

**IVONETE APARECIDA DOS SANTOS**

**EQUINÓIDES EXPOSTOS A DIFERENTES SALINIDADES E SUA  
CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA**

**Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração em Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire.**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Sônia Grötzner.**

**CURITIBA  
2010**

**IVONETE APARECIDA DOS SANTOS**

**EQUINÓIDES EXPOSTOS A DIFERENTES SALINIDADES E SUA  
CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA**

**Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração em Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire.  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Sônia Grötzner.**

**CURITIBA  
2010**

*Não existe outro caminho que não seja você mesmo. Não espere a iniciativa do outro, seja você o primeiro a olhar para si e fazer de sua vida uma vida nova! Seja honesto. A honestidade é a força que derruba a corrupção. Semeie o amor. Promova a paz! Para isso, evite a ambição que gera conflitos por ambicionar o ter, o domínio, o estar acima do outro. Promova a justiça. Viver feliz não é direito de alguns poucos, mas de todo ser humano. Admita ao outro a liberdade de ser diferente, de pensar diferente. Admire ao invés de exigir uma única forma de expressão e enriqueça-se com a diversidade. Tenha um coração acolhedor!*  
*Lembre-se, você é parte do universo!*  
*(Adaptação de texto redigido por Ir. Remilda Teixeira Pereira, mscs).*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire por ter aceitado me orientar. Que para mim é um exemplo de pesquisadora, de determinação, dedicação, comprometimento e integridade.

À minha co-orientadora Professora Dra. Sônia Grötzner pela acolhida, por possibilitar meu aprendizado em todas as fases da histologia desde a fixação dos tecidos até a análise das fotomicrografias. E também por ser exemplo de generosidade.

Ao CNPq pela bolsa e pela taxa de bancada.

Ao Setor de Ciências Biológicas por disponibilizar a infra-estrutura.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

À escola de mergulho Pata da Cobra de Bombinhas pelo apoio nas coletas dos ouriços *Lytechinus variegatus*.

À Grace gerente da escola e aos mergulhadores da Pata da Cobra pela disponibilidade e apoio nas coletas de *Lytechinus variegatus*.

À secretária, do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Marlene Bonifácio de Camargo pela disposição em ajudar.

Especial ao professor Dr. Ciro Alberto Oliveira pela utilização do Laboratório de Toxicologia nos procedimentos de histologia e à professora Dra. Ruth Janice Shadeck pelas preciosas sugestões sobre injeção de vermelho neutro.

A todos os professores do departamento de Fisiologia em especial ao professor Dr. Ricardo Fernandes.

Ao Sr. Herculano Salviano dos Reis Filho (Nino) e à Eliane Regina Mendes do Nascimento pelo uso dos corantes e do laboratório de histologia.

À todos os integrantes egressos e atuais do Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO): Professora Dra. Viviane Prodócimo, Professor Dr. Denilton Vidolin, Professora Dra. Valéria Togni, MSc. Marcos Paulo Trindade da Veiga, MSc. Enelise Marcelle Amado; MSc. Luciana de Souza Bastos, MSc. Hugo Ultramari e a mestranda Giovana Castellano pelas sugestões de como melhorar este ou aquele protocolo. Também à Sívia, Lígia e Aniele.

Ao Laboratório de Citogenética Animal, do departamento de genética, em especial à doutoranda Vanessa pelo auxílio na captura das imagens.

Ao doutorando Marcos Paulo Trindade da Veiga (do LFCO) por TODAS as coletas desse estudo. Seu auxílio foi essencial.

A todos os alunos do programa de pós-graduação que fora sempre solidários e solícitos. Em especial à doutoranda Inês Rabitto e à Dra. Maritana Prodocimo pela disponibilidade em ajudar.

Às pessoas responsáveis pelo recolhimento (toda quarta até as 11:00 h) das carcaças e dos descartes de material químico.

À Ana Maristela Rodocki da biblioteca sempre disposta a ajudar.

Ao porteiro Sebastião (Tião das Biológicas) pela saudação de todo dia: “bom e você”!!

À minha família pelo apoio incondicional, mesmo não entendendo direito o que eu estava fazendo.

À minha filha Manoela por me mostrar o lado cor-de-rosa e doce da vida.

À minha mãe por ser exemplo de serenidade e à minha irmã por me incentivar sempre. Ao Leandro *in memoriam* que não entendia direito o que estava fazendo e também não se interessava muito.

Ao meu namorado Antonio Brandão Campos do Mar pelo apoio incondicional.

Ao meu amigo Marcos Paulo (PS) pelo companheirismo em absolutamente tudo.

Aos amigos Denilton, Ketty Maria, Susla, Rosa e o Cravo pelos maravilhosos momentos de descontração, conviver com vocês é um presente.

À Patrícia Calil Semprebom, Ana Tereza Bittencourt (Téti) e Tânia Zaleski pela amizade.

Ao Sílvio Semprebom por configurar meu “computinho”.

À Giovanna por me mostrar que não se pode julgar uma pessoa sem antes conhecê-la direito.

A todos que de alguma maneira colaboraram para a realização desta tese.

À Deus, à Nossa Senhora da Aparecida e ao meu anjo da guarda!!!

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	IV
LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	VII
RESUMO GERAL .....	IX
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
OBJETIVOS .....	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	15
CAPÍTULO 1: VARIABILIDADE INTER-ESPECÍFICA NA MANUTENÇÃO DE GRADIENTES IÔNICOS NOS OURIÇOS-DO-MAR <i>Lytechinus variegatus</i> (Lamarck, 1816), <i>Echinometra lucunter</i> (Linnaeus.,1758) E <i>Arbacia lixula</i> (Linnaeus, 1758) (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA) <sup>1</sup> .....	22
RESUMO.....	23
ABSTRACT .....	24
INTRODUÇÃO .....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO .....	48
CONCLUSÕES .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
CAPÍTULO 2: FISIOLOGIA DA EXCREÇÃO: CELOMÓCITOS PRESENTES EM TECIDOS DO OURIÇO-DO-MAR <i>Echinometra lucunter</i> (LINNAEUS, 1758) .....	63
RESUMO.....	64
ABSTRACT .....	66
INTRODUÇÃO .....	67
MATERIAL E MÉTODOS.....	70
RESULTADOS.....	74
DISCUSSÃO .....	83
CONCLUSÕES .....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90
CONCLUSÕES GERAIS.....	95
ANEXO.....	96

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Corte longitudinal esquemático de um ouriço-do-mar mostrando o sistema vascular aquífero.....	5
Figura 2: <i>Lytechinus variegatus</i> (Lamarck, 1816).....	13
Figura 3: <i>Echinometra lucunter</i> (Linnaeus, 1758). ....	13
Figura 4: <i>Arbacia lixula</i> (Linnaeus, 1758). ....	13

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Respostas comportamentais dos ouriços <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunte</i> , e <i>Arbacia lixula</i> . ....	33
Tabela 2. Osmolalidade e concentrações dos íons, calculadas e medidas nas águas dos aquários experimentais, nos experimentos de diluição e concentração da água do mar .....	34
Figura 1: Osmolalidade do fluido celômico dos ouriços <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Arbacia lixula</i> em função da osmolalidade da água.....	36
Figura 2: Concentração de cloreto do fluido celômico dos ouriços <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Arbacia lixula</i> em função da concentração de cloreto da água do mar. ....	38
Figura 3: Concentração de sódio do fluido celômico dos ouriços <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Arbacia lixula</i> em função da concentração de sódio da água do mar.....	40
Figura 4: Concentração de potássio do fluido celômico dos ouriços <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Arbacia lixula</i> em função da concentração de potássio da água do mar.....	42
Figura 5: Concentração de magnésio do fluido celômico dos ouriços <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Arbacia lixula</i> em função da concentração de magnésio da água do mar.....	44
Figura 6: Osmolalidade do fluido celômico e do fluido do intestino dos ouriços <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Arbacia lixula</i> .....	45
Figura 7: Concentração de cloreto do fluido celômico e do fluido do intestino dos ouriços <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Arbacia lixula</i> .....	46

Figura 8: Concentração de sódio do fluido celômico e do fluido do intestino dos ouriços <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Arbacia lixula</i> .....	46
Figura 9: Concentração de potássio do fluido celômico e do fluido do intestino dos ouriços <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Arbacia lixula</i> .....	47
Figura 10: Concentração de magnésio do fluido celômico e do fluido do intestino dos ouriços <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Echinometra lucunter</i> e <i>Arbacia lixula</i> .....	47

## CAPÍTULO 2

Figura 1. Celomócitos nos pés ambulacrais de <i>Echinometra lucunter</i> submetidos à injeção de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Celomócitos vermelhos, celomócitos brancos .....	75
Figura 2. Celomócitos nos pés branquiais de <i>Echinometra lucunter</i> submetidos à injeção de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Celomócitos vermelhos, celomócitos brancos. ....	76
Figura 3. Celomócitos nos tecidos reto de <i>Echinometra lucunter</i> submetidos à injeção de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Celomócitos vermelhos, celomócitos brancos .....	77
Figura 4. Celomócitos na glândula axial de <i>Echinometra lucunter</i> submetidos à injeção de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Celomócitos vermelhos, celomócitos brancos .....	78
Figura 5. Celomócitos nos pés ambulacrais de <i>Echinometra lucunter</i> submetidos à injeção de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Celomócitos vermelhos, celomócitos brancos.....	80
Figura 6. Celomócitos nos tecidos dos pés branquiais, do reto e da glândula axial de <i>Echinometra lucunter</i> submetidos à injeção de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Celomócitos vermelhos, celomócitos brancos.....	81
Figura 7. Quantificação da imunofluorescência para Lamp-1 nos tecidos de <i>Echinometra lucunter</i> .....	82

## RESUMO GERAL

Os equinodermos são considerados animais marinhos, estenohalinos, osmoconformadores e não possuem órgão excretor, porém são capazes de tolerar mudanças da salinidade da água do mar e ocasionalmente manter gradientes iônicos. Os ouriços-do-mar são habitantes de regiões entremarés (região exposta ao ar na maré baixa) e regiões de sublitoral (região que nunca fica exposta ao ar). Esses ambientes podem refletir comportamentos ecológico e fisiológico distintos nesses animais. As espécies *Lytechinus variegatus*, *Echinometra lucunter* e *Arbacia lixula*, foram expostas a curta e progressiva diminuição (até 15 ‰) e aumento (até 45‰) da salinidade (simulando ciclo de maré), permanecendo por uma hora em cada salinidade. Amostras de fluido celômico foram obtidas. Foi aplicado o teste de endireitamento em cada salinidade para verificar o grau de estresse dos animais, e foram comparados os fluidos celômico e intestinal das três espécies deste estudo. *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* apresentaram diferença na concentração de potássio entre o fluido celômico e do intestino. Houve diferença no comportamento iônico das espécies no experimento de redução e aumento da salinidade. *Lytechinus variegatus* habita regiões submersas em contato com a areia e é a espécie com a maior capacidade de manutenção de gradientes iônicos. *Echinometra lucunter* habita a porção batida do costão, se aloja em locas e consegue manter gradientes para alguns íons, porém menos do que *L. variegatus*, de porte semelhante. *Arbacia lixula*, a espécie de menor porte, habita região sempre submersa, ainda sofrendo ação das ondas, e tem o comportamento mais osmo- e íon-conformador. Este resultado pode ser parcialmente explicado pelo seu menor tamanho, e com isso maior relação superfície/volume. Independente do comportamento osmo-iônico todos os equinodermos apresentam células livres nos espaços celômicos que vagam pelos tecidos e órgãos.

Em equinóides essas células são encontradas entre as células epiteliais dos pés ambulacrais, pés branquiais, reto e glândula axial. No fluido celômico são coloridas havendo as células vermelhas, verde oliva, marrons, células ciliadas (e que vibram). As células podem ser classificadas de acordo com sua forma, tamanho e conteúdo citoplasmático. Elas são responsáveis pela mediação das respostas imunes através da fagocitose, limpeza de materiais estranhos como microorganismos, trocas gasosas, estocagem de nutrientes, produção de componentes do tecido conjuntivo, participam do processo de cicatrização por remoção de tecidos mortos e produzem moléculas antimicrobianas. Os celomócitos do tipo fagocíticos podem despejar na lacuna do órgão axial e no reto o material fagocitado no fluido celômico. Há poucas referências bibliográficas descrevendo células livres migrando por tecidos. As pesquisas concentram-se na capacidade fagocítica dos celomócitos em experimentos *in vitro*. Ficou demonstrado que os pés ambulacrais, pés branquiais, reto e glândula axial não são potenciais locais para o descarte de celomócitos carregados com leveduras em *Echinometra lucunter*, após injeção de leveduras no seu fluido celômico. Não foram observados celomócitos com leveduras, e não houve alteração no número de celomócitos nos tecidos. Por outro lado, foi observada atividade lisossômica nos pés ambulacrais, nos pés branquiais, no reto e na glândula axial. Essa atividade é maior na glândula axial quando comparada ao pé ambulacral. Essa inédita caracterização mostrou que, dentre os tecidos verificados, a glândula axial se destaca na atividade de digestão intracelular.

## INTRODUÇÃO GERAL

A água do mar é uma solução de gases, compostos orgânicos e sais. O cloreto e o sódio juntamente com o magnésio, o potássio são os principais íons. O oceano é considerado um ambiente estável que apresenta salinidade constante em torno de 35‰. As concentrações dos íons sódio é de 470 mM e cloreto 550 mM juntamente com os íons magnésio (54 mM) e potássio (10mM) somados resultam nos aproximados 1.050 mOsm/kgH<sub>2</sub>O<sup>-1</sup> da água do mar oceânica.

A água doce, que vem do continente ou as chuvas, podem reduzir a salinidade da água do mar nas regiões litorâneas (Schmidt-Nielsen 2002). Os estuários de rios possuem águas salobras com salinidade variando durante o dia em função do ciclo de marés, as quais são responsáveis pela mistura da água do mar com a água doce de rio. Nessa região litorânea a salinidade da água pode variar de 0,5‰ a 30‰ (Schmidt-Nielsen 2002). Esse ecossistema torna-se desafiador para os organismos sob o ponto de vista fisiológico.

O costão rochoso é um ambiente marinho exposto diariamente à alteração dos fatores físicos ambientais como a temperatura, a salinidade, a radiação solar. Por isso é um hábitat extremamente desafiador para os organismos que ali vivem, assim como os estuários (Freire et al. 2010). A distribuição desses organismos, diante dos desafios, reflete nas suas adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais. Formas incrustantes, corpo achatado, garras e ventosas são alguns exemplos dessas adaptações. Nos equinodermos de regiões de entremarés as principais adaptações morfológicas são as ventosas e a força nos músculos dos pés ambulacrais (Bulleri et al. 1999; Sanches-Jérez 2001).

O Filo Echinodermata compreende cinco classes: Asteroidea, Equinoidea, Holoturoidea, Crinoidea e Ofiuroidea. Todos são considerados invertebrados, exclusivamente marinhos, osmoconformadores e estenohalinos. Possuem hábitos

bentônicos e habitam tanto zonas de maré, bem como trechos oceânicos profundos podendo ocupar substratos arenosos assim como consolidados (Hyman 1955; Leake 1975; Lawrence 1987; Villet et al. 1988; Brusca e Brusca 2007; Cavey e Märkel 1994; Ruppert e Barnes 2005). Estes invertebrados marinhos apresentam o endoesqueleto subepidérmico de carbonato de Cálcio (calcita) que compreende uma série de ossículos produzidos pela mesoderme (Cavey e Märkel 1994; Barnes e Olive 1995). Estes ossículos podem fundir-se e formar placas perfuradas. Cada placa é formada como um simples cristal de calcita agrupando-se numa rede aberta a qual é preenchida com tecido, o estroma (Brusca e Brusca 2007). O endoesqueleto contém espinhos ou protuberâncias que dão à superfície corporal uma aparência verrugosa ou espinhosa, daí o nome equinodermo, que significa “pele espinhosa” (Hyman 1955). Seus órgãos estão dispostos dentro da cavidade do celoma perivisceral. A porção mais significativa da cavidade são as gônadas bem desenvolvidas. O sistema digestório é composto pela boca, esôfago, estômago, ceco, intestino, reto e ânus (Hyman 1955) (Fig.1).

