highest proportion among all coelomocytes and is known to be involved in different immunological responses such as chemotaxis, graft rejection, encapsulation, cytotoxicity, reactive oxygen species production, agglutination, clotting rejection, immune genes expression and primarily in phagocytosis (Figure 3) (18). The proportion of this cell type can vary among different species (14). Also, some articles have reported different subpopulations of phagocytes. Based on their morphology, they can be classified as polygonal, discoidal and small phagocytes. The main differences are related to their cytoskeleton rearrangements (19). Posterior studies demonstrated that these subpopulations present different molecules expression such as: SpC3 (20), Sp185/333 (21) and different phagocytic capacities (22).

Red Spherule Cell: Spherical cells containing granule in their cytoplasm. These granules are related to antibacterial activity, containing a red naphthoquinone molecule called echinochrome A, which degranulates and acts against Gram-positive and Gram-negative bacteria; in addition, they are found in high concentration surrounding injuries, being considered to participate in wound healing (18).

Colorless Spherule Cell: Spherical cells containing granule in their cytoplasm. These granules differ from the red spherule cell in the electron density of their granules, reinforcing the hypothesis that both spherule cells are the same cell type in different physiological moments of maturation (23).

Both spherule cells are similar in shape and size, impeding their fractioning by separation gradient and cell sorting. Also, both of them present amoeboid migration (18).

Vibratile cell: Round and small flagellate cells that move in a non-directional way. For this reason, they seem to be involved in the coelomatic fluid movement and coagulation (15).

Environmental stress and innate immune parameters

Environmental stress can be defined as "an environmental factor causing a change in a biological system, which is potentially injurious" (24). Thereafter, a necessity to evaluate the environmental stress has evolved, when the time has come for the use of biomarkers and biomonitoring, arising considerably the number of publications regarding this issue.

Regarding biomarkers that can be involved with coelomocytes of sea urchins, literature can be didactically divided into: 1- studies involving the proportion of coelomocytes, 2- studies involving heat shock response, 3- studies involving immunological responses, 4- studies involving molecules related to inflammatory process (Figure 4).

1- Studies involving the proportion of coelomocytes

Studies comprising the proportion of coelomocytes as biomarkers are mainly related to the red spherule cell. The use of RSCs was first proposed in 2000 (23), in a study that demonstrated their increase in case of polluted sea water by industries residues and cold and hot sea water. Posteriorly, studies were conducted and classified them as biomarkers for different environmental stressors such as contamination by metals (25) and by oil soluble fraction (26). Heat stress has also been reported for Antarctic sea urchins (27) and for tropical sea urchins (28).

The increase in colorless spherule cells was also reported as biomarker for heat stress in tropical sea urchins (28). The explanation for this can also be found in the hypothesis that this cell type can be a different maturation stage of red spherule cell (23). This hypothesis is supported by observations of Transmission Electron Microscopy (Figure 2) and Flow Cytometer (personal communication)

2- Studies involving the heat shock response

Heat shock proteins (HSPs) are a large class of proteins that have been conserved throughout evolution and are expressed in all cell types studied so far. Considered chaperones, this class of proteins helps the correct folding and unfolding of proteins aiming to achieve a correct three-dimentional conformation, which is strictly correlated to a functional protein. Studies demonstrated that their expression is up-regulated after the exposure to different stressors such as: hypoxia, heavy metal exposition and diseases and are finely correlated to immune function, playing important roles in antigen presentation and activation of macrophages (29). Taking into consideration that HSPs are evolutionarily conserved, there are strong possibilities that the function of HSPs in modulating immune response might also be present in sea urchins.

The HSP70 is heat shock protein with 70KDa that are the most studied among the chaperones. In the pioneer study of HSP70 expression by coelomocytes, the expression of HSP 70 was demonstrated for heat shock (35°C) and cold shock (4°C) for acute periods. Heavy metal, acidic pH and UV radiation led to an increase of Hsp70 expression in coelomocytes in culture (30, 31).

3- Studies involving immunological responses

Regarding immunological responses that can be affected by environmental stress, literature describes the phagocytic response of sea urchins exposed to thermal stress for different periods (27, 28), in which the phagocytic response, adhesive properties and cell spreading are impaired under elevated temperatures.

Besides, the capture of metal oxide nanoparticles by phagocytes has been described as a biomarker for evaluating this nanoparticle toxicity (32).

4- Studies involving molecules related to inflammatory process.

