

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 Título 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**

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 CO₂ 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 fagocíticos além do balanço ácido – base do líquido 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 conseqüentemente 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 analyzed in addition to the acid-base balance of the coelomic fluid after 24 hours and five days of exposure to pH 7.6 and 7.3. The 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*.

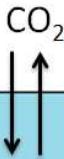
1 INTRODUÇÃO

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 última 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 CO₂ e a água do mar.

Atmosfera			Era Glacial	Pré - Industrial	Atual
CO_2 		[] pCO ₂	180	280	380
$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$		[] H ₂ CO ₃	7	9	13
$\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$		[] HCO ₃ ⁻	1666	1739	1827
$\text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-}$		[] CO ₃ ²⁻	279	222	186
		[] DIC	1952	1970	2026
Oceano		pH	8,32	8,16	8,05

Reações químicas entre o CO₂ 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 H₂CO₃ e HCO₃⁻ aumentou, enquanto a concentração de CO₃²⁻ e o pH diminuíram.

Adaptado de Fabry et al., (2008)

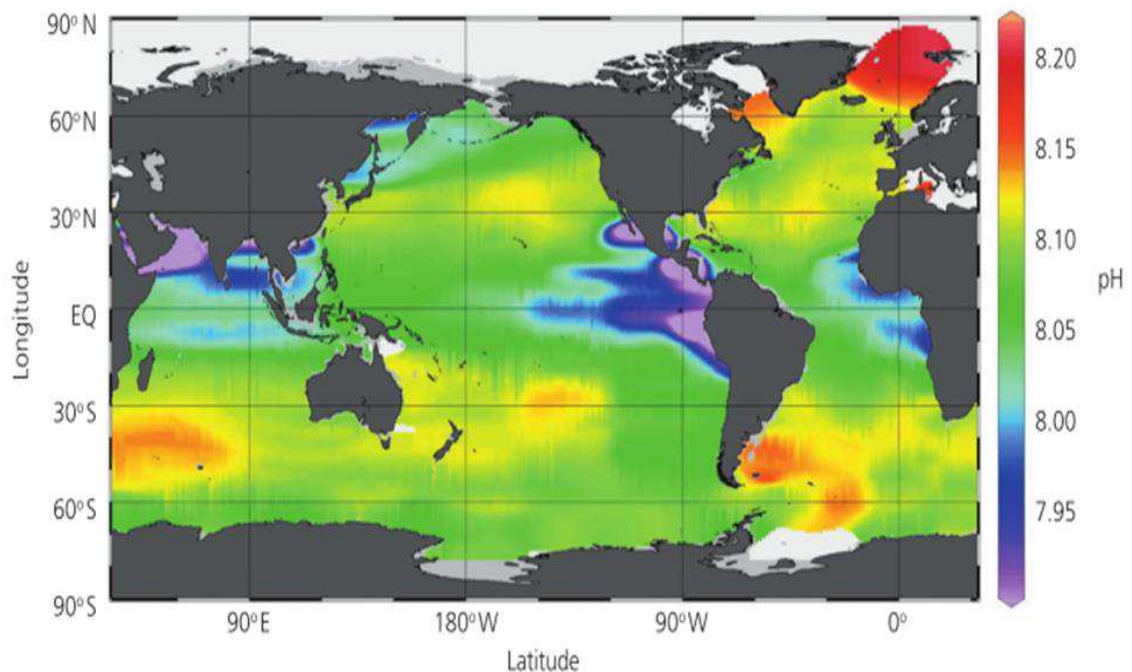
A acidificação oceânica inicialmente está relacionada às águas superficiais, uma vez que é nessa região que as trocas gasosas entre a água e a atmosfera ocorrem. A água do mar nessa região é ligeiramente alcalina, com o pH aproximadamente na faixa de 8,2 (Figura 2), variando $\pm 0,3$ unidades dependendo 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 CO₂ (Kurihara et al., 2004^a; 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 subletais 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 distingue 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).