Esses invertebrados apresentam duas características peculiares: ausência de órgão excretor e presença de uma glândula axial (Fig. 1). Essa glândula apresenta um tecido esponjoso, alongado, de coloração escura e que recebe vários nomes na literatura: “rim”, glândula ovóide, glândula marrom (Hyman 1955; Millott 1966; Millott e Farmanfarmanian 1967; Welsch e Rehkämper 1987; Warnau e Jangoux 1991; Cavey e Märkel 1994).

Todos os órgãos internos são banhados pelo fluido celômico, um líquido que apresenta concentração osmótica semelhante à água do mar. Os equinodermos possuem os líquidos corporais na concentração osmótica estável e quase igual à da água onde vivem. Contudo, seus fluidos corporais não mostram exatamente a mesma composição de solutos da água mar, por causa dos solutos orgânicos e alguns gradientes iônicos

pequenos, mas consistentes (Stickle e Diehl 1987; Schmidt-Nielsen 2002; Vidolin et al. 2007).

A classe Echinoidea é composta atualmente por aproximadamente 900 espécies divididas em duas sub-classes: Cidaroidea e Euechinoidea. A sub-classe Euechinoidea inclui os equinóides irregulares achatados (bolachas-da-praia) com seis ordens, e os equinóides regulares globosos (ouriços-do-mar) com oito ordens (Hendler 1995). Esse grupo apresenta uma variedade de formas e tamanhos, ausência de cabeça ou braços, porém todos possuem uma carapaça formada por placas calcáreas entrelaçadas de tal modo que conferem à parede do corpo do animal inflexibilidade e firmeza (Cavey e Märkel 1994; Hendler 1995). A região oral que fica em contato com o substrato apresenta a boca denteada (Cavey e Märkel 1994) e circundada por um tecido flexível, a membrana peristomial. Em equinóides regulares, a membrana peristomial apresenta cinco pares de pés curtos e fortes modificados que levam o alimento até a boca, cinco pares de pés modificados em brânquias (pés branquiais) além de espinhos pequenos e pedicelárias (Brusca e Brusca 2007; Ruppert e Barnes 2005) (Fig. 1). Os pés branquiais apresentam formato dendriforme (arborescente) com a abertura luminal voltada para o interior da cavidade celômica; o fluido que circula nesta região é o perifaríngeo (Cavey e Märkel 1994; Santos-Gouvea e Freire 2007). Da parede interna (parede celômica) projetam-se através da carapaça os pés ambulacrais. Estas estruturas atuam na locomoção e manuseio de alimentos, e na captura de materiais como conchas e pedras para proteção. A operação dos pés ambulacrais depende da regulação da pressão hidráulica do fluido do sistema de tubos fechados, e da ação individual dos músculos da ampola (Brusca e Brusca 2007; Carvey e Märkel 1994). Além dessas funções os pés ambulacrais são estruturas que realizam trocas gasosas e alguma excreção de amônia (Fenner 1973; Brusca e Brusca 2007).

Os ouriços do mar são equinodermos bentônicos habitantes de regiões de entremarés (região exposta ao ar na maré baixa) e regiões de sublitoral (região que nunca fica exposta ao ar). Esses animais apresentam comportamento alimentar variado, podendo ser herbívoros, comedores de material em suspensão ou detritívoros (Bulleri et al. 1999). Os ouriços do mar da espécie *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) são encontrados sobre a areia, no sublitoral com profundidade até 50 m e também em águas próximas a estuários (Gondin et al. 2008; Hill e Lawrence 2003; Sharp e Gray 1962; Junqueira et al. 1997; Tavares 2004 comunicação pessoal) (Fig. 2). *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) apresenta uma ampla distribuição em toda a costa brasileira, e aparece em maior abundância em locais que podem ficar expostos ao ar na maré baixa, sobre rochas ou em locais escavados. Outra característica interessante dessa espécie é que o animal pode ficar em posição invertida, ou seja, aderido às rochas com a boca voltada para cima ou para os lados. Ocorre diminuição em abundância com o aumento da profundidade (locais constantemente submersos), até aproximadamente 45 m (Castro et al. 1995; Sanchez-Jérez et al. 2001; McPherson 1969; Griinbaum 1978) (Fig. 3). A espécie *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) ocorre homogeneamente ao longo do costão rochoso, nos substratos verticais com profundidade inferior a 50 m, em regiões que não ficam expostas ao ar (Hendler 1995; Tavares 2004; Castro et al. 1995; Bulleri et al. 1999) (Fig. 4).

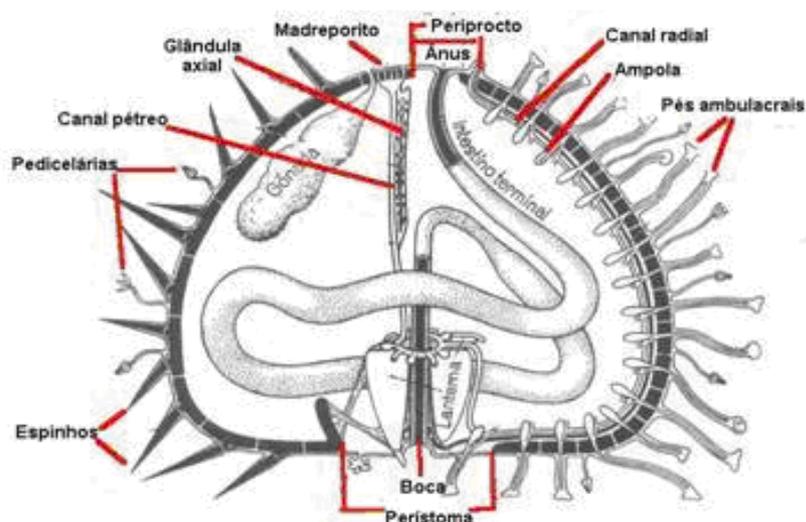


Figura 1: Corte longitudinal esquemático de um ouriço-do-mar mostrando o sistema vascular aquífero. Retirada e modificada de Kükenthal et al. (1986).

Aqueles invertebrados que vivem no ambiente marinho em geral não regulam significativamente a composição interna de seus líquidos corporais. Esses animais são chamados osmoconformadores. O fluido corporal extracelular apresenta a mesma concentração osmótica do meio externo, então são isosmóticos ao meio. No ambiente com diluição na salinidade o seu fluido pode tornar-se mais concentrado que o meio, causando entrada de água no corpo ou saída de íons. Os animais que mantêm diferença (gradiente) entre as concentrações do fluido extracelular e da água, diante de variação na salinidade são considerados osmorreguladores. Com manutenção da concentração osmótica do fluido celômico menor que o da água, os animais são chamados hiposmóticos e, em concentração maior que a água são chamados hiperosmóticos.

Os equinodermos são considerados osmoconformadores, entretanto possuem a capacidade de evitar ganho de água ou perda de íons comportando-se em alguns momentos (e algumas espécies) como íon-reguladores (Binyon 1962; Prusch 1977; Diehl 1986; Stickle e Diehl 1987; Vidolin et al. 2007). Na espécie de ouriço *Lytechinus variegatus*, observou-se manutenção de gradiente entre a água e o fluido celômico para o

ion potássio em diluição da água do mar. Diferenças na concentração de cloreto entre o fluido celômico e os fluidos do estômago e intestino também foram observadas neste animal (Bishop et al. 1994; Vidolin et al. 2007). O ofiuróide *Ophiocomina nigra* mostrou-se capaz de manter a concentração de potássio no fluido celômico 27% acima da água do mar (Pagett 1980). Na estrela do mar *Marthasterias glacialis*, a concentração de potássio no fluido do sistema vascular aquífero é 11% maior do que a concentração de potássio no fluido celômico. Esta absorção de potássio pode ser feita ativamente através do tecido dos pés ambulacrais (Robertson 1949), *Asterias rubens* e *A. forbesi* secretam potássio por processo ativo no fluido dos pés ambulacrais, tornando-os hiperosmóticos em relação ao meio ambiente e formando um gradiente para entrada de água para manutenção do volume dos pés (Prusch e Whoriskey 1976; Prush 1977). As concentrações de potássio e de cloreto nos pés ambulacrais de *Asterias forbesi* são maiores do que na água circundante e no fluido celômico. E também vale ressaltar que esta espécie adaptou-se a ambientes com salinidade de 15‰, ocorrendo no Mar Báltico e no Mar do Norte (Binyon 1962; Prusch 1977). Os equinodermos estão representados nos mais diferentes habitats e salinidades habitando regiões estuarinas, por exemplo, o asteróide *Luidia clathrata*, que resiste a um local com periódicas mudanças de salinidade variando diariamente de 15‰ a 30‰ (Diehl e Lawrence 1984 e 1985) e o ofiuróide *Ophiophragmus filograneus* encontrado exclusivamente em estuários (Talbot e Lawrence 2002). Indivíduos da espécie *Echinocardium cordatum* sobrevivem em água 27‰, *Echinus acutus* em 18‰, *Strongylocentrotus droebachiensis* em salinidades 14‰ e 5‰ e *Asterias rubens* em salinidade 8‰ (Stickle e Diehl 1987). Por outro lado, a distribuição bem como o tamanho dos equinodermos podem ser influenciados pela variação de salinidade do ambiente (Drouin et al. 1985; Diehl 1986; Himmelman et al 1984) e variações abruptas na salinidade podem provocar mais danos ao indivíduo do que o tempo prolongado e progressivo desta exposição (Stickle e Ahokas 1974). A grande relação superfície/volume

de animais menores torna-os mais sensíveis a baixas salinidades. Foi demonstrado que quando os ouriços são colocados em baixa salinidade há maior ganho de peso em ouriços menores do que em ouriços maiores (Himmelman et al. 1984). Contudo, aparentemente existem diferenças entre as espécies, e a relação superfície/volume não seria a única explicação para os fluxos difusivos observados quando os equinodermos são submetidos a mudanças de salinidade (Vidolin et al. 2007; Barker e Russell 2008).

A possível regulação iônica em equinodermos pode estar relacionada com a função fisiológica destes íons. Como relatado acima para o potássio e os pés ambulacrais. As concentrações dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{Mg}^{2+}$  mudam a viscosidade do corpo nos pepinos-do-mar (Hidaka 1983; Motokawa 1994; Trotter e Chino 1997). Em ouriços-do-mar e ofiuróides, o íon  $\text{Mg}^{2+}$  em altas concentrações diminui a viscosidade dos ligamentos dos espinhos e do corpo (Hidaka 1983; Motokawa 1994).

O volume e a composição dos fluidos de um organismo devem ser mantidos dentro de limites fisiológicos compatíveis com a vida (Aires 1991). Desafios osmóticos extremos podem causar lise de células livres ou dos órgãos de equinóides (Santos-Gouvea e Freire 2007; Barker e Russell 2008). O meio concentrado causa maiores danos aos tecidos do que a diluição (Diehl 1986; Santos-Gouvea e Freire 2007). Alguns equinodermos são capazes de manter o fluido celômico em concentrações ideais mesmo em ambientes de salinidade desafiadora. A atividade das células livres no fluido celômico depende dessa manutenção.

O fluido celômico é o líquido que banha todos os órgãos de ouriços do mar e é considerado um líquido estéril, asséptico, portanto livre de bactérias (Bang e Lemma 1962; Gross et al. 1999;) e isso é devido às atividades dos celomócitos e também a uma variedade de moléculas de defesa como peptídeos e proteínas antibióticas, lectinas, aglutininas, opsonizadores, lisozimas (Gross et al. 1999; Haug et al. 2002).

Os celomócitos são células livres encontrados preenchendo os espaços celômicos, que vagam pelos tecidos e órgãos nos equinodermos (Hyman 1955). Também estão distribuídos entre o sistema vascular aquífero, sistema hemal, membrana peristomial, parede do corpo e órgãos como nos tecidos do reto, entre as células epiteliais dos pés ambulacrais, dos pés branquiais e da glândula axial (Hyman 1955; Millott e Farmanfarmaian 1967; Farmanfarmaian 1968; Boolootian 1966; Coleman 1969; Holland e Ghiselin 1970; Cobb e Sneddon 1977; Florey e Cahill 1977; Bachmann e Goldschmid 1978; Bachmann et al. 1980; Leclerc et al. 1980; Wood e Cave 1981; Eliseikina e Magarlamov 2002; Haug et al. 2002; Santos-Gouvea e Freire 2007; Faria e Silva 2008).

Quando estão dispersas no fluido celômico, estas células apresentam várias cores. Estão descritas células brancas, vermelhas, verde-oliva e marrons. Essas células podem ser classificadas de acordo com sua forma, tamanho e conteúdo citoplasmático (Bachmann e Goldschmid 1978; Höbaus 1978; Bachmann et al. 1980; Kaneshiro e Karp 1980; Coteur et al. 2002; Eliseikina e Magarlamov 2002; Borges et al. 2005; Smith et al. 2006; Santos-Gouvea e Freire 2007).

Há sete tipos de celomócitos: os amebócitos fagocíticos, a célula esférica branca (célula mórula branca), a célula esférica vermelha com grânulos vermelhos (célula mórula vermelha), as células vibráteis, as células cristais, as células progenitoras e os hemócitos (Hyman 1955; Chia e Xing 1996; Lin et al. 2007).

Os celomócitos são as células responsáveis pela mediação das respostas imunes por citotoxicidade, fagocitose, limpeza de materiais estranhos como microorganismos, trocas gasosas, estocagem de nutrientes, produção de componentes do tecido conjuntivo, cicatrização por remoção de tecidos mortos, produção de moléculas antimicrobianas, capacidade de infiltração em locais lesionados, transporte de oxigênio, e até regulação osmótica (Karp e Hildemann 1976; Kaneshiro e Karp 1980; Leclerc et al. 1980; Edds 1993; Silva e Peck 2000; Borges et al. 2002; Eliseikina e Magarlamov 2002; Haug et al.

2002; Smith et al. 2006; Lin et al. 2007; Arizza et al. 2007; D'Andrea et al. 2008; Dolmatov e Ginanova 2009).

Na população de celomócitos, as células redonda vermelha, branca e do tipo amebócito fagocítico são os mais representativos na função imunológica. Foi identificada alta atividade citotóxica das células redondas brancas na presença de amebócitos fagocíticos, indicando a ocorrência de interação entre os celomócitos (Arizza et al. 2007).

As células redondas vermelha ou células mórula apresentam diferentes tipos com diâmetros variando de 4 até 13  $\mu\text{m}$ . O núcleo geralmente é arredondado, possuem um nucléolo evidente e pequenas manchas de heterocromatina. Muitos retículos endoplasmáticos rugosos e complexo de Golgi que ocupam a porção perinuclear do citoplasma (Eliseikina e Magarlamov 2002). Além disso, possui também atividade bactericida (Messer e Wardlaw 1979). Pouco se sabe a respeito da morfologia das células brancas, apenas que possuem inclusões esféricas em seu interior e que não possuem atividade bactericida, embora possuam aglutininas (Messer e Wardlaw 1979). Os amebócitos fagocíticos são células capazes de fazer movimentos amebóides. Possuem um diâmetro entre 3 a 10  $\mu\text{m}$ . O núcleo é muitas vezes redondo contendo um nucléolo proeminente. O citoplasma perinuclear contém cisternas de retículo endoplasmático rugoso além de vários vacúolos com material eletrondenso. A principal função deste tipo celular é a fagocitose (Eliseikina e Magarlamov 2002).