The activity of cholinesterase as a good biomarker for environmental contamination of metal oxide nanoparticles was also reported (32). The same was reported for cold stress (33). Another stress marker already described for sea urchin coelomocytes is the methalotionein gene (MT1) described in heavy metal contamination (34). A study revealed that coelomocytes are biomarkers for DNA-damaging agents including ultraviolet radiation and hydrogen peroxide (35).

Conclusion:

The last decade was very important to elucidate the use of coelomocytes and their responses to environmental disorders, reinforcing and consecrating their use as biosensors for different environment stressful conditions (Figure 5). Despite all the efforts, many questions remain unanswered: What are the molecular mechanisms, signaling cascade and genes involved in the upregulation of coelomocytes? How could the activation of innate immune response be positive for the homeostasis of the organism and what are would be the consequences of it? These are just some examples of innumerous questions that can be raised. Much more study should be conducted aiming to better comprehend the use of coelomocytes, their regulation and the consequences for the organism after an environmental challenge.

Acknowledgments:

The authors express their acknowledgments to grants 2011/06044-4 and 2011/15612-6, São Paulo Research Foundation (FAPESP), to CAPES and CNPq for the financial support and to Adam Arai Martens for the English revision of this manuscript.

References

1- Sodergren E, Weinstock GM, Davidson EH, Cameron RA, Gibbs RA, Angerer RC, Angerer LM, Arnone MI et al. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Science. 2006; 314:941–952.
2- Smith LC. Innate Immune Complexity in the Purple Sea Urchin: Diversity of the *Sp185/333* System. Front Immunol. 2012; 3: 70.
3- Smith VJ. The echinoiderms. In: Ratcliffe NA, Rowley AF (eds), Invertebrate blood cells, Academic Press, New York, NY, pp 513 -562, 1981.
4- Coteur G, Gosselin P, Wantier P, Chambost-Manciet Y, Danis B, Pernet PH, Warnau M, Dubois, P. Echinoderms as Bioindicators, Bioassays, and Impact Assessment Tools of Sediment-Associated Metals and PCBs in the North Sea. Arch Environ Contam Toxicol. 2003; 45 (2), 190-202.
5- Cuénot, L. Anatomie éthologie, et systématique, des Échinodermes. In: Grassé, P. ed: Traité de zoologie. v.2, Échinodermes, stomocordes, procordes. Paris: Masson, p.1-363, 1948.
6- Epel D, Cole B, Hamdoun A, Thurber RV. The sea urchin embryo as a model for studying efflux transporters: Roles and energy cost. Mar Environ Res. 2006; 62:S1-S4.
7- Chiarelli R, Agnello M, Bosco L, Roccheri M.C. Sea urchin embryos exposed to cadmium as an experimental model for studying the relationship between autophagy and apoptosis. Mar Environ Res. 2013; 13: S0141-1136
8- Silva JR. The onset of phagocytosis and identity in the embryo of *Lytechinus variegatus*. Dev. Comp. Immunol. 2000; 24: 733-739.
9- Mangiaterra MBBCD, Silva JRMC. Induced inflammatory process in the sea urchin (*Lytechinus variegatus*). J Invertebr Biol. 2001; 120:178-184.
10- Faria MT, Silva JRMC. Innate immune response in the sea urchin *Echinometra lucunter*. J Invertebr Pathol. 2008; 98:58-62.
11- Silva, JRMC, 2013. Immunology in sea urchins. Pp. 187-195. In: Sea Urchins: Biology and Ecology. 3rd edition (J.M. Lawrence, Ed.), Academic Press, San Diego, CA.