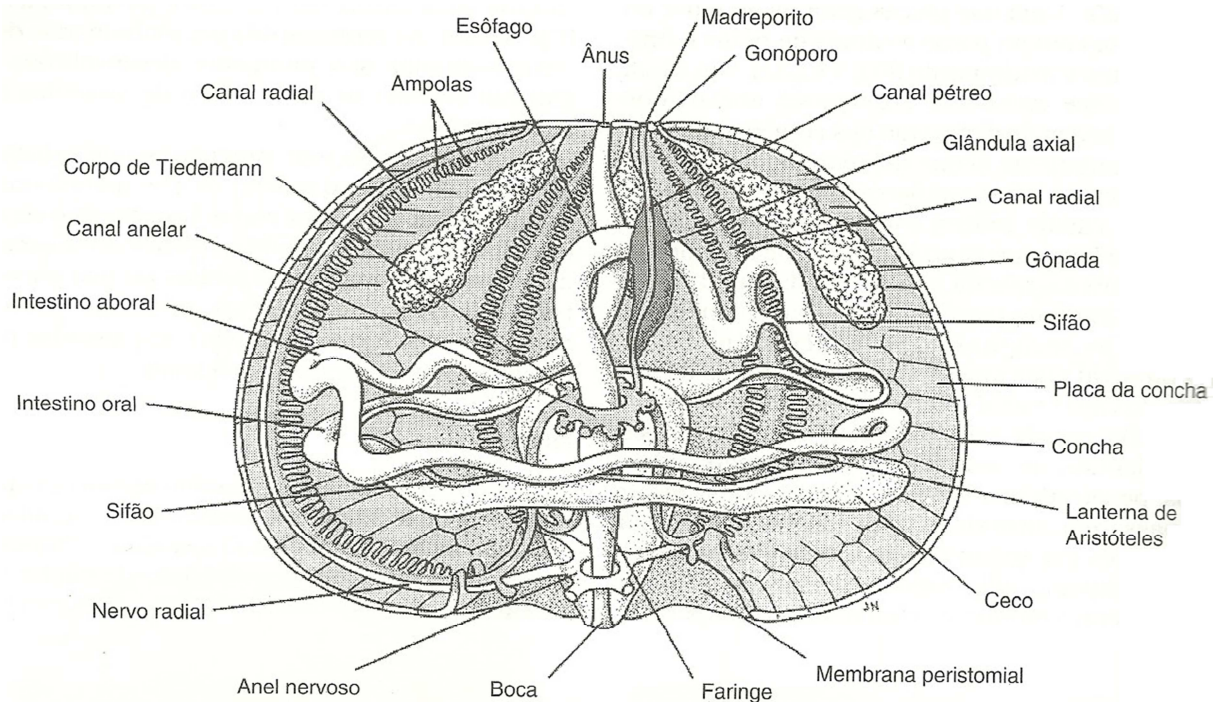
A circulação nesses animais ocorre através do fluido celômico, também chamado de líquido celomático, que preenche a cavidade celomática circundando os órgãos internos. O líquido celomático, apresenta composição semelhante à da água

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, García-Arráras 2010).

As células vibráteis são células pequenas, variando entre 5 e 10 μm , 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 líquido celomático (Chia e Xing 1996; Ramirez-Gomes, García-Arráras 2010; Smith et al., 2006).

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



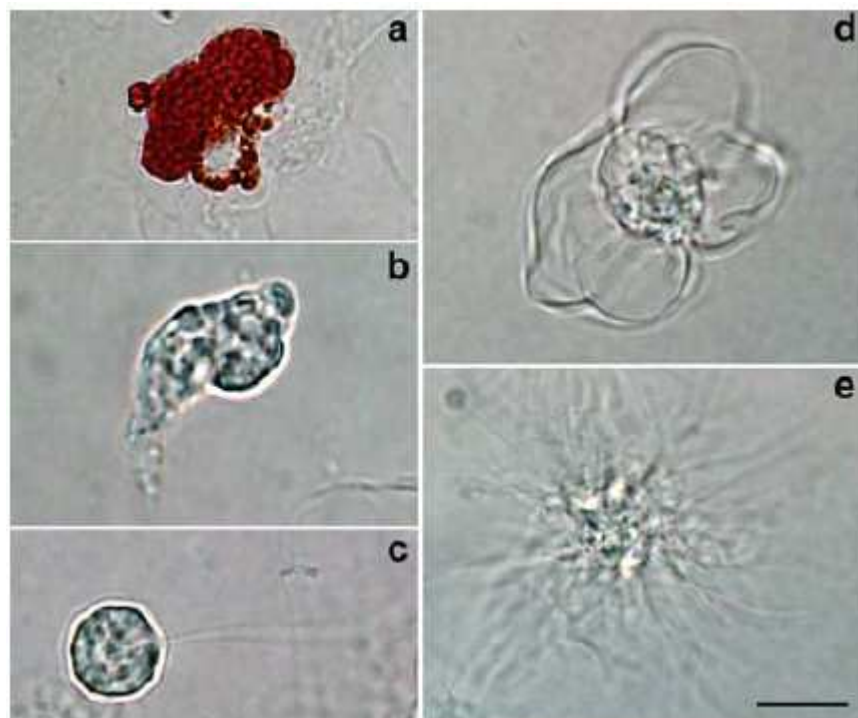
Retirado de Ruppert e Barnes (1996).