A fagocitose é uma resposta celular onde os fagócitos amebóides reconhecem, ingerem e destroem partículas maiores que 0.5  $\mu\text{m}$  (Silva e Peck 2000; Alberts et al. 2004). Estas partículas desencadeiam a ativação celular, por meio da qual ocorre a polimerização dos filamentos de actina que é o mecanismo empregado pelos celomócitos para englobar microorganismos do fluido celômico. Dessa maneira o citoesqueleto altera sua forma (Smith et al. 1995) levando à motilidade da célula, aumento na fagocitose e encapsulamento, bem como a exocitose de substâncias tóxicas (Smith et al. 1995;

D'Andrea et al. 2008). Através de microscopia evidenciou-se a migração de celomócitos amebócitos do celoma perivisceral para o tecido conjuntivo peristomial em *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* (Mangiaterra e Silva 2001; Faria e Silva 2008). A capacidade de migração foi identificada por injeção de ferritina na cavidade celômica, com intenção de marcar amebócitos fagocíticos e de nanquim na membrana peristomial para causar inflamação. Estas células foram encontradas marcadas com ferritina no tecido da membrana peristomial (Mangiaterra e Silva 2001; Faria e Silva 2008) sendo que a migração das mesmas ocorre por quimiotaxia (Borges et al. 2005).

O complexo axial dos equinodermos é composto de um órgão axial circundado pelo sinus axial. Uma definição própria para a função do órgão axial em equinóides ainda não esta bem definida (Bachmann et al. 1980). Segundo Bachmann e Goldschmid (1978) este órgão é sugerido como tendo funções de excreção e degradação de produtos celular via sistema vascular aquífero. Evidências indicam ainda que este órgão possa estar envolvido no processo de diferenciação e atividade de celomócitos fagocíticos. A glândula axial apresenta células livre tais como: a célula mórula, fagócitos, leucócitos e fibrócitos. O citoplasma dessas células está preenchido por vacúolos e grande variedade de grânulos lisossomais (Bachmann e Goldschmid 1978; Bachmann et al. 1980; Canicatti et al. 1989; Eliseikina e Magarlamov 2002). Millott e Farmanfarmanian (1967) descreveram este órgão como sendo o maior local de degradação de produtos celômicos. Estas células podem despejar na lacuna do órgão axial e no reto o material fagocitado no fluido celômico (Bachmann et al. 1980).

O intestino dos equinóides é formado por um epitélio linear que inclui células de muco. Este epitélio pode incluir dois tipos celulares diferentes associados ao muco, dentre eles os celomócitos contendo muco na parede do tecido intestinal (Holland e Ghiselin 1970). A excreção pode ocorrer pela secreção ativa de substâncias para fora da cavidade

corporal, passando através das células do ceco retal e dos enterócitos do intestino para o lúmen (Warnau et al. 1998; Warnau e Jangoux 1999).

A ultra-estrutura dos enterócitos é semelhante às células tubulares do rim de mamíferos, apresentando membrana apical com borda em escova e membrana basal associada a numerosas mitocôndrias alongadas (Warnau et al. 1998; Warnau e Jangoux 1999). Também há evidências de eliminação de produtos pela interação dos celomócitos fagocíticos associados aos enterócitos do reto, aos pés ambulacrais e aos pés branquiais (Cobb e Sneddon 1977; Bachmann e Goldschmid 1978; Brusca e Brusca 2007). Há relatos de que o tecido do intestino apresenta células com grânulos eletrondensos no citoplasma, podendo sugerir que estas células sejam de natureza lisossômica (Santos-Gouvea e Freire 2007).

O pé branquial tem por função principal a troca gasosa e também excreção (Fenner 1973). Binyon (1972) propôs que partes dos pés branquiais são automatizadas por contrações musculares e que estas partes contêm produtos de excreção. Também ficaram demonstrados três possíveis processos de excreção: as células necróticas passam através do lúmen celômico para os pés brânquiais diretamente para fora ou algumas células necróticas podem ser fagocitadas pelas células intersticiais e a partir daí resíduos de membrana, lisossomos e grânulos com pigmentos serem liberados para o interior por exocitose e ainda células intersticiais podem ser empacotadas com vários produtos de descarte e então cometer autofagia, com toda célula sendo liberada para o exterior (Cobb e Sneddon 1977).

A locomoção dos equinodermos ocorre através dos pés ambulacrais que é um órgão hidráulico. Dentre os tecidos deste órgão são encontrados amebócitos fagócitos em grupos ou individuais entre as células epiteliais, especialmente nas papilas (ou pregas). A posição destas células no tecido epitelial pode estar atrelada a função de proteção contra microorganismos ou possivelmente envolvida na excreção (Coleman 1969). Entre as

células que constituem os pés ambulacrais e pés branquiais ocorrem algumas células migratórias preenchidas com grânulos eletrondensos (Florey e Cahil 1977; Santos-Gouvea e Freire 2007). Raramente foram encontrados pequenos grânulos eletrondensos e vesículas, possivelmente de natureza lisossomal nas células epiteliais dos pés ambulacrais (Coleman 1969; Wood e Cavey 1981).

Os lisossomos são organelas citoplasmáticas com função de digestão intracelular em mamíferos. São responsáveis pela degradação de materiais estranhos internalizados por endocitose assim como de materiais intracelulares (Fukuda 1991; Alberts et al. 2004). Estas organelas possuem uma membrana que delimita o seu material interno. A membrana apresenta funções importantes, como a de resistência a degradação pelas hidrolases contidas em seu interior e sua habilidade de interagir e fundir-se com outras organelas membranosas, como endossomos, fagossomos e mesmo a membrana plasmática. Grande parte desta membrana lisossomal é constituída por glicoproteínas, chamada Lamp (em inglês *lysosome associated membrane protein*). Existem dois tipos principais, a Lamp-1 e a Lamp-2. Estas duas proteínas são homólogas e compartilham similaridades no estrutura do domínio protéico. A Lamp-1 é utilizada para indicar a presença de lisossomos nas células (Fukuda 1991).

No presente trabalho, caracterizou-se de maneira inédita, em ouriços do mar *Echinometra lucunter*, a capacidade de degradação dos tecidos (pé ambulacral e branquial, reto e glândula axial), indicando-os como potenciais vias de excreção dentro deste grupo de equinodermos.



Figura 2: *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). Barra de escala= 2cm.

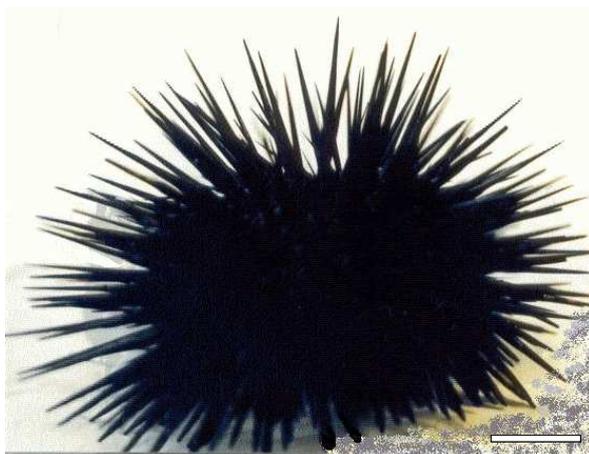


Figura 3: *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758). Barra de escala= 2 cm.



Figura 4: *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758). Barra de escala= 2 cm.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

**Ampliar conhecimentos sobre a fisiologia dos equinodermos: regulação iônica e excreção.**

### **Objetivos específicos:**

- 1. Comparar em relação à capacidade de regulação osmótica e iônica três espécies de ouriços do mar: *Lytechinus variegatus*, *Echinometra lucunter*, *Arbacia lixula* de ambientes diferentes, simulando variação de maré.**
- 2. Investigar o papel dos tecidos dos pés ambulacrais, dos pés branquiais, do reto e da glândula axial na excreção, diante da injeção de leveduras ou presença da proteína lisossomal.**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aires MM (1991) Fisiologia. Guanabara Koogan, São Paulo

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (2004) Biologia Molecular da Célula. Editora Artes Médicas

Arizza V, Giaramita FT, Parrinelo D, Cammarata M, Parrinelo N (2007) Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. *Comp Biochem Physiol* 147A:389-394

Bachmann S, Goldschmid A (1978) Fine structure of the axial complex of *Sphaerechinus granularis* (Lam.) (Echinodermata: Echinoidea). *Cell Tiss Res* 193:107-123

Bachmann S, Pohla H, Goldschmid A (1980) Phagocytes in the axial complex of the sea urchin, *Sphaerechinus granularis* (Lam.). *Cell Tiss Res* 213:109-120

Bang FB, Lemma A (1962) Bacterial infection and reaction to injury in some echinoderms. *J Invert Pathol* 4:401-414

Barker MF, Russell MP (2008) The distribution and behaviour of *Patiriella mortenseni* and *P. regularis* in the extreme hyposaline conditions of the Southern New Zealand Fiords. *J Exp Mar Biol Ecol* 355:76–84

Barnes RSK, Olive PJW (1995) Os invertebrados – uma nova síntese. Atheneu, São Paulo

Binyon J (1962) Ionic regulation and mode of adjustment to reduced salinity of the starfish *Asterias rubens*. *Mar Biol Ass UK* 42:49-69

Binyon J (1966) Salinity tolerance and ionic regulation. In: Boolootian, R.A (ed) *Physiology of Echinodermata*. Interscience Publishers, New York

Binyon, J (1972) *Physiology of Echinoderms*. Pergamon Oxford

Bishop D, Lee KJ, Watts SA (1994) A comparison of osmolality and specific ion concentrations in the fluid compartments of the regular sea urchin *Lytechinus variegatus* Lamarck (Echinodermata: Echinoidea) in varying salinities. *Comp Biochem Physiol* 108 A:497-502

Boolootian RA (1966) *Physiology of Echinodermata*. Interscience Publishers, New York

Borges JCS, Porto-Neto LR, Mangiaterra MBBCD, Jensch-Junior BE, Silva JRMC (2002) Phagocytosis in vitro and in vivo in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* at 0°C. *Polar Biol* 25:891-897

Borges JCS, Jensch-Junior BE, Garrido PAG, Mangiaterra MBBCD, Silva JRMC (2005) Phagocytic amoebocyte sub populations in the perivisceral coelom of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). *J Exp Zool* 303A:241-248

Brusca GJ, RC Brusca (2007) *Invertebrados*. 2ª Ed. Guanabara Koogan

Bulleri F, Benedetti-Cecchi L, Cinelli F (1999) Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* L. and *Paracentrotus lividus* Lam. in the northwest Mediterranean. *J Exp Mar Biol Ecol* 241:81-95

Canicatti C, D'Ancona G, Farina-Lipari E (1989) The coelomocytes of *Holothuria polii* (Echinodermata). I. Light and electron microscopy. *Boll Zool* 56:29-36

Castro CB, Echeverria C A, Pires DO, Mascarenhas BJA, Freitas SG (1995) Distribuição de Cnidaria e Echinodermata no infralitoral de costões rochosos de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Biol* 55:471-480

Cavey MJ, Märkel K (1994) Echinoidea. In Harrison FW and Chia FS (eds) *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Echinodermata. Vol. 14*. New York: Wiley-Liss, pp. 345–400

Chia FS, Xing J (1996) Echinoderm coelomocytes a review. *Zool Stud* 35:231-254

Cobb JL S, Sneddon E (1977) An ultra-structural study of the gills of *Echinus esculentus*. *Cell Tiss Res* 182: 265-274

Coleman R (1969) Ultrastructure of the tube foot wall of a regular echinoid, *Diadema Antillarum* Philippi. *Z. Zellforsch* 96:162-172

Coteur G, DeBeker G, Warnau M, Jangoux M, Dubois P (2002) Differentiation of immune cells challenged by bacteria in the common European starfish, *Asterias rubens* (Echinodermata). *Eur J Cell Biol* 81:413-418

D'Andrea-Winslow L, Novitski A K (2008) Active bleb formation is abated in *Lytechinus variegatus* red spherule coelomocytes after disruption of acto-myosin contractility. *Integrative Zoology* 3:115–122

Diehl WJ, Lawrence JM (1984) The effect of salinity on coelomic fluid osmolyte concentration and intracellular water content in *Luidia clathrata* (say) (Echinodermata:Asteroidea). *Comp Biochem Physiol* 1:119-126

Diehl WJ, Lawrence JM (1985) Effect of salinity on the intracellular osmolytes in the pyloric caeca and tube feet of *Luidia clathrata* (Say) (Echinodermata: Asteroidea). *Comp Biochem Physiol* 82A:559–566

Diehl WJ (1986) Osmoregulation in echinoderms. *Comp Biochem Physiol* 84A(2):199-205

Dolmatov IY, Ginanova TT (2009) Post-autotomy regeneration of respiratory trees in the holothurian *Apostichopus japonicus* (Holothuroidea, Aspidochirotida). *Cell Tissue Res* 336:41-58

Drouin G, Himmelman JH, Béland P (1985) Impact of tidal salinity fluctuations on echinoderm and mollusc populations. *Can J Zool* 63:1377-1387

Edds KT (1993) Cell biology of echinoid coelomocytes. *J Invert Pathol* 61:173-178

Eliseikina MG, Margalamov TY (2002) Coelomocyte morphology in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). *Russian Journal of Marine Biology* 28(3):197-202

Faria MT, Silva JRMC (2008) Innate immune response in the sea urchin *Echinometra lucunter* (Echinodermata). *J Inv Pathol* 98:58-62

Farmanfarmaian A (1968) The controversial echinoid heart and hemal system – function effectiveness in respiratory exchange. *Comp Biochem Physiol* 24:855-863

Fenner DH (1973) The respiratory adaptations of the podia and ampullae of echinoids (Echinodermata). *Biol Bull* 145:323-339

Florey E, Cahill M A (1977) Ultrastructure of sea urchin tube feet. *Cell Tiss Res* 177:195-214

Freire CA, Santos IA, Vidolin D (2010) Osmolality and ions of the perivisceral coelomic fluid of the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter* upon salinity and ionic challenges. *Submetido ao Zool Stud*.