12- Tauber AI, Chernyak L (1997) Metchnikoff and the origins of immunology, from metaphor to theory. Oxford University Press, New York
13- Gross PS, Al Sharif WZ, Clow LA, Smith LC. Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. Dev. Comp. Immunol. 1999; 23: 429 – 442.
14- Ramirez-Gomez F, Garcia-Arrarás JE. Echinoderm immunity. Invertebrate Surviv J. 2010; 7: 211-220.
15- Smith LC, Rast JP, Brockton V, Terwilliger DP, Nair SV, Buckley K, et al. The sea urchin immune system. Inv. Surv. J. 2006; 3: 25-39.
16- Li C, Haug T, Styrvold OB, Jorgensen TO, Stensvag K. Stromgylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin *Strongylocentrotus droebanchiensis*. Dev Comp Immunol. 2008; 32:12, 1430-1440.
17- Schiallaci D, Cusimano MG, Cunsolo V, Saletti R, Russo D, Vazzana M, et al. Imune mediators of sea-cucumber *Holothuria tubulosa (Echinodermata)* as source of novel antimicrobial and anti-staphylococcal biofilm agents. AMB Express. 2013; 3-35
18- Matranga V, Pinsino A, Celi M, Natoli A, Bonaventura R, Schröder HC, and Müller WEG 2005. Monitoring chemical and physical stress using sea urchin immune cells. In: Echinodermata, ed Matranga V. Springer, Heidelberg, 85–110.
19- Edds KT. Cell biology of echinoid coelomocytes. I. Diversity and characterization of cell types. J. Invert. Biol. 1993; 61: 173-178
20- Gross PS, Clow LA, Smith LC. SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes. Immunogenetics. 2000; 51: 1034-1044.
21- Brockton V, Henson JH, Raftos DA, Majeske AJ, Kim YO, Smith LC. Localization and diversity of 185/333 proteins from the purple sea urchin – unexpected protein-size range and protein expression in a new coelomocyte type. J. Cell. Sci. 2008; 121, 339–348.
22- Borges JC, Jensch-Junior BE, Garrido PA, Mangiaterra MB, Silva JRMC. Phagocytic amoebocyte sub populations in the perivisceral coelom of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). J Exp Zool A Comp Exp Biol. 2005 Mar 1;303(3):241-8.
23- Matranga, V, Toia, G, Bonaventura, R., Muller, WEG. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. Cell Stress Chaperones 2000; 5(2), 113-120.
24- Hoffmann AA and Parsons PA 1997 Extreme environmental change and evolution. 1st ed., Cambridge: Cambridge University Press
25- Pinsino, A, Della Torre, C, Sammarini V, Bonaventura R, Amato E, Matranga, V. Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Italy. Cell Biol Toxicol. 2008; 24(6),541-52.
26- Borges JCS, Branco PC, Pressinotti LN, Severino D, Silva JRMC. Intranuclear crystalloids of Antarctic sea urchins as a biomarker for oil contamination. Polar Biol. 2010; 33(6), 843-849.
27- Branco PC, Pressinotti LN, Borges JCS, Iunes RS, Kfoury-Jr JR, Silva MO, Gonzalez M, Santos MF, Peck LS, Cooper EL, Silva JRMC,. Cellular biomarkers to elucidate global warming effects on Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. Polar Biol. 2012 35, 221-229.
28- Branco PC, Borges JCS, Santos MF, Silva JRMC The impact of rising sea temperature on innate immune parameters in the tropical subtidal sea urchin *Lytechinus variegatus* and the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter*. Mar Environ Res 2013; 92:95-101.
29- Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. J Leukoc Biol. 2009 Jun;85(6):905-10.
30- Matranga V, Bonaventura R, Di Bella G. Hsp70 as a stress marker of sea urchin coelomocytes in short term cultures. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2002, 48 (4):345-9.
31- Matranga V, Pinsino A, Celi M, Bella G, Natoli A. Impacts of UV-B radiation on short term cultures of sea urchin coelomocytes. Mar Biol. 2006, 149:24-34.
32- Fallugi C, Aluigi MG, Chiantore MC, Privitera D, Ramoino P, Gatti MA, Fabrizi A, Pinsino A, Matranga V. Toxicity of metal oxide nanoparticles in immune cells of the sea urchin. Mar Inviron Res. 2012; 76:114-121.
33- Angelini C, Amaroli A, Falugi C, Di Bella G, Matranga V. Acetylcholinesterase activity is affected by stress conditions in **Paracentrotus lividus** coelomocytes. Mar Biol. 2003, 143: 623-628.

34- Rumahlatu D, Corembima AD, Amin M, Rohman F. Activation, concentration and expression of metallothionein 1 on sea urchin as biomonitoring heavy metal cadmium. Research Inventy: International Journal Of Engineering And Science,. 2013;3(3): 6-12.
35- Loram J, Raudonis R, Chapman J, Lortie M, Bodnar A. Sea urchin coelomocytes are resistant to a variety of DNA damaging agents. Aquat Toxicol. 2012 Nov 15;124-125:133-8.

Figures and table legends

Figure 1. Cladogram demonstrating the phylogenetic position of the Deuterostome group (Orange box). The phylogenetic proximity of sea urchin (echinoderm) to chordates shall be noted.