A célula encontrada em maior quantidade no líquido 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 fagocíticos são considerados os principais efetores do sistema imune nesses animais (Ramirez-gomes, Garcia-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, encapsulaao, rejeiao de enxertos e coagulaao (Gross et al., 1999; Ramirez-gomes e Garcia-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  mudanças no ambiente e de extrema importância para o ecossistema, pois uma vez herbívoros, podem induzir mudanças na taxa de distribuiao de outras espécies marinhas e eventualmente causar segregao assim como especiaao (Matranga et al., 2005). São animais de pouca mobilidade, essa característica os torna ótimos organismos para analisar alteraoes 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 ouriço-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).

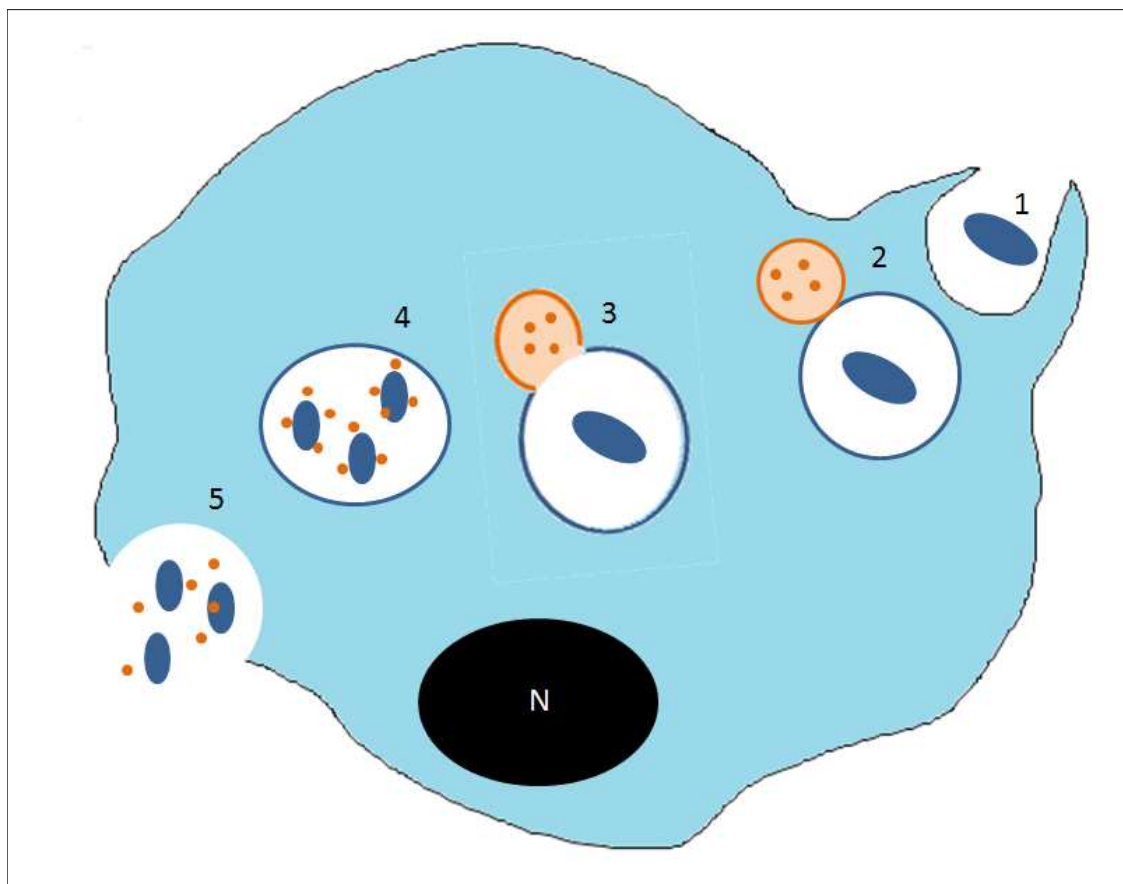
A primeira defesa contra infecções envolve uma barreira física à invasão por patógenos ou substâncias estranhas promovida pelo revestimento externo do corpo, no entanto, quando os patógenos conseguem penetrar essa barreira eles encontram moléculas genéricas ou específicas para restringir a infecção. 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, citotoxicidade, encapsulamento e produção de agentes microbianos. Existe também, uma variedade de fatores humorais presentes no líquido 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 pseudópodos 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.

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 líquido 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.

REFERÊNCIAS¹

- Abbas AK, Lichtman A H, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 2^a 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 0°C. *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: proceedings 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, Williams 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 coelomic 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 assessment 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, Palaras 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, Fangué 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 atmospheric carbon dioxide. Policy Document 12/05, The Royal Society, 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 0°C. *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 °C. *Polar Biol* 2000; 23(4):225–30

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

Sodergren E, Weinstein 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 CO₂-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 CO₂-acidified seawater on the extracellular acid-base balance of the northern sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. 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 CO₂ 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-Gouveia IA, Freire CA. Differences in ion regulation in the sea urchin *Lytechinus variegatus* and *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea) Mar Biol. 2007; 87: 769-75.