Fukuda M (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 266: 21327-21330

Gondin AI, Lacouth P, Alonso C, Manso CLC (2008) Echinodermata from Cabo Branco Beach, João Pessoa, Paraíba, Brazil. *Biota Neotrop*. 8(2):151-159

Griinbaum H, Bergman G, Abbott DP, Ogden JC (1978) Intraspecific agonistic behavior in the rock-boring sea urchin *Echinometra lucunter* (L.) (Echinodermata: Echinoidea). *Bull Mar Sci* 28(1):181-188

Gross PS, Al-Sharif WZ, Clow LA, Smith LC (1999) Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Dev Comp Immunol* 23:429-442

Haug T, Kjuul AK, Styrvold OB, Sandsdalen E, Olsen OM, Stensvag K (2002) Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *J Invert Pathol* 81:92-102

Hendler G, Miller JE, Pawson DL, Kier P M (1995) Echinoderms of Florida and the Caribbean: Sea Stars, Sea Urchins, and Allies. Smithsonian Institution Press, Washington

Hidaka M (1983) Effects of certain physico-chemical agents on the mechanical properties of the catch apparatus of the sea-urchin spine. *J Exp Biol* 103:15-29

Hill SK, Lawrence JM (2003) Habitats and characteristics of the sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Arbacia punctulata* (Echinodermata) on the Florida Gulf-coast shelf. *Mar Ecol* 24(1):15-30

Himmelman JH, Guderley H, Vignault G, Drouin G, e Wells PG (1984) Response of the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, to reduced salinities: importance of size, acclimation, and interpopulation differences. *Can J Zool* 62:1015–1021

Höbaus E (1978) Studies on phagocytes of regular sea urchins (Echinoidea, Echinodermata). 1. The occurrence of iron containing bodies within the nuclei of phagocytes. *Zool Anz* 200:31-40

Holland, ND, Guiselin MT (1970) A comparative study of gut mucous cells in thirty-seven species of the class echinoidea (Echinodermata). *Bio Bull* 138:286-305

Hyman HL (1955) *The Invertebrates: Echinodermata, Vol. IV*. New York: McGraw-Hill Book Company

Junqueira AOR, Ventura CRR, Carvalho ALPS, Schmidt AJ (1997) Population recovery of the sea urchin *Lytechinus variegatus* in a seagrass flat (Araruama Lagoon, Brazil): the role of recruitment in a disturbed environment. *Invert Rep Dev* 31:143-150

Kaneshiro ES, Karp RD (1980) The ultrastructure of coelomocytes of the sea star *Dermasterias imbricate*. *Biol Bull* 159:295-310

Karp RD, Hildemann WH (1976) Specific allograft reactivity in the sea star *Dermasterias imbricata*. *Transplant* 22:434-439

Kükenthal W, Mathes E, Renner, M (1986) *Guia de trabalhos práticos de zoologia*. Almeida Coimbra

Lawrence J (1987) *A Functional Biology of Echinoderms*. Johns Hopkins University Press, Baltimore

Leake DL (1975) Comparative histology an introduction to the microscopic structure of animals. Academic Press, London

Leclerc M, Brillouet C, Luquet G (1980) The starfish axial organ: An ancestral lymphoid organ. *Dev Comp Immunol* 4:605-615

Mangiaterra MBBCD, Silva JRMC (2001) Induced inflammatory process in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *J Invertebr Biol* 120:178-184

McPherson BF (1969) Studies on the biology of the tropical sea urchins, *Echinometra lucunter* and *Echinometra viridis*. *Bull Mar Sci* 19(1):194-213

Messer LI, Wardlaw AC (1979) Separation of the coelomocytes of *Echinus esculentus* by density gradient centrifugation. Proceedings of the European Colloquium on Echinoderms/Brussels 3-8

Lin W, Grant S, Beck G (2007) Generation of monoclonal antibodies to coelomocytes of the purple sea urchin *Arbacia punctulata*: Characterization and phenotyping. *Dev Comp Immunol* 31:465-475

Millott N (1966) A possible function for the axial organ of echinoids. *Nat* 209:594-596

Millott N, Farmanfarmaian A (1967) Regeneration of the axial organ of *Arbacia punctulata* and its implications. *Nat* 216:1136-1138

Motokawa T (1994) Effects of ionic environment on viscosity of triton- extracted connective tissue of a sea cucumber body wall. *Comp Biochem Physiol* 109B:613-622

Pagett RM (1980) Distribution of sodium, potassium and chloride in the ophiuroid, *Ophiocomina nigra* (Abildgaard). *J Mar Biol Ass UK* 60:163-170

Prusch R D, Whoriskey, F (1976) Maintenance of fluid volume in the starfish water vascular system. *Nat* 262:577-578

Prusch RD (1977) Solute secretion by the tube foot epithelium in the starfish *Asterias forbesi*. *J Exp Biol* 68:35-43

Robertson JD (1949) Ion regulation in some marine invertebrates. *J Exp Biol* 26:182-200

Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD (2005) Zoologia dos Invertebrados. 7ª Ed. Roca, São Paulo

Sánchez-Jérez P, Cesar A, Cortez FS, Pereira CDS, Silva SLR (2001) Distribución espacial de las poblaciones de erizos más abundantes de la costa sudeste del litoral de São Paulo (Brasil). *Cienc Mar* 27(1):139-154

Santos-Gouvea IA, Freire CA (2007) Effects of hypo- and hypersaline seawater on the microanatomy and ultrastructure of epithelial tissues of *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) of intertidal and subtidal populations. *Zool Stud* 46:203–215

Schmidt-Nielsen K (2002) *Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente*. Santos, São Paulo

Sharp DT, Gray IE (1962) Studies on factors affecting the local distribution of two sea urchins, *Arbacia punctulata* and *Lytechinus variegatus*. *Ecology* 43 (2):309-313

Silva JRMS, Peck L (2000) Induced in vitro phagocytosis of the Antarctic starfish *Odonaster validus* (Koehler 1906) at 0°C. *Polar Biol* 23:225-230

Smith LC, Britten R J, Davidson E H (1995) Lipopolysaccharide Activates the Sea Urchin Immune System. *Dev Comp Immunol* 19:217-224

Smith LC, Rast JP, Brockton V, Terwilliger DP, Nair SV, Buckley KM, Majeskie AJ (2006) The sea urchin immune system. *ISJ* 3:25-39

Stickle WB, Ahokas R (1974) The effects of tidal fluctuations of salinity on the perivisceral fluid composition of several echinoderms. *Comp Biochem Physiol* 47A:469-476

Stickle WB, Diehl WJ (1987) Effects of salinity on echinoderms. In: Jangoux M, Lawrence JM (ed) *Echinoderm Studies*, AA Balkema, Rotterdam 235-285

Talbot TD, Lawrence JM (2002) The effect of salinity on respiration, excretion, regeneration and production in *Ophiophragmus filograneus* (Echinodermata: Ophiuroidea). *J Exp Mar Biol Ecol* 275:1–14

Tavares YAG (2004) Biologia reprodutiva dos equinóides *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) e *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) na Ilha da Galheta, litoral paranaense, Brasil. Tese, Universidade Federal do Paraná

Trotter JA, Chino K (1997) Regulation of cell-dependent viscosity in the dermis of the sea cucumber *Actinopyga agassizi*. *Comp Biochem Physiol* 118 A(3):805-811

Vidolin D, Santos-Gouvea IA, Freire CA (2007) Differences in ion regulation in the sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea). *J Mar Biol Ass UK* 87:769-775

Villee CA, Walker Jr. WF, Barnes RD (1988) *Zoologia Geral*. Guanabara, Rio de Janeiro

Warnau M, Jangoux M (1999) *In vitro* and *in vivo* investigations of the excretory function of the rectal caeca in the asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata). *Comp Biochem Physiol* 123A:263-267

Warnau M, Temara A, Ameye L, Jangoux M (1998) The excretory function of the posteriormost part of the echinoid and holothuroid gut (Echinodermata). *Comp Biochem Physiol* 120A:687-691

Welsch U, Rehkämper G (1987) Podocytes in the organ of echinoderms. *J Zool* 213:45-50

Wood RL, Cavey MJ (1981) Ultrastructure of the coelomic lining podium of the starfish *Stylasterias forreri*. *Cell Tiss Res* 218:449-473

**CAPÍTULO 1: VARIABILIDADE INTER-ESPECÍFICA NA MANUTENÇÃO DE GRADIENTES IÔNICOS NOS OURIÇOS-DO-MAR *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816), *Echinometra lucunter* (Linnaeus.,1758) E *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) (ECHINODERMATA, ECHINOIDEA) <sup>1</sup>**

Ivonete Aparecida dos Santos & Carolina Arruda Freire

<sup>1</sup> Capítulo formatado para a revista: Marine Biology

## RESUMO

Os equinodermos são considerados animais marinhos, estenohalinos, osmoconformadores e não possuem órgão excretor, porém são capazes de tolerar mudanças da salinidade da água do mar e manter gradientes iônicos. Os ouriços do mar são equinodermos bentônicos habitantes de regiões entremarés (região exposta ao ar na maré baixa) e regiões de sublitoral (região que nunca fica exposta ao ar). Esses ambientes podem refletir comportamento ecológico e fisiológico distintos nesses animais. Três espécies de ouriços-do-mar regulares: *Lytechinus variegatus*, *Echinometra lucunter* e *Arbacia lixula* foram expostas a curta e progressiva diminuição e aumento da salinidade (simulando ciclo de maré) para caracterizar os efeitos dessas flutuações de salinidade na composição iônica do fluido celômico (fluido extracelular). Foi aplicado também o teste de endireitamento "Righting-Time-Response": tempo gasto pelo animal, após ser manualmente invertido (boca para cima), para retornar com a boca para o substrato verificando assim, o grau de estresse dos animais. Houve diferença no comportamento iônico das espécies no experimento de redução e aumento da salinidade. De forma geral nestes estudos foram revelados alguns padrões de concentração iônica e osmótica. E estes resultados foram similares àqueles que ocorrem nas várias espécies dentro do filo Echinodermata. Ocorreu diferença na capacidade de regulação osmo-iônica entre as três espécies deste estudo. *Lytechinus variegatus* habita regiões submersas em contato com a areia e são capazes de regular íons. *Echinometra lucunter* habita a porção batida do costão, ficam presos a locas e são capazes de regular íons. *Arbacia lixula* habita o estrato intermediário onde sofre ação das ondas, não fica dentro de locas e não apresentam capacidade de regular íons.

## ABSTRACT

Echinoderms are an exclusively marine group of invertebrates. They are stenohaline, osmoconformers, and do not display any specific excretory organ. However, they are able to tolerate certain changes in seawater salinity, maintaining subtle ionic gradients between their coelomic fluid and external seawater. Sea urchins are benthonic organisms, that frequently inhabit intertidal areas, thus being potentially exposed to the air during low tides. On the other hand, other species are restricted to sublittoral zones, remaining always submerged. The occupation of these different habitats may reflect into a different physiology. Three species of regular sea-urchins: *Lytechinus variegatus*, *Echinometra lucunter*, and *Arbacia lixula* have been exposed to progressive seawater dilution and seawater concentration, simulating a tidal cycle. The “Righting-Time-Response” test was applied, and coelomic fluid was sampled, every 1 hour. Urchins remained 1 hour in each test salinity, in both experiments. In addition, the ionic composition of coelomic and intestinal fluids have been compared. *Lytechinus variegatus* and *Echinometra lucunter* displayed differences in potassium concentrations between coelomic and intestinal fluids. *Lytechinus variegatus* is a sublittoral species that inhabits sandy areas, and has shown the highest capacity, among the 3 species, to maintain ionic gradients between coelomic fluid and external seawater, upon salinity reduction or increase. *Echinometra lucunter* inhabits crevices in intertidal rocky coasts, and has also shown some capacity to maintain ionic gradients, albeit generally of lower magnitude than *L. variegatus*, of similar size. *Arbacia lixula*, restricted to sublittoral rocks, is evidently less able to maintain gradients, and shows a more obvious osmo (and ionic) conforming behaviour. This may be partly explained by its smaller size, thus higher surface/area relationship.

## INTRODUÇÃO

O costão rochoso, na zona entremarés, é um ambiente desafiador para os organismos porque estes podem ficar expostos ao ar e submetidos a dessecação durante a maré baixa ou submersos nas águas das poças de maré. Quando estão nas poças podem ser submetidos à diluição do meio sob chuva forte, ou a concentração da água por incidência de raios solares intensos. Os indivíduos de sublitoral, que é região constantemente submersa, não são submetidos a estes fatores (Schmiegelow 2004).

Os equinodermos são invertebrados exclusivamente marinhos, presentes em todos os oceanos desde a região entremarés até as zonas mais profundas (Ribeiro-Costa e Rocha, 2006). Os equinóides fazem parte desse grupo e são representados pelos ouriços do mar. Na costa brasileira três espécies de ouriços do mar são comumente observadas, *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) são ouriços encontrados sobre rochas, ocupando locas ou fendas. Nas fendas apresentam o comportamento de ficar com a boca voltada para cima. Ficam expostos ao ar durante a maré baixa e habitam também as regiões constantemente submersas com profundidades até 45 m (McPherson 1969; Griinbaum et al 1978; Castro et al. 1995; Hendler et al. 1995; Sánchez-Jérez et al. 2001). Outra espécie comum no litoral do Brasil é *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) ocorre no sublitoral sendo comum em substratos verticais (Benedetti-Cecchi et al. 1998). Esse ouriço ocupa o sublitoral nas regiões sujeitas a ação das ondas (Chelazzi et al. 1999) com profundidade até 50 m, não ficam expostos ao ar na maré baixa (Hendler et al 1995; Tavares 2004; Castro et al. 1995; Bulleri et al. 1999). A espécie *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816) ocorre apenas no sublitoral, em substratos horizontais moles (sobre a areia) e com profundidade também inferior a 50 m. Esta espécie pode ser encontrada em águas próximas a estuários (Sharp e Gray 1962; Junqueira et al. 1997; Hill e Lawrence 2003; Tavares 2004 comunicação pessoal; Gondim et al. 2008).

O corpo globoso dos ouriços do mar apresenta a cavidade celômica preenchida pelo fluido celômico (Hyman 1955). Esse fluido é semelhante à água do mar no que se refere aos íons inorgânicos contém ainda, moléculas orgânicas e gases e nesse fluido são encontradas também as células livres (os celomócitos) (Hyman 1955; Schmidt-Nielsen 2002). A concentração osmótica do fluido celômico destes invertebrados acompanha a flutuação de salinidade da água (Binyon 1966). A parede do corpo e os pés ambulacrais são permeáveis a água do ambiente. Animais que igualam as concentrações do seu fluido celômico perivisceral com a água do meio circundante são chamados osmoconformadores, por não apresentarem órgãos ou tecidos osmorreguladores, capazes de realizar transporte ativo de sal (Hyman 1955; Boolootian 1966; Stickle e Ahokas 1974; Drouin et al. 1985; Roller e Stickle 1993; Cavey e Märkel 1994; Warnau et al. 1998; Warnau e Jangoux 1999; Santos-Gouvea e Freire 2007; Vidolin et al. 2007). São em geral estenohalinos, significando baixa tolerância a flutuações de salinidade. No entanto, os desafios fisiológicos (no que se refere à salinidade) tolerados por esses animais estão amplamente demonstrados na literatura (Lange 1964; Binyon 1966; Stickle e Ahokas 1974; Stickle e Denoux 1976; Shumway 1977; Turner e Meyer 1980; Ernest e Blake 1981; Soubarin e Stickle 1981; Himmelman et al 1984; Diehl e Lawrence 1984; Drouin et al. 1985; Forcucci e Lawrence 1986; Stickle e Diehl 1987; Roller e Stickle 1994; Foglieta e Herrera 1996; Talbot e Lawrence 2002; Barker e Russell 2008). Desafios salinos interferem na distribuição, desenvolvimento, reprodução e alimentação dos equinodermos (Pagett 1980; Lessios 1981; Drouin et al. 1985). A flutuação de salinidade num ciclo de maré pode afetar as funções fisiológicas dos invertebrados, no entanto pouco se conhece sobre as respostas osmo-iônicas diante desses desafios ambientais (Kinne 1964). E sua capacidade de regulação iônica, contudo, não está ainda claramente demonstrada na literatura. As espécies *L.variegatus* e *A. lixula*, quando expostas a diferentes diluições de água do mar, apresentaram conformação iônica em todas as

salinidades (Bishop et al 1994; Vidolin et al. 2007). Entretanto verificou-se que *Lytechinus variegatus* apresenta-se hiper-osmótica e hiper-iônica para o sódio e potássio em relação à água do aquário, indicando capacidade de manter gradientes iônicos (Vidolin et al. 2007). Indivíduos de *Echinometra lucunter*, quando expostos a baixas salinidades, apresentam perda de atividade dos pés ambulacrais. A menor salinidade tolerada foi de 20‰, corroborando com os resultados de Metaxas (1998) que observou morte em larvas dessa espécie nas salinidades 18 e 15‰.