Figure 2. Coelomocytes morphology. A. Phagocytic amoebocyte: cell with a large and central nucleus with loose chromatin and cytoplasm with quantity of endoplasmic reticulum indicating an intense synthetic activity. B. spherical cell with a small, peripheral nucleus with dense chromatin and cytoplasm filled with homogenous vesicles. C. Morphology similar to red spherule cell varying only in its vesicles density, which are more heterogenous.

Figure 3. Phagocytosis. It represents the first line of defense for invertebrates and vertebrates. In sea urchins phagocytic amoebocyte is the only cell type that is able to perform phagocytosis. A. Schematic drawing demonstrating steps of phagocytosis. 1. Chemotaxis to the foreign particle (through chemotactic elements like LPS, complements and demaged cells) culminating in adhesion of phagocyte to the particle. 2. Cytoskeleton remodeling leading to pseudopodia extension around the particle. 3. Formation of phagosome in which the particle is completely internalized. 4. Fusion of phagosome to lysosomes aiming to digest the phagocytic particle. 5. Phagocytized material is then digested by lysosomal enzymes. 6. Discharge of digested material that cannot be recycled by the cell. B. Phagocytosis observed under phase contrast microscopy. A phagocytic amoebocyte is visualized spread onto glass slide. Inside its cytoplasm is possible to observe some yeast cells internalized (arrow).

Figure 4. Graphics drawn based on indexed researches from 2000 to 2013 involving environmental stress on sea urchin coelomocytes. For this search either the proportion of coelomocytes or the genes upregulation and immune response were considered. A. Proportion of stressors capable to induce coelomocytes alterations. B. Proportion of sea urchin species studied. C. Proportion of studies performed on laboratory stress conditions or collected at field work. D. Proportion of biomarkers reported for sea urchin environmental stress.

Figure 5. Schematic drawing demonstrating the effect of stress on coelomocytes. Phagocytic amoebocytes respond with impairment in the immunological function, lacking adhesive properties, presenting alterations on cell spreading and decreased phagocytic capacity. Spherule cells, either colorless or red ones, respond with increase in their cell numbers. Also, coelomocytes respond to stress increasing the expression of HSPs.

Table 1. Sea urchin coelomocytes: morphological characteristics according to phase and transmission electron microscopy, nomenclatures used, type of migration of proportion of each cell type.

Table 1: Coelomocyte rev.docxCoelomocyte	Different Nomenclatures	Sub-type	Morphology based on Phase Contrast Microscopy	Morphology based on Electron Microscopy	Migration	Proportion on CF
Phagocytic Amoebocyte	Phagocytes	Discoidal Cell Polygonal Cell Small phagocytes	This cell type is agranular and presents capacity to emit cytoplasmic projections. Also they can acquire a spread shape when in touch with a glass slide.	A large and central nucleus with loose chromatin and abundant quantity of endoplasmic reticulum indicating an intense synthetic activity (Branco et al., 2013).	Mesenchymal	60-70% (Borges et al., 2005)
Red Spherule Cells	Red Amoebocyte	-	Spherical cell with red cytoplasmic granules containing a naftoquinone substance called echinochrome what gives the redish color.	Small, peripheral nucleus with dense chromatin and its cytoplasm fulfilled with heterogeneous vesicles. (Branco et al., 2013).	Ameboid	5-10% (Borges et al., 2005)
Colorless Spherule Cells	Colorless Amoebocyte	-	Spherical cell with colorless cytoplasmic granules.	Small, peripheral nucleus with dense chromatin and its cytoplasm was fulfilled with electron lucent vesicles with a more electron dense center. (Branco et al., 2013).	Ameboid	5-10% (Borges et al., 2005)
Vibratile Cell	-	-	Round cell with one single flagellum that allow it to move.		Rotational movement	15-20% (Borges et al., 2005)