Ouriços que ocupam o costão rochoso na região entremarés estão sujeitos aos ciclos das marés. Aqueles da região de mesolitoral podem ficar expostos ao ar na maré baixa, no entanto aqueles de sublitoral dificilmente ficarão expostos. *Lytechinus variegatus*, *Echinometra lucunter* e *Arbacia lixula* que apresentam diferentes características taxonômicas, ecológicas e morfológicas, foram expostas a curta e progressiva diluição ou concentração da água do mar (simulando ciclo de maré) para caracterizar os efeitos dessas flutuações de salinidade na composição iônica do fluido celômico. Além da diluição ou concentração gradativa da água do mar foi aplicado também o teste de endireitamento para verificar o grau de estresse dos animais.

A hipótese deste trabalho foi de que três espécies de ouriços do mar habitantes de costão rochoso apresentam diferenças na concentração osmo-iônica do seu fluido celômico diante da mesma diluição ou da concentração da água do mar.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local de coleta**

Os ouriços *Lytechinus variegatus*, *Echinometra lucunter* e *Arbacia lixula* foram coletados manualmente na maré baixa nos costões rochosos da praia da Sepultura, do Araçá e praia do Trapiche em Bombinhas, Santa Catarina, Brasil, (27° 08' 48" S e 48° 28' 54" W) nos anos 2006 (junho), 2007 (julho) e 2008 (janeiro). Os ouriços *Lytechinus*

*variegatus* foram coletados por meio de mergulho autônomo. O comprimento maior da carapaça de todos os animais foi medido: *Lytechinus variegatus*  $111,4 \pm 2,58$  mm, *Echinometra lucunter*  $139,2 \pm 4,7$  mm e *Arbacia lixula*  $84,4 \pm 1,9$  mm, para comparação entre as espécies.

### **Manutenção dos animais no laboratório**

Após coleta, os ouriços foram colocados em caixas de isopor sem água, cobertos por algas do local para manter atmosfera úmida e transportados para o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO) da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, Paraná. No laboratório foram acomodados em aquário estoque com capacidade de 190 litros, abastecido com água do mar (natural) de salinidade 35‰, a uma temperatura de 20-24°C e filtro biológico, aeração constante, pH de 7,5-8,0, mantidos com fotoperíodo natural e tempo de aclimatação de sete dias. Os ouriços foram alimentados diariamente com alga *Ulva* sp. *ad libitum*.

### **Experimentos de redução e aumento da salinidade da água do mar**

Foram montados aquários de 1,5 litros com água do mar em diferentes salinidades. A redução de salinidade da água do mar (diluição da água do mar) foi feita por adição de água doce de torneira (filtrada duplamente em filtros de carvão ativado e celulose). O aumento da salinidade (concentração da água do mar) foi feito por adição de sal marinho comercial na água do mar 35‰. As salinidades foram medidas com salinômetro (Shibuya S28). Para cada experimento foram montados 10 aquários (n=10). As salinidades do experimento de diluição da água do mar foram: 35 (controle), 33, 30, 27, 24, 21, 18 e 15‰. As salinidades do experimento de concentração da água do mar foram 35 (controle), 37, 39, 41, 43 e 45‰. Foi colocado um indivíduo por aquário, e cada ouriço permaneceu por uma hora em cada salinidade. Após uma hora, amostras de fluido celômico perivisceral (FC) dos animais e da água do aquário (~500 µl) eram coletadas. O

FC foi amostrado por punção da membrana peristomial, usando seringa de insulina. Após a coleta do FC e da amostra de água do aquário em que o ouriço estava, a água do aquário era substituída de acordo com a seqüência do experimento. Foram utilizados animais diferentes para cada condição experimental (redução/aumento da salinidade) e as amostras foram congeladas (-20° C) até o momento das dosagens. Para verificar a interferência da manipulação dos animais sobre a concentração iônica do fluido celômico, foram retiradas amostras de fluido (de maneira idêntica às experimentais) de ouriços mantidos por oito horas em água 35‰.

### **Tempo de endireitamento ("righting time response")**

Para avaliar o efeito da salinidade sobre o bem estar dos ouriços durante os experimentos, foi realizado o teste chamado "*Righting Time Response*". Este teste avalia o tempo gasto pelo animal para retornar com a face oral para o substrato, após ter sido manualmente invertido, colocado sobre o substrato com sua face aboral voltada para baixo. O teste era realizado depois de decorridos 30 minutos da presença do animal na água experimental. Foi contado o tempo gasto pelo ouriço do mar para retornar com a boca para o substrato. Foram observadas neste momento também a posição e a movimentação dos espinhos e dos pés ambulacrais para todos os indivíduos em todos os experimentos.

### **Avaliação da composição iônica do fluido intestinal**

Para avaliar se há diferença na concentração osmótica e iônica entre os fluidos corporais, ouriços (n= 6 para cada espécie) das três espécies foram coletados e processados como descrito acima. Foi comparada a composição do fluido celômico e do fluido intestinal em animais controle (salinidade 35‰). Após o tempo de aclimação os animais foram crioanestesiados (aproximadamente 20 minutos em freezer -20° C) para a retirada de 500 µl de FC. Posteriormente o animal foi serrado e aberto para a retirada do

fluido do intestino (~100 µl), por punção do líquido do intestino na porção anterior ao reto usando seringa de insulina. As amostras retiradas foram congeladas (-20° C) até o momento das dosagens.

### **Dosagens de osmolalidade e íons nas amostras de fluido celômico e da água do mar dos aquários**

A dosagem da osmolalidade das amostras foi realizada em Micro-Osmômetro de Pressão de Vapor Wescor, modelo 5520, em amostras não diluídas. Para as dosagens das concentrações iônicas de cloreto e magnésio foram utilizados métodos colorimétricos usando-se Kits Labtest, com leitura de absorbância (respectivamente a 470 e 505 nm), no espectrofotômetro Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia Biotech, em amostras diluídas 1:10 e 1:50 vezes com água deionizada. Para a determinação da concentração dos íons sódio e potássio foi utilizado fotômetro de chama B462 Micronal em amostras diluídas 1:400 vezes em água deionizada. Foram dosadas a osmolalidade para as amostras de FC dos ouriços que permaneceram em água controle 35‰ por oito horas para verificar se há efeito da manipulação.

### **Análise estatística**

Retas (Regressão linear) foram ajustadas e intervalos de confiança (95%) calculados, para os dados das concentrações osmótica e iônicas do FC das três espécies, em função das concentrações calculadas para a água. Retas independentes foram ajustadas para os experimentos de diluição e concentração da água do mar. O teste t de *Student* foi usado para comparar os valores medidos com os valores calculados para as águas das diferentes salinidades. Foi utilizado novamente teste t de *Student* para comparar os valores dosados nos fluido celômico e intestinal. ANOVA de uma via foi feita para comparar os valores da concentração osmótica do FC ao longo de oito horas. O nível de significância foi sempre de 0,05.

## RESULTADOS

### Distribuição dos animais na natureza

Nos costões rochosos das praias de Bombinhas – SC, foi observado que os ouriços da espécie *Echinometra lucunter* aparecem em maior quantidade em locais que podem ficar expostos ao ar e diminui a quantidade com a profundidade e *Arbacia lixula* ocorre homogeneamente ao longo do costão em regiões que não ficam expostas ao ar. A espécie *Lytechinus variegatus* é encontrada apenas na região de sublitoral.

### **Resposta de tempo de endireitamento ("righting time response")**

O comportamento de virar diante dos extremos de salinidade tanto em meio diluído quanto em meio concentrado foi semelhante em *Lytechinus variegatus* e *Arbacia lixula*. A diminuição ou até mesmo perda do movimento dos pés ambulacrais foi a reação mais evidente. Houve morte de *L. variegatus* em água com salinidade de 15‰ (n=10 de 20 espécimes) e 41‰ (n=2 de 20 espécimes). Com *A. lixula* não houve morte apenas perda de movimentos dos espinhos e pés ambulacrais. Nas demais condições houve 55 retornos com a boca para o substrato por *L. variegatus*, e 44 retornos por *A. lixula*. Na espécie *Echinometra lucunter* nenhum espécime retornou com a boca para o substrato após os 30 minutos com a boca voltada para cima (Tabela 1).

### **Retirada de fluido de animais em salinidade controle (35‰)**

Nos animais controles não houve diferença na concentração osmótica do fluido celômico após a manipulação. *Lytechinus variegatus*,  $p= 0.801$ ; *Echinometra lucunter*,  $p= 0.801$  e *Arbacia lixula*,  $p= 0.585$ .

### **Diluição e concentração da água do mar**

Nos gráficos os valores das concentrações dos fluidos celômicos (média  $\pm$  erro padrão da média) foram comparados com os valores de águas calculadas, segundo Prosser 1973 (Tabela 2).

Tabela 1. Respostas comportamentais dos ouriços *Lytechinus variegatus* (Lv), *Echinometra lucunter* (El), e *Arbacia lixula* (Al) aos experimentos de diluição e concentração da água do mar. Os resultados estão indicados em escala subjetiva, variando de ausência do comportamento ou resposta (-) a intensidade máxima, sua mobilidade normal em água do mar 34‰ (++) . Na linha do endireitamento, o número indica o número de animais que se endireitou em até 30 minutos. Quando não há indicação de número, todos os animais mostraram o mesmo comportamento e \* indica que todos os indivíduos morreram.

	Respostas Comportamentais													
	Diluição da água do mar							Concentração da água do mar						
	Salinidade (‰)							Salinidade (‰)						
	15	18	21	24	27	30	33	35	35	37	39	41	43	45
<b><i>Lytechinus variegatus</i></b>														
Espinhas	*	-	+	++	++	++	++	++		++	++	++	++	++
Pés Ambulacrais	*	-	±	++	++	++	++	++		++	++	++	++	++
Resposta a Estímulos	*	-	+	++	++	++	++	++		++	++	++	++	++
Endireitamento	*	-	4	-	2	++	++	++		++	++	7	2	-
<b><i>Echinometra lucunter</i></b>														
Espinhas	-	-	++	++	++	++	++	++		++	++	++	++	+
Pés Ambulacrais	-	-	+	++	++	++	++	++		++	++	+	+	-
Resposta a Estímulos	-	±	++	++	++	++	++	++		++	++	++	++	+
Endireitamento	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-
<b><i>Arbacia lixula</i></b>														
Espinhas	-	+	++	++	++	++	++	++		++	++	++	++	++
Pés Ambulacrais	-	+	++	++	++	++	++	++		++	++	++	++	++
Resposta a Estímulos	-	+	++	++	++	++	++	++		++	++	++	++	++
Endireitamento	-	-	-	-	3	6	3	-		++	++	6	6	-

Tabela 2. Osmolalidade e concentrações dos íons, valores calculados e os valores medidos (média, n= 10 para cada salinidade) nas águas dos aquários experimentais, nos experimentos de diluição e concentração da água do mar. \* = diferença significativa entre os valores calculados (Prosser, 1973) e medidos das águas.

	Diluição da água do mar								Concentração da água do mar				
	Salinidade (‰)								Salinidade (‰)				
	15	18	21	24	27	30	33	35	37	39	41	43	45
<b>Osmolalidade</b>													
Calculado	450	540	630	720	810	900	990	1050	1110	1170	1230	1290	1350
Medido <i>L. variegatus</i>	426	520	606*	688*	707*	862	917	1011	1030*	1014	1076	1242	1268
Medido <i>E. lucunter</i>	443	524*	621	711	780*	866*	970	1004	1064*	1097*	1164*	1257	1328
Medido <i>A. lixula</i>	427	510*	598*	669	765*	846*	927	1013	977*	1108	1111	1148	1260
<b>Cloreto</b>													
Calculado	239	287	335	383	431	479	527	559	591	623	654	686	718
Medido <i>L. variegatus</i>	225	231*	319	341	343*	458	498	503	499*	484*	503*	675	682
Medido <i>E. lucunter</i>	191*	253	330	377	420	477	540	538	580	621	664	742*	795*
Medido <i>A. lixula</i>	242	302	352	359	366*	385*	488	577*	517	548	615	653	673
<b>Sódio</b>													
Calculado	205	246	288	329	370	411	452	479	507	534	561	589	616
Medido <i>L. variegatus</i>	236*	272*	307*	342*	363	409	442	480	454*	483	487*	554*	567*
Medido <i>E. lucunter</i>	246*	266	313*	358*	362	418	450	521	472	490	517	537	569
Medido <i>A. lixula</i>	238*	276*	306*	344	380*	411	449	454	465	494*	521	525	573*
<b>Potássio</b>													
Calculado	4.4	5.2	6.1	7.0	7.9	8.7	9.6	10.2	10.8	11.4	11.9	12.5	13.1
Medido <i>L. variegatus</i>	4.5	5.3	6.2	7.1	7.3*	9.3	10.1	11	13.4*	11.4	12.3	13.7*	14.1
Medido <i>E. lucunter</i>	5.0	5.9	6.3	7.9	8.3	8.8	10.3	13.9	11.8	11.4	12.8	13.9	14.8*
Medido <i>A. lixula</i>	4.5	5.5	6.1	6.9	7.4*	8.8	10	12.5	10.9	12.2*	13.3*	13.6	14.8
<b>Magnésio</b>													
Calculado	24	28	33	38	42	47	52	55	58	61	64	67	71
Medido <i>L. variegatus</i>	21	27	29	31*	36*	44	43*	56	66	57	62	65	66
Medido <i>E. lucunter</i>	23	26	29*	37	43	44	46	58	53	54	57	58*	64
Medido <i>A. lixula</i>	23	27	32	33*	38	41*	46	50	49	54	66	67	76

## Osmolalidade

*Lytechinus variegatus* mostrou-se hiperosmótico com manutenção de gradiente de 273 mOsm/kgH<sub>2</sub>O em água 450 mOsm/kgH<sub>2</sub>O (15‰). Em diluição sempre manteve seu FC mais concentrado que o meio a partir da salinidade 900 mOsm/kgH<sub>2</sub>O (30‰) ( $b_1 = 0,532$ ). Quando em meio concentrado manteve-se hiposmótico sempre e em todas as salinidades ( $b_1 = 0,604$ ) (Fig. 1A). *Echinometra lucunter* apresentou resultados semelhantes a *Lytechinus variegatus* mantendo-se hiperosmótico em meio diluído com gradiente de 214 mOsm/kgH<sub>2</sub>O em água do mar 450 mOsm/kgH<sub>2</sub>O (15‰), e mostrou-se sempre hiposmótico em meio concentrado a partir da água 1110 mOsm/kgH<sub>2</sub>O (37‰) (Fig. 1B). *Arbacia lixula* apresentou-se próximo de isosmótico ( $b_1 = 0,771$ ) ao meio mantendo baixos gradientes (122, 102 e 140 mOsm/kgH<sub>2</sub>O) entre o FC e as águas com 630 mOsm/kgH<sub>2</sub>O (21‰), 540 mOsm/kgH<sub>2</sub>O (18‰) e 450 mOsm/kgH<sub>2</sub>O (15‰), respectivamente. Em meio concentrado *Arbacia lixula* mostrou-se sempre isosmótica ( $b_1 = 0,879$ ) a água do mar (Fig.1C).

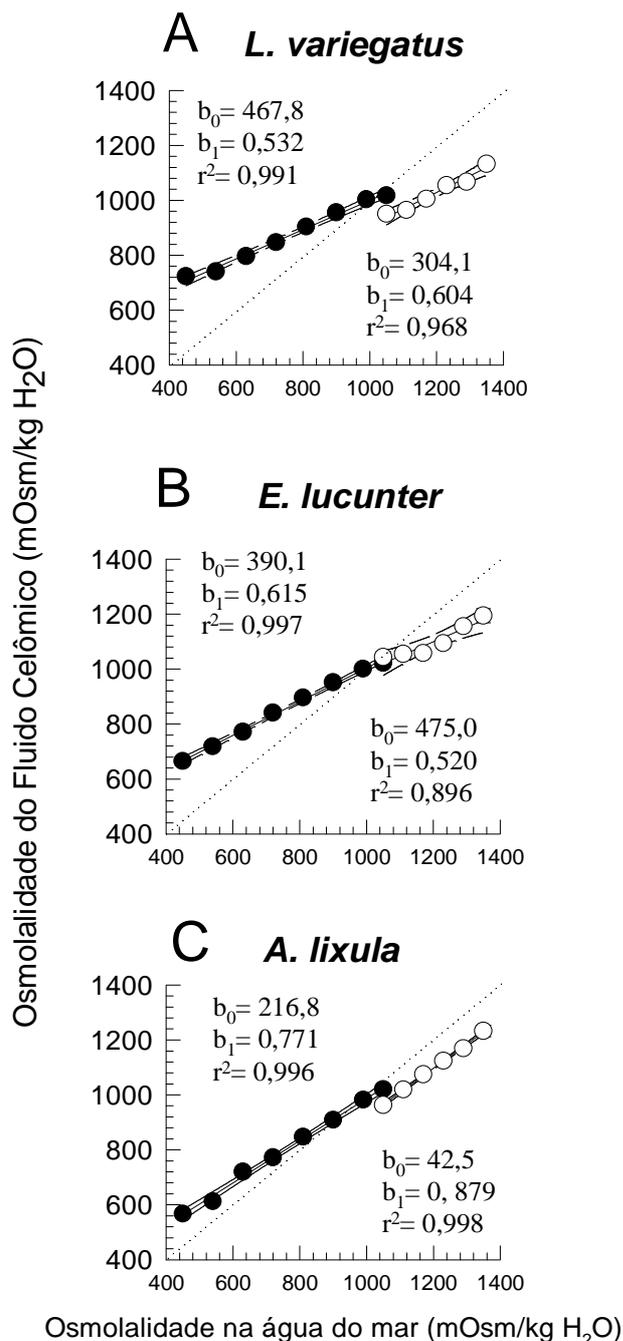


Figura 1: Osmolalidade do fluido celômico (mOsm/kgH<sub>2</sub>O) dos ouriços *Lytechinus variegatus* (A), *Echinometra lucunter* (B), e *Arbacia lixula* (C) em função da osmolalidade da água. A linha isosmótica está indicada pela reta pontilhada. Foram ajustadas retas de regressão (com intervalo de confiança de 95%, linhas tracejadas) aos dados do experimento de diluição da água do mar (de 35 até 15‰, círculos pretos) e experimento de concentração da água do mar (de 35 até 45‰, círculos brancos). N=10 para cada experimento, exceto para *E. lucunter*. 6≤N≤8. Os coeficientes linear ( $b_0$ ) e angular ( $b_1$ ), e de ajuste da regressão linear ( $r^2$ ) estão indicados junto às retas. Os valores para as águas (eixo horizontal) foram calculados a partir da salinidade medida (1‰ ~30 mOsm/kgH<sub>2</sub>O).

## Cloreto

Em *L. variegatus* a concentração de  $\text{Cl}^-$  foi maior no FC= 583 mM do que na água (559 mM) na salinidade controle (35‰). Na salinidade 15‰ apresentou a concentração de  $\text{Cl}^-$  no CF= 358 mM sendo a água do mar= 239 mM, o gradiente mantido foi de 119 mM. No experimento de concentração da água do mar apresentou-se hipo-iônico em todas as salinidades. Na salinidade 45‰ mostrou gradiente de -86 mM (FC=632 mM – AM= 718 mM) ( $b_1= 1,138$ ) (Fig. 2A). *E. lucunter* diante de diluição da água do mar mostrou conformação com a água ( $b_1= 0,876$ ). No experimento de concentração da água do mar (45‰) *E. lucunter* apresentou-se hipo-iônico com gradiente de -41 mM entre o CF e a água do mar (Fig. 2B). *A. lixula* na redução de salinidade mostrou-se iso-iônico com os valores de  $\text{Cl}^-$  próximos dos valores na água do mar ( $b_1= 0,990$ ). Na salinidade 15‰ a concentração de  $\text{Cl}^-$  no CF= 209 mM e na AM= 239 mM mantendo-se hipo-iônico com pequeno gradiente de -33 mM. No experimento de concentração *A. lixula* (água 45‰) manteve-se hipo-iônico com gradiente mantido entre o FC e a água do mar de -66 mM ( $b_1= 1,07$ ) (Fig. 2C).

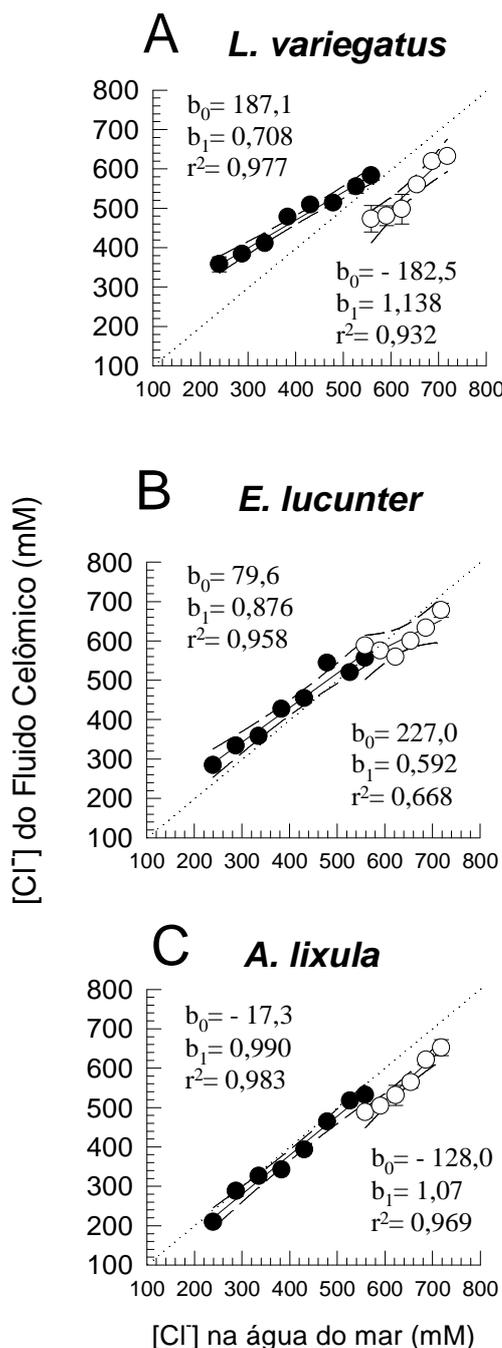


Figura 2: Concentração de cloreto do fluido celômico (mM) dos ouriços *Lytechinus variegatus* (A), *Echinometra lucunter* (B), e *Arbacia lixula* (C) em função da concentração de cloreto da água do mar. A linha isoiônica está indicada pela reta pontilhada. Foram ajustadas retas de regressão (com intervalo de confiança de 95%, linhas tracejadas) aos dados do experimento de diluição da água do mar (de 35 até 15‰, círculos pretos) e experimento de concentração da água do mar (de 35 até 45‰, círculos brancos).  $N=10$  para cada experimento, exceto para *E. lucunter*.  $6 \leq N \leq 8$ . Os coeficientes linear ( $b_0$ ) e angular ( $b_1$ ), e de ajuste da regressão linear ( $r^2$ ) estão indicados junto às retas. Os valores para as águas (eixo horizontal) foram calculados segundo Prosser, 1973.

## Sódio

*Lytechinus variegatus* começou a apresentar gradientes ( $b_1 = 0,492$ ) de  $\text{Na}^+$  na salinidade 33‰ com o CF= 466 mM e a AM= 451 mM e manteve gradientes até a salinidade 15‰ com o CF= 347 mM e AM= 205, ou seja, gradiente de 142 mM. As concentrações de  $\text{Na}^+$  no FC de *L. variegatus* quando submetidos à concentração gradual da água do mar foram sempre menores e mostrando gradiente de -94 mM em salinidade 45‰ ( $b_1 = 0,449$ ) (Fig. 3A). *Echinometra lucunter* apresentou comportamento semelhante a *L. variegatus*, mostrando-se hiper-iônico ( $b_1 = 0,452$ ) para o íon sódio a partir da salinidade 30‰. Na salinidade 15‰ apresentou a concentração do FC= 513 mM e água do mar= 479 mM com gradiente de 34 mM. No aumento da salinidade esta espécie mostrou-se hipo-iônica a partir da salinidade 37‰ com gradiente de -38 mM e terminando com gradiente de -81 mM na salinidade 45‰ (Fig. 3B.). *Arbacia lixula* mostrou gradiente para o sódio ( $b_1 = 0,587$ ). O gradiente de sódio entre o FC e a água do mar 15‰ foi de 80 mM. Em água do mar concentrada (45‰) também apresentou gradiente ( $b_1 = 0,686$ ) (-73 mM, CF= 543 mM e água do mar= 616 mM) (Fig. 3C).

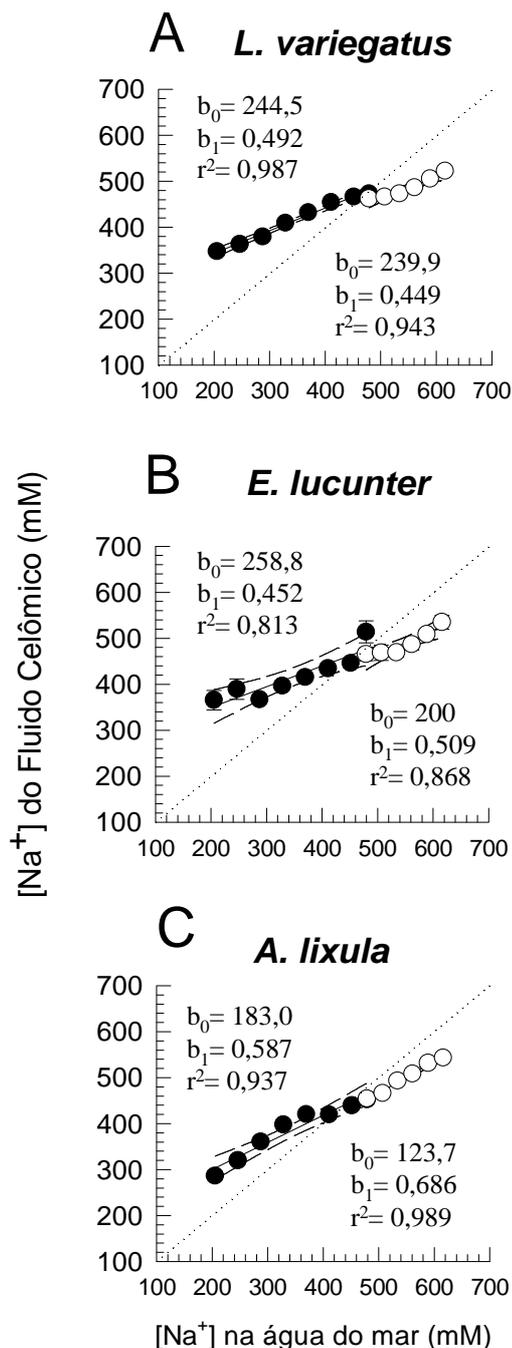


Figura 3: Concentração de sódio do fluido celômico (mM) dos ouriços *Lytechinus variegatus* (A), *Echinometra lucunter* (B), e *Arbacia lixula* (C) em função da concentração de sódio da água do mar. A linha isoiônica está indicada pela reta pontilhada. Foram ajustadas retas de regressão (com intervalo de confiança de 95%, linhas tracejadas) aos dados do experimento de diluição da água do mar (de 35 até 15‰, círculos pretos) e experimento de concentração da água do mar (de 35 até 45‰, círculos brancos).  $N=10$  para cada experimento, exceto para *E. lucunter*:  $6 \leq N \leq 8$ . Os coeficientes linear ( $b_0$ ) e angular ( $b_1$ ), e de ajuste da regressão linear ( $r^2$ ) estão indicados junto às retas. Os valores para as águas (eixo horizontal) foram calculados segundo Prosser, 1973.

## Potássio

*Lytechinus variegatus* em meio diluído manteve-se sempre hiper-iônico para o íon  $K^+$ . Em água 33‰ de salinidade apresentou gradiente de 1.4 mM e manteve gradientes até a salinidade 15‰ com a concentração do FC= 11 mM e a AM= 9.91 mM, gradiente de 3.63 mM. Quando em água do mar concentrada essa espécie mostrou-se iso-iônica com baixos valores para os gradientes mantidos entre o FC e a água do mar ( $b_1= 0,883$ ) (Fig. 4A). *Echinometra lucunter* quando submetido ao protocolo de diluição da água do mar mostrou o FC sempre hiper-iônico. Na condição controle (35‰) apresentou gradiente de 1.3 mM, em AM 30‰ gradiente de 2.46 mM e mostrando maior gradiente (3.03 mM) na salinidade 15‰. Quando exposto ao meio concentrado os valores para o FC apresentaram-se sempre acima dos valores da água do mar. *Arbacia lixula* apresentou valores baixos nos gradientes entre o CF e AM para o  $K^+$  em todas as condições experimentais e sempre iso-iônico ( $b_1= 0,90$ ). Na salinidade 35‰ a concentração de  $K^+$  no FC foi menor que na AM com gradiente de -1.5 mM, em 24‰ = 2.1 mM e 18‰ e 15‰ gradiente de 0.5 mM (Fig. 4B). Quando em meio concentrado *A. lixula* mostrou-se hiper-iônico em todas as salinidades, também com baixos valores dos gradientes ( $b_1= 0,989$ ). Na salinidade 35‰ os valores no FC= 11 mM e água do mar= 10.2 mM com gradiente de 0.8 mM, na salinidade 45‰ no FC= 14.4 mM e água do mar= 13.1 mM e gradiente de 1.3 mM (Fig. 4C).