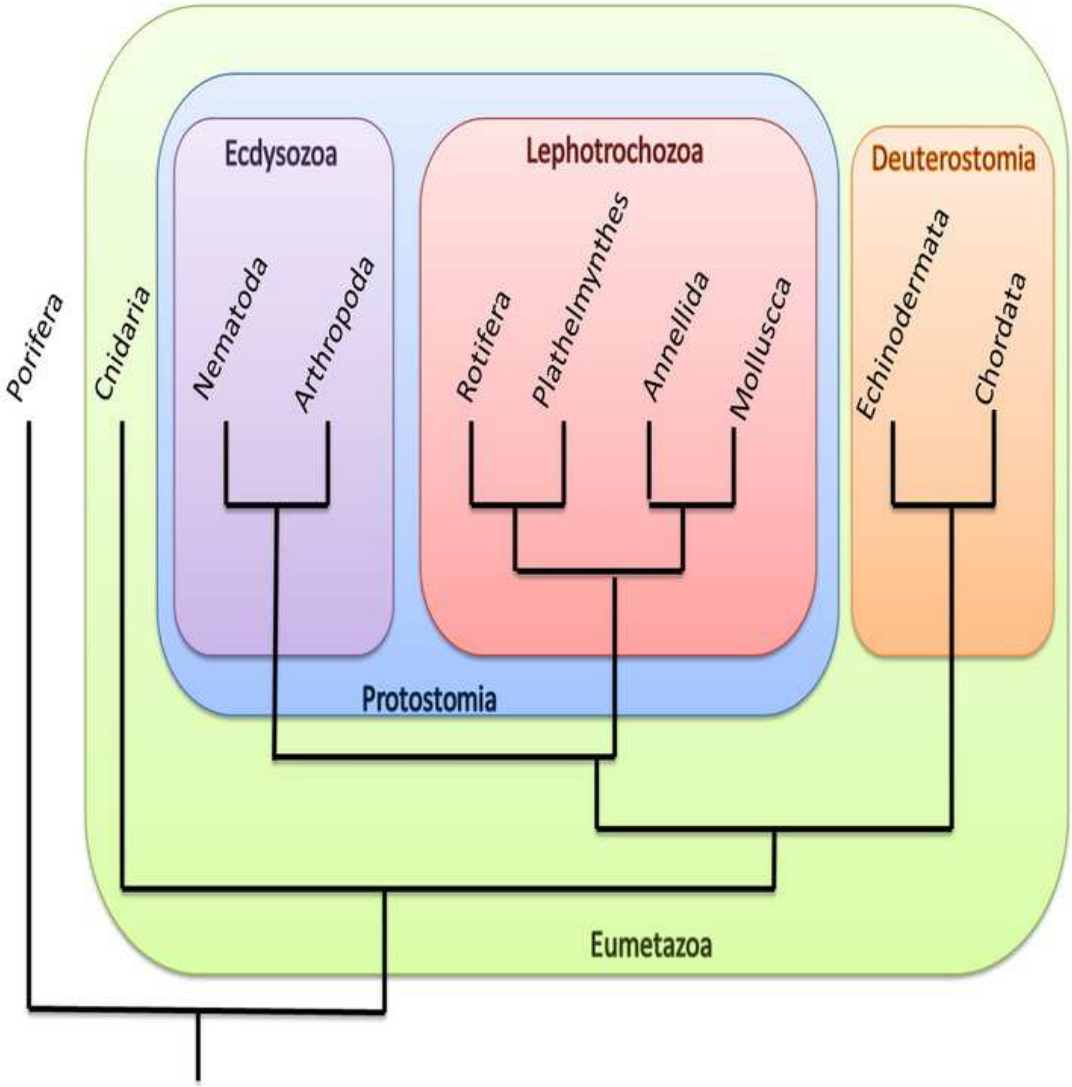


Figure 1: Fig 1 oa_biology.tif