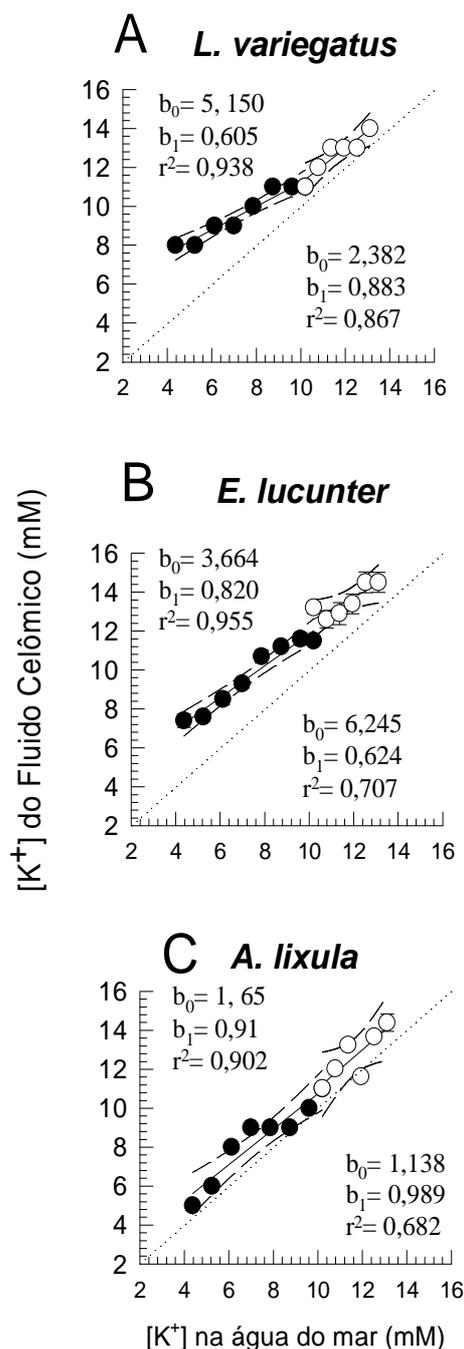


Figura 4: Concentração de potássio do fluido celômico (mM) dos ouriços *Lytechinus variegatus* (A), *Echinometra lucunter* (B), e *Arbacia lixula* (C) em função da concentração de potássio da água do mar. A linha isoiônica está indicada pela reta pontilhada. Foram ajustadas retas de regressão (com intervalo de confiança de 95%, linhas tracejadas) aos dados do experimento de diluição da água do mar (de 35 até 15‰, círculos pretos) e experimento de concentração da água do mar (de 35 até 45‰, círculos brancos).  $N=10$  para cada experimento, exceto para *E. lucunter*:  $6 \leq N \leq 8$ . Os coeficientes linear ( $b_0$ ) e angular ( $b_1$ ), e de ajuste da regressão linear ( $r^2$ ) estão indicados junto às retas. Os valores para as águas (eixo horizontal) foram calculados segundo Prosser, 1973.

## Magnésio

Em *Lytechinus variegatus* a concentração do íon  $Mg^{2+}$  no FC permaneceu alta mesmo com a diluição da água do mar ( $b_1 = 0,289$ ). Enquanto estava na água controle com 54.84 mM de  $Mg^{2+}$  (35‰) apresentou a concentração de  $Mg^{2+}$  no FC= 53 mM, porém na salinidade 30‰ FC= 54 mM e na AM= 47.01 mM mantendo gradiente= 7 mM e na salinidade 15‰ FC= 43 mM e na AM= 23.5 mM com gradiente= 19.5 mM. Quando exposto à água do mar concentrada *L. variegatus* mostrou-se hipo-iônico para todas as salinidades. Na salinidade 35‰ o valor no FC= 42 mM e na AM= 54.84 mM mantendo gradiente de -12.84 mM, na salinidade 45‰ o FC= 54 mM e na AM 70.52 mM mantendo gradiente de -16.52 mM (Fig.5A). *Echinometra lucunter*, no experimento de diluição, apresentou conformação do FC com a água do mar até a salinidade 24‰. Na salinidade 21‰ o gradiente mantido foi de 5 mM. Ocorreu manutenção nas concentrações de  $Mg^{2+}$  no FC nas salinidades 18‰ e 15‰ com valores de 37.52 mM e 37.84 mM, respectivamente ( $b_1 = 0,386$ ). Nos experimentos de concentração da água do mar *E. lucunter* apresentou-se hipo-iônica em todas as salinidades mostrando o maior gradiente (14.22 mM) entre o FC e a água do mar na salinidade 45‰ (Fig. 5B). O magnésio foi o íon que apresentou os menores valores de  $b_1$  nos experimentos de diluição. *Arbacia lixula* mostrou-se iso-iônica ( $b_1 = 0,69$ ) em todas as condições experimentais (Fig. 5C).

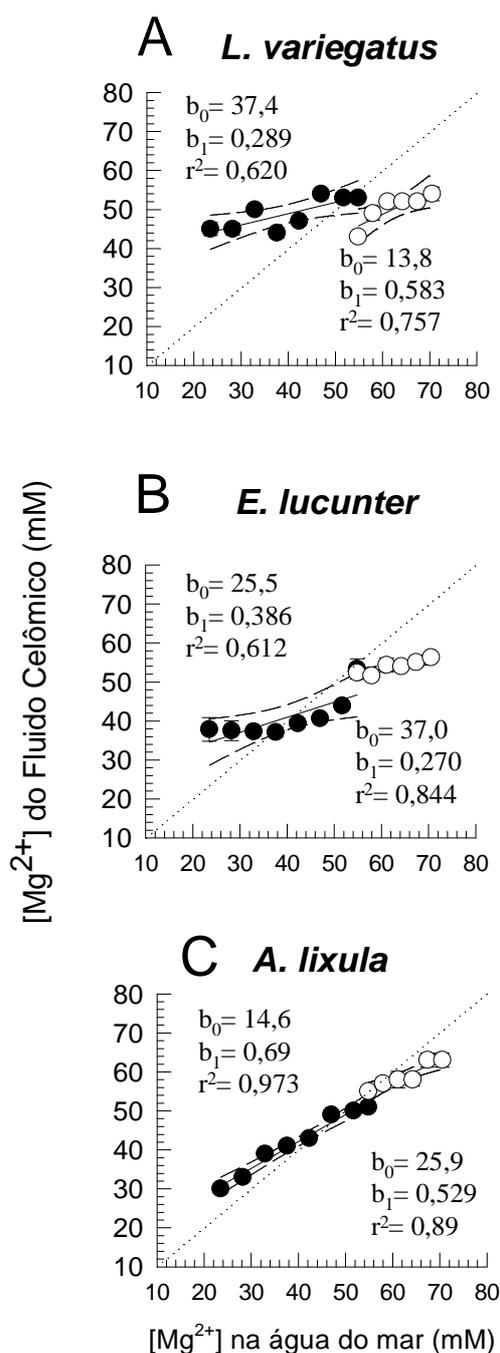


Figura 5: Concentração de magnésio do fluido celômico (mM) dos ouriços *Lytechinus variegatus* (A), *Echinometra lucunter* (B), e *Arbacia lixula* (C) em função da concentração de magnésio da água do mar. A linha isoiônica está indicada pela reta pontilhada. Foram ajustadas retas de regressão (com intervalo de confiança de 95%, linhas tracejadas) aos dados do experimento de diluição da água do mar (de 35 até 15‰, círculos pretos) e experimento de concentração da água do mar (de 35 até 45‰, círculos brancos).  $N=10$  para cada experimento, exceto para *E. lucunter*:  $6 \leq N \leq 8$ . Os coeficientes linear ( $b_0$ ) e angular ( $b_1$ ), e de ajuste da regressão linear ( $r^2$ ) estão indicados junto às retas. Os valores para as águas (eixo horizontal) foram calculados segundo Prosser, 1973.

### Comparação nas concentrações osmótica e iônica dos fluidos extracelulares: fluido celômico e fluido do intestino

Não houve diferença nas concentrações osmótica entre o fluido celômico e fluido do intestino nas três espécies (Fig. 6). Não houve diferença nas concentrações dos íons cloreto, sódio e magnésio entre o fluido celômico e o fluido do intestino nas espécies (Figs. 7, 8 e 10). Houve diferença nas concentrações de potássio entre o fluido celômico e fluido do intestino nas espécies *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* ( $p= 0.002$  e  $p< 0.001$ , respectivamente) (Fig. 9).

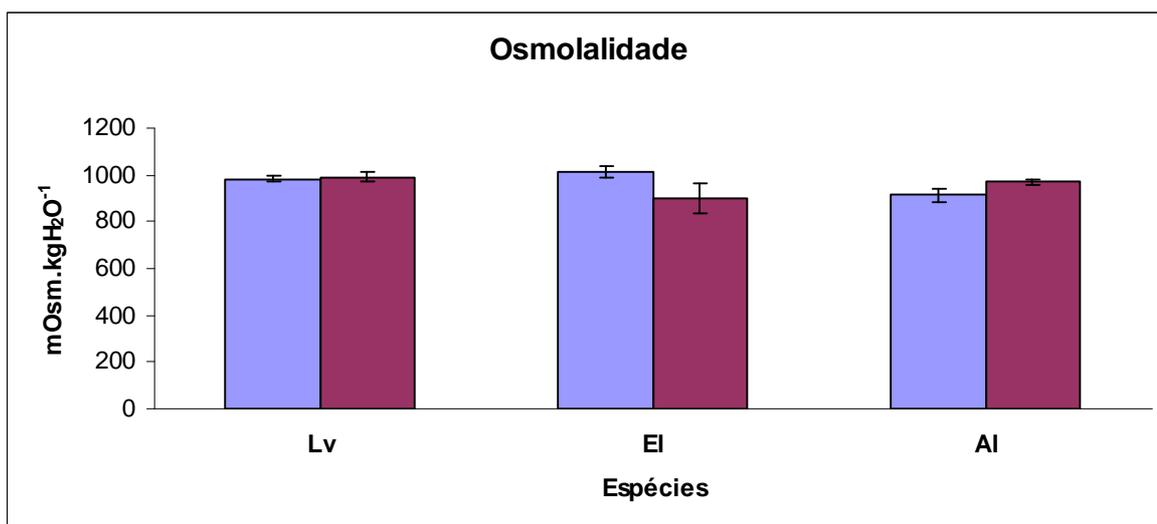


Figura 6: Osmolalidade do fluido celômico (mOsm/kgH<sub>2</sub>O) (barra azul) e do fluido do intestino (mOsm/kgH<sub>2</sub>O) (média  $\pm$  erro padrão da média)(barra roxa) dos ouriços *Lytechinus variegatus* (Lv), *Echinometra lucunter* (EI) e *Arbacia lixula* (AI). N= 6 para cada espécie.  $p< 0.05$ .

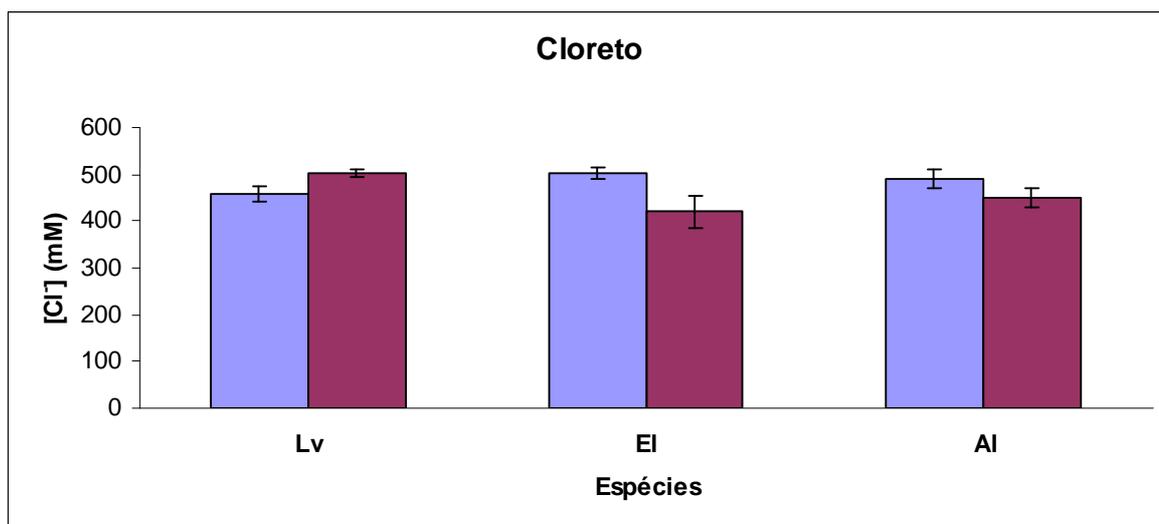


Figura 7: Concentração de cloreto do fluido celômico (mM) (barra azul) e do fluido do intestino (mM) (média  $\pm$  erro padrão da média) (barra roxa) dos ouriços *Lytechinus variegatus* (Lv), *Echinometra lucunter* (EI) e *Arbacia lixula* (AI). N= 6 para cada espécie.  $p < 0.05$ .

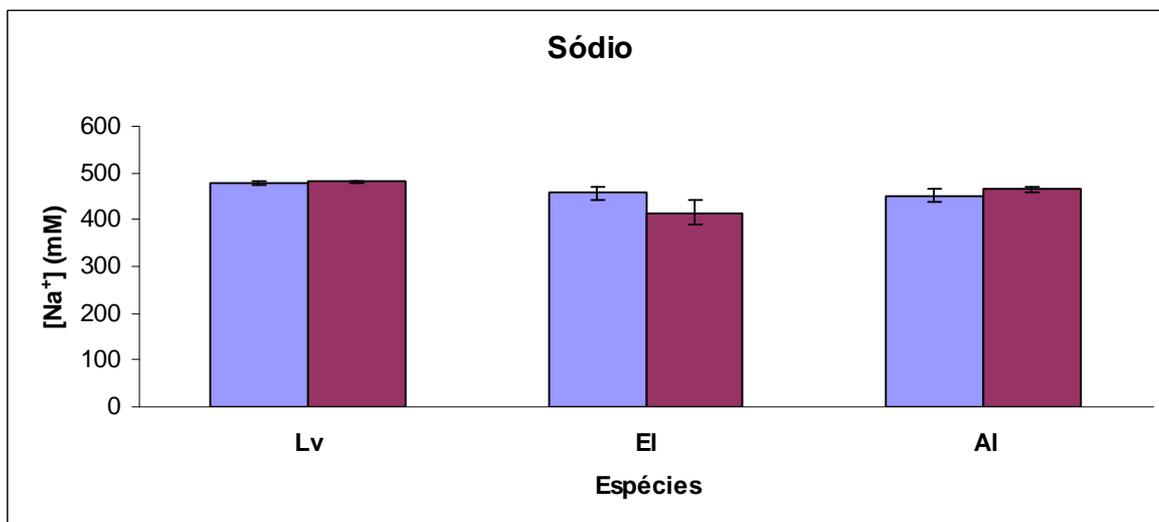


Figura 8: Concentração de sódio do fluido celômico (mM) (barra azul) e do fluido do intestino (mM) (média  $\pm$  erro padrão da média) (barra roxa) dos ouriços *Lytechinus variegatus* (Lv), *Echinometra lucunter* (EI) e *Arbacia lixula* (AI). N= 6 para cada espécie.  $p < 0.05$ .

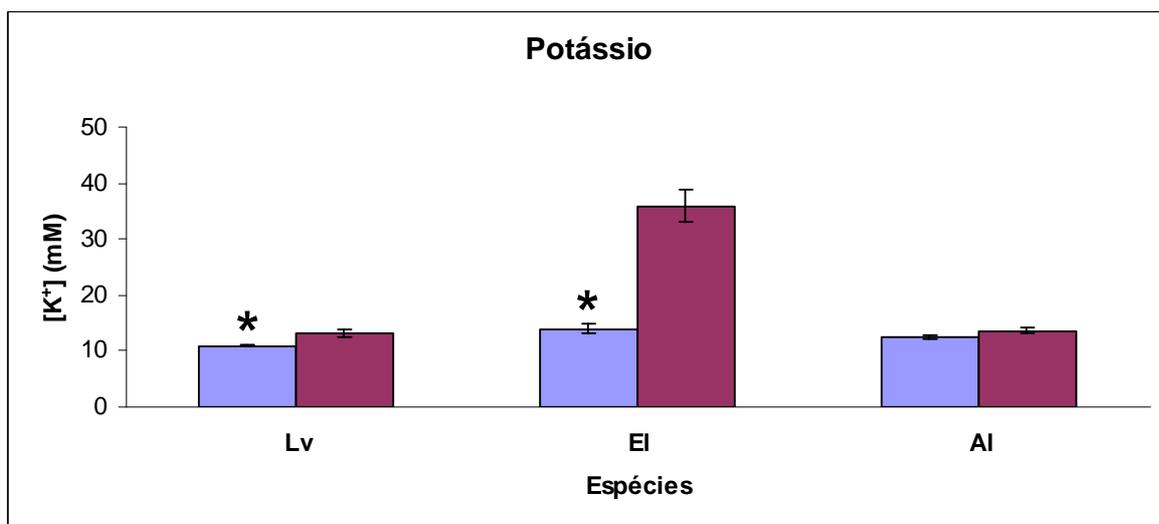


Figura 9: Concentração de potássio do fluido celômico (mM) (barra azul) e do fluido do intestino (mM) (média  $\pm$  erro padrão da média) (barra roxa) dos ouriços *Lytechinus variegatus* (Lv), *Echinometra lucunter* (EI) e *Arbacia lixula* (AI). N= 6 para cada espécie. \*= diferença na concentração de potássio entre o fluido celômico e o fluido do intestino.  $p < 0.05$ .