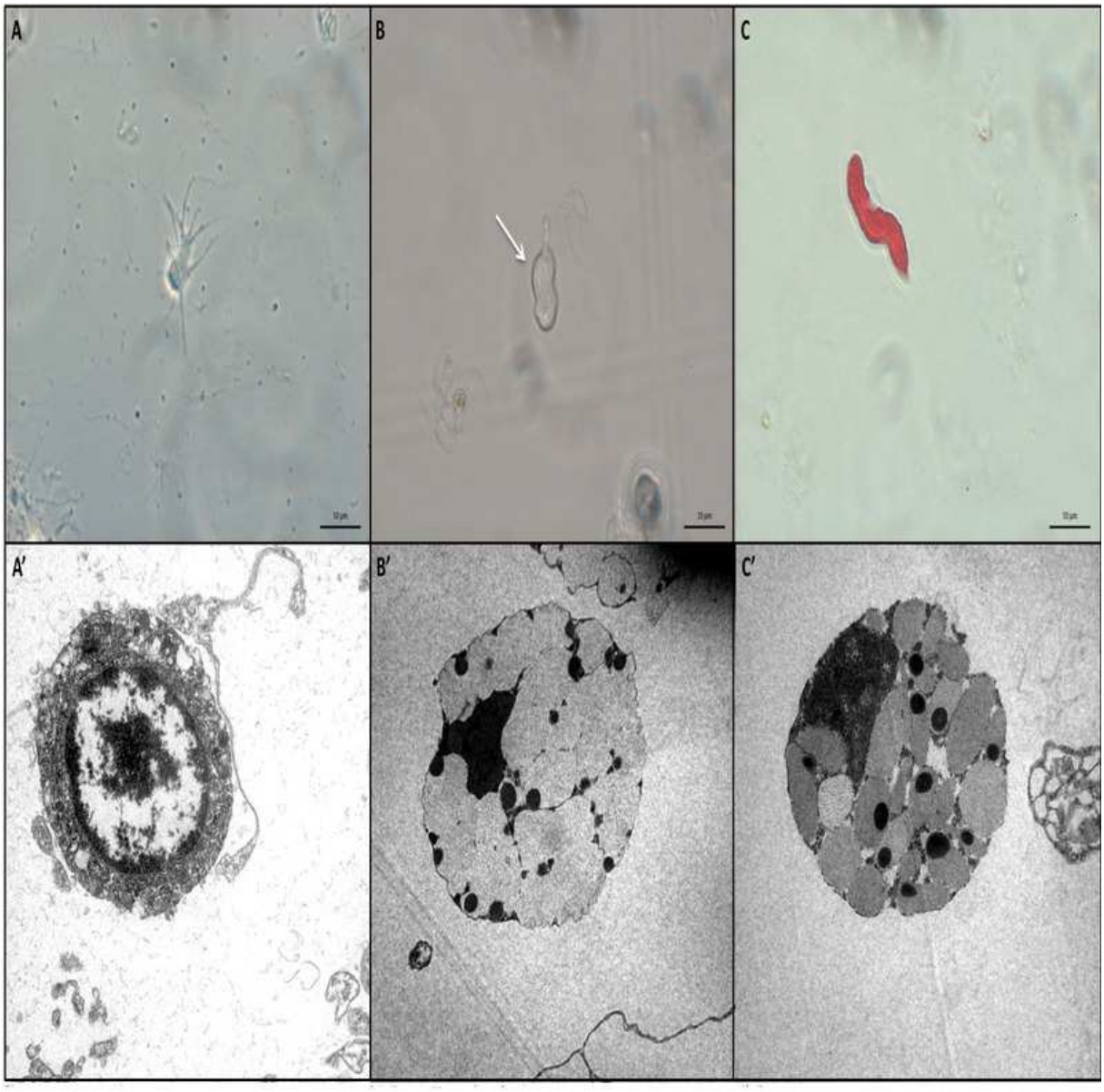


Figure 2: Fig 2 oa_biology.tif

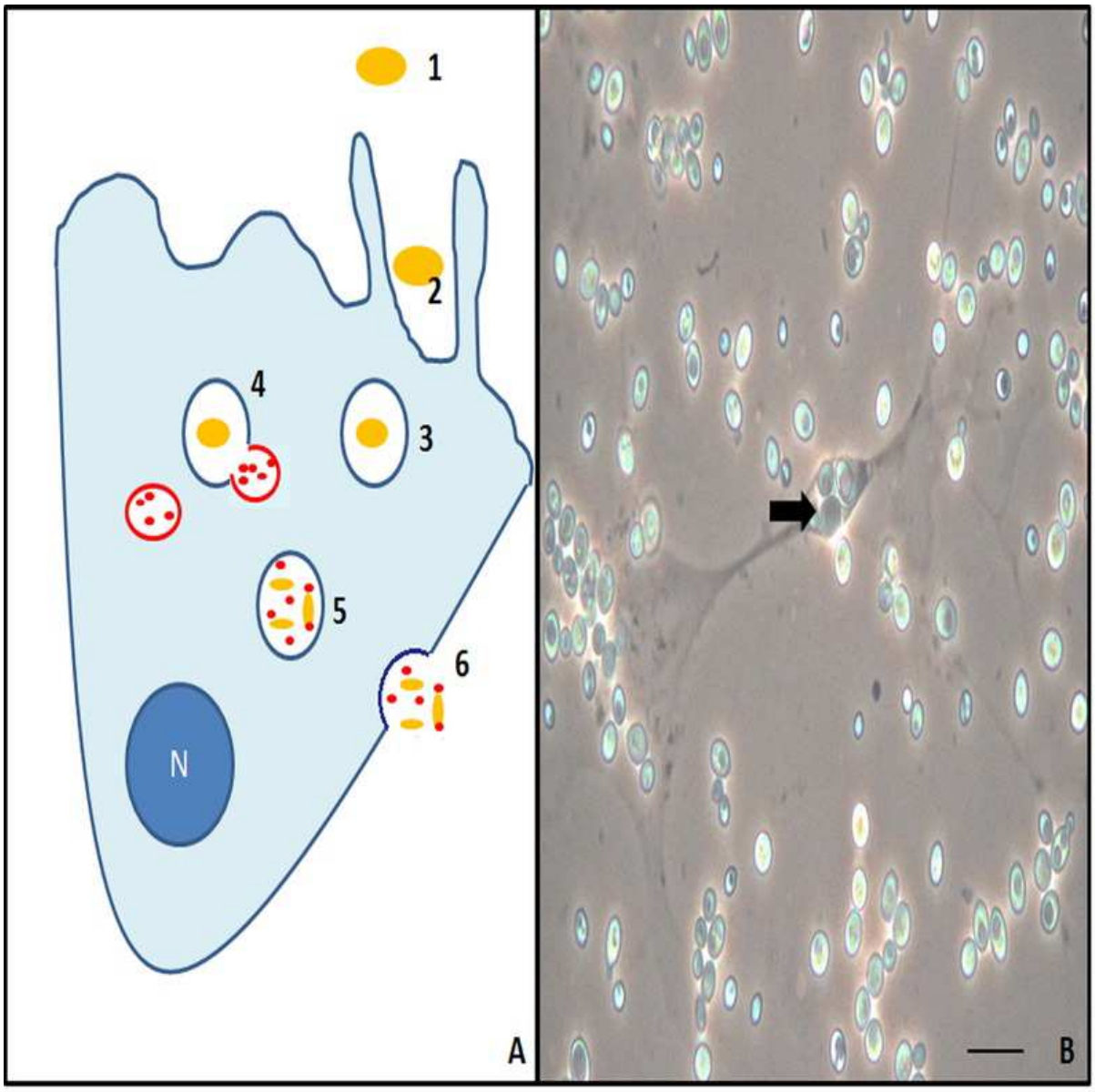


Figure 3: Fig 3 oa_biology.tif

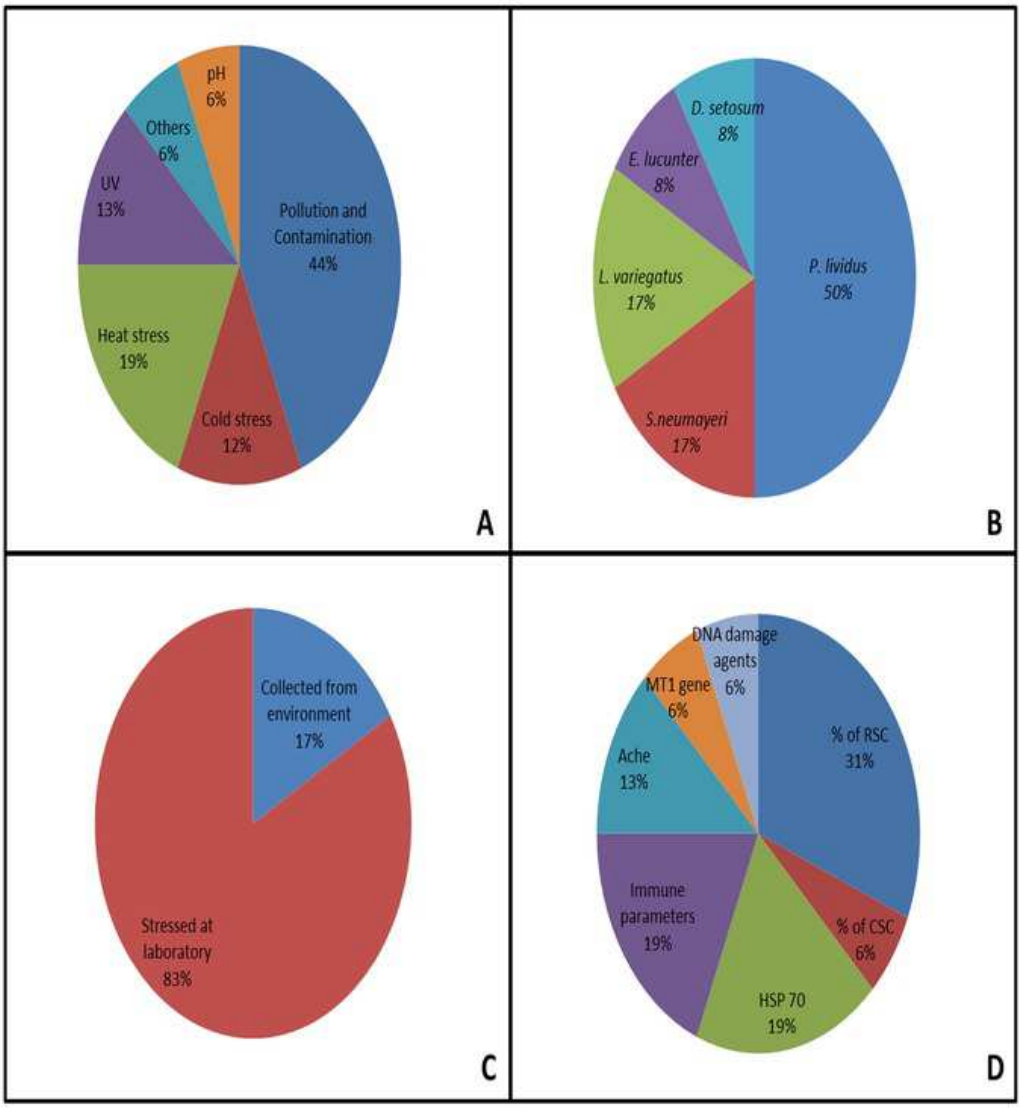


Figure 4: Fig 4 oa_biology .tif

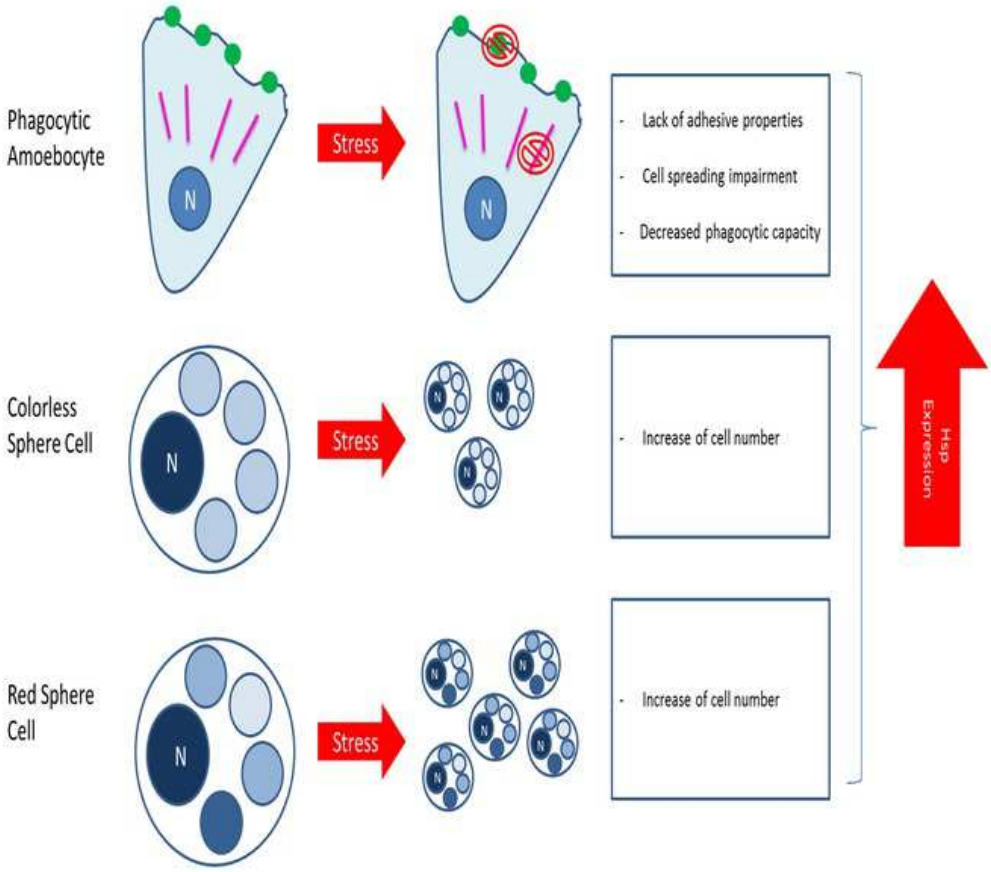


Figure 5: Fig 5 ao_biology.tif