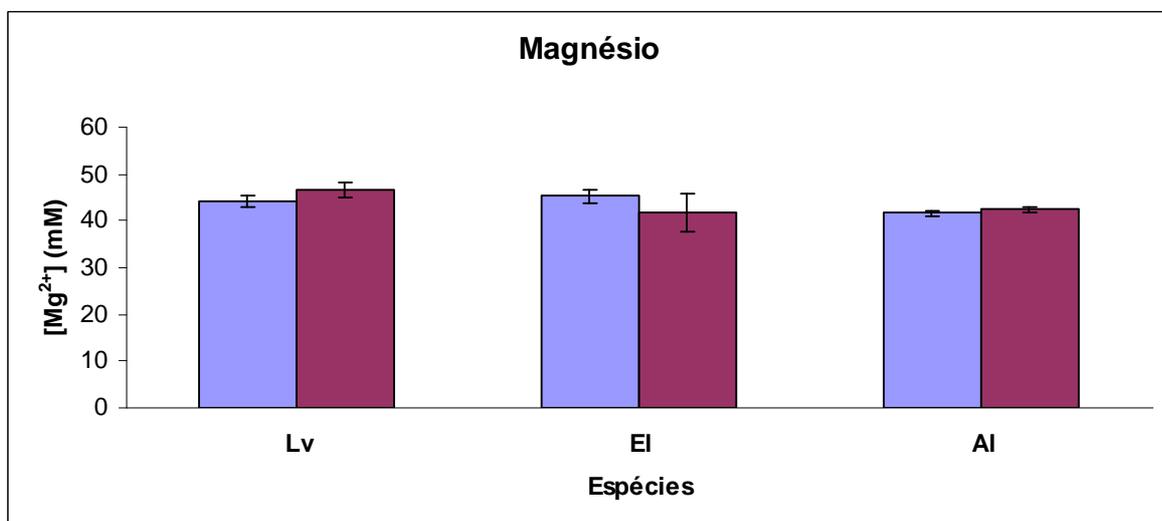


Figura 10: Concentração de magnésio do fluido celômico (mM) (barra azul) e do fluido do intestino (mM) (média  $\pm$  erro padrão da média) (barra roxa) dos ouriços *Lytechinus variegatus* (Lv), *Echinometra lucunter* (EI) e *Arbacia lixula* (AI). N= 6 para cada espécie.  $p < 0.05$ .

## DISCUSSÃO

Alguma capacidade de manter gradientes entre o fluido celômico (FC) e a água do mar (AM) foi apresentada por *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter*, com gradientes mais significativos mantidos por *L. variegatus*. Este resultado está de acordo com a distribuição vertical no costão. *Arbacia lixula* em situações de desafio salino não apresentou nenhum indício de manutenção de gradientes iônicos ou osmótico.

### Resposta de Endireitamento e Distribuição

Os tipos de comportamentos habitualmente utilizados para verificar os níveis de estresse e bem estar de equinodermos são os de escavação para aqueles de areia e tempo de endireitamento para os bentônicos de substrato duro (Stickle e Diehl 1987). Este é o tempo que o animal gasta para voltar com a superfície oral para o substrato, tendo sido manualmente invertido. Diante de estresse osmótico, pode ocorrer perda de coordenação neuro-muscular, com diminuição dos movimentos dos pés e espinhos. Uma vez que essas estruturas são usadas na busca de alimentos, fixação ao substrato e busca por refúgio, os animais podem ser prejudicados, enquanto perdurarem estes sintomas (Lawrence 1975). Quando em meio desfavorável (diluído/concentrado), o ato de recolher os pés ambulacrais pode diminuir a superfície de contato com a água e por conseqüência reduzir a perda de sal/água, ajudando assim a reduzir a permeabilidade para fluxos difusos. Este comportamento foi observado em laboratório, com o pepino do mar *Holothuria grisea* (observação pessoal). Desta forma o animal fica solto no aquário, dando a impressão de perda da coordenação. Este padrão de atividade, isto é, a perda de coordenação, já foi verificada em *L. variegatus* expostos a salinidade de 40‰ (Lawrence 1975). *Lytechinus variegatus* possui ventosas bem desenvolvidas nos pés

ambulacrais da região aboral (Hill e Lawrence 2003), o que pode explicar seu sucesso para virar com a boca para o substrato, observado neste trabalho. *Lytechinus variegatus* ocupa substratos arenosos e apenas na região de sublitoral. Nesses locais utilizam conchas, cascalhos e algas marinhas para se cobrir com ajuda dos pés ambulacrais (Junqueira et al. 1997; Sánchez-Jérez et al. 2001; Sharp e Gray 1962). Esse comportamento tem relação com proteção contra iluminação forte ou para se camuflar. A luminosidade também é fator que interfere na distribuição dessa espécie (Sharp e Gray 1962; Hill e Lawrence 2003; Gondim et al. 2008). Esse comportamento pode ter permitido que essa espécie virasse rapidamente quando aplicado o teste de endireitamento.

*Arbacia lixula* apresentou comportamento de virar semelhante à *L. variegatus*. *Arbacia lixula* encontra-se presente em substrato consolidado, porém não habitando locas; habita regiões com moderado batimento das ondas e possui força nos pés ambulacrais (Bulleri et al 1999; Sánchez-Jérez et al. 2001; Hill e Lawrence 2003; Santos e Flammang 2005). Estes fatos explicam sua rápida resposta de virar (Tabela 1). O teste de endireitamento é uma ferramenta que possibilitou mostrar que o protocolo de variação gradual de salinidade foi apropriado para testar a capacidade de suportar a diluição e a concentração da água do mar. As espécies *A. lixula* e *L. variegatus* perderam sua capacidade de virar em água diluída em 15‰ e 15 e 18‰, respectivamente. Por outro lado, *Echinometra lucunter* apresenta hábito de viver preso em locas, independente da inclinação (McPherson 1969; Lewis e Storey 1984; Sánchez-Jérez 2001; Gondim et al. 2008), isso pode explicar o fato dessa espécie não virar com a boca de volta para o substrato no teste, mesmo em salinidade controle, água do mar normal.

A maior relação superfície/volume de animais menores pode acelerar a dissipação de gradientes (Vidolin et al. 2007; Stickle e Ahokas 1974; Stikle e Denoux 1976). Esta relação pode explicar o que foi verificado em *A. lixula*. Esta é a espécie de menor porte, e a que não apresentou manutenção de gradientes.

Os equinodermos são mais sensíveis à concentração da água do mar do que à sua diluição (Santos-Gouvea e Freire 2007). A morte de dois espécimes de *L. variegatus* a partir da salinidade 43‰ no experimento de concentração de água do mar pode significar variabilidade interespecífica, pois em média o tamanho dos ouriços da espécie *E. lucunter* é semelhante ao de *L. variegatus*. A água do mar concentrada de 45‰ por 48h imposto para *E. lucunter* foi letal para todos os indivíduos (Freire, Santos e Vidolin, 2010 submetido). No presente trabalho a exposição dos ouriços desta espécie por uma hora à salinidade 45‰ não causou sua morte. Aparentemente não houve de fato variação das concentrações de íons no seu fluido celômico e não houve também morte celular, que teria por consequência o extravasamento de íons especialmente potássio para o líquido extracelular, o que aumentaria sua concentração.

### **Osmolalidade**

Na água do mar diluída *L. variegatus* e *E. lucunter* apresentaram a osmolalidade maior quando comparada com a água e quando comparado com *A. lixula*. Resultados semelhantes foram encontrados com *L. variegatus*, apresentando osmolalidade maior quando comparada a espécie *A. lixula* em água do mar 25 ‰ (Vidolin et al. 2007).

Na água do mar concentrada as três espécies mantiveram a concentração do fluido celômico menor que a concentração da água. Os maiores gradientes, no

entanto foram mostrados por *L. variegatus* seguido por *E. lucunter*. Diferente dos resultados encontrados anteriormente no laboratório onde *E. lucunter* não apresentou gradiente em salinidade 45‰ (Freire, Santos e Vidolin, 2010 submetido). O tempo maior (6h) de exposição no estudo anterior pode ter sido a causa das diferenças encontradas, pois neste trabalho o tempo de exposição foi de apenas uma hora.

Durante os experimentos, não houve gradiente na salinidade 35‰ e este foi aumentando conforme o aumento da diluição da água em *L. variegatus* e *E. lucunter*. Uma possível explicação para o fato da manutenção do gradiente pode estar relacionada ao aumento dos gradientes de alguns íons verificados, como o sódio e potássio, por exemplo, que acompanharam a osmolalidade em água diluída.

### **Cloreto**

*Lytechinus variegatus* mostrou-se hiper-iônico para o íon cloreto quando em água diluída. No entanto, *E. lucunter* e *A. lixula* apresentaram conformação total. Estes resultados estão de acordo com experimentos feitos com *A. lixula* (Vidolin et al. 2007) e *E. lucunter* (Freire, Santos, Vidolin, 2010 submetido) entre outras espécies de equinóides, que retrataram a falta de manutenção de gradientes para o cloreto (Stickle e Diehl 1987). Em água concentrada *L. variegatus* e *A. lixula* apresentaram-se hipo-iônicas, *E. lucunter* apresentou conformação.

### **Sódio**

*Lytechinus variegatus*, *E. lucunter* e *A. lixula* apresentaram gradientes entre o fluido celômico e a água do mar diluída, sendo todos hiper-iônicos. Resultados semelhantes sobre a manutenção dos gradientes do íon sódio foram obtidos em *L. variegatus* mantidos por seis horas em salinidade 25‰ (Vidolin et al. 2007).

Entretanto *E. lucunter* apresentou conformação total quando expostos por seis horas a água do mar 25‰ (Freire, Santos, Vidolin, 2010 submetido). O delineamento experimental com a diluição progressiva e gradual da água do mar parece ser fundamental para a manutenção de gradientes de sódio em *Echinometra lucunter*. Entretanto em água do mar concentrada as três espécies apresentaram-se hipoiônicas. *Lytechinus variegatus* e *E. lucunter* apresentaram os maiores gradientes, seguidos por *A. lixula*. Resultados diferentes foram observados para *E. lucunter* que após seis horas em água do mar 45‰ não apresentou gradiente para o íon sódio (Freire, Santos, Vidolin, 2010 submetido).

### **Potássio**

Em água do mar diluída as espécies *L. variegatus* e *E. lucunter* apresentaram a concentração de potássio maior do que a água, sendo hiper-iônicas. *Arbacia lixula* apresentou características conformadoras nos dois experimentos. Corroborando com Vidolin et al. (2007) constitutivamente *L. variegatus* mostrou-se hiper-iônico para potássio em água do mar 35‰. O mesmo padrão foi observado em água de mar concentrada. Interessante salientar que as espécies *L. variegatus* e *E. lucunter* durante todos os experimentos mantiveram-se hiper-iônicos, sendo que o segundo apresentou maior gradiente iônico.

De fato, *L. variegatus* pode ser encontrado próximo a estuários (Ernest e Blake 1981; Roller e Stickle 1993; Tavares 2004 comunicação pessoal) e os experimentos realizados aqui foram de exposição gradual a diluição/concentração da água do mar. Trabalhos com equinodermos mostraram maior concentração de potássio nos fluidos corporais do que na água do meio externo, sugerindo secreção

e acúmulo desse íon pelos epitélios (Binyon 1962; Robertson 1949; Prusch 1977; Vidolin et al. 2007).

Em algumas estrelas do mar o fluido do sistema ambulacral apresenta concentração de potássio maior do que na água do mar. A concentração de potássio no pé ambulacral da estrela *Asterias forbesi* é maior do que no fluido celômico e na água do mar. Há secreção ativa deste íon através da parede do tecido do pé, tornando o ambiente hiperosmótico, propiciando a absorção de água pelo tecido (Prusch 1977).

### **Magnésio**

No experimento de diluição *L. variegatus* e *E. lucunter* começaram a sustentar gradientes de magnésio a partir da salinidade 21‰. Vale ressaltar que *E. lucunter* apresentou-se hipo-iônico para o magnésio até a salinidade 24‰. Padrão muito diferente foi apresentado por *A. lixula*, que conformou totalmente nos dois experimentos. Em água do mar concentrada foi *E. lucunter* que apresentou o maior gradiente, seguido por *L. variegatus* hipo-iônico.

Experimentos com *L. variegatus* e *A. lixula* demonstraram que essas espécies não sustentam gradientes para magnésio (Vidolin et al. 2007). Resultado inverso foi verificado em *Strongylocentrotus droebachiensis*, que mostrou gradiente para este íon quando em água diluída (Stickle e Ahokas 1974). Esses resultados podem estar relacionados com a importância desse íon na fisiologia. A alta concentração de magnésio no fluido extracelular diminui o nível de atividade em alguns invertebrados como o caranguejo-aranha (Schmidt-Nielsen 2002). O magnésio age como agente anestésico que deprime a transmissão neuromuscular. De fato *L. variegatus* e *A. lixula* expostos em água suplementada com  $MgCl_2$  apresentaram ausência de

movimento dos pés ambulacrais e dos espinhos (Vidolin et al. 2007). No meio intracelular o magnésio é o segundo íon mais abundante auxiliando na síntese de proteínas. Um baixo nível de magnésio prejudica o transporte de  $K^+$ ,  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  (Saris et al. 2000; Hartwig 2001). Especificamente nos equinodermos o magnésio age no tecido conjuntivo mutável (Ruppert e Barnes 2005). Esse tecido muda a posição dos espinhos, colaborando, por exemplo, na fixação dos ouriços que vivem em locas e fendas. O animal ao se prender nessas locas fica protegido do batimento das ondas e possivelmente da ação dos predadores.

Dentre as três espécies, *L. variegatus* apresentou a maior capacidade de manutenção de gradiente para esse íon nos experimentos de diluição da água do mar. *Echinometra lucunter*, no entanto mostrou maior capacidade de manter gradiente no experimento de concentração da água do mar. *Arbacia lixula* manteve-se iso-iônico nas duas condições experimentais.

### **Comparação entre fluido celômico e fluido do intestino**

As espécies *L. variegatus*, *E. lucunter* e *A. lixula* não apresentaram diferenças nas concentrações iônicas entre o fluido celômico e o fluido do intestino. Entretanto as espécies *L. variegatus* e *E. lucunter* apresentaram maiores concentrações de potássio no fluido intestinal do que no fluido celômico. Em estudo anterior, *L. variegatus*, apresentou a concentração de sódio e potássio maior e a de cloreto menor no fluido celômico do que no intestino. O autor discute que a maior concentração do potássio no fluido intestinal seja devido à água que entra junto dos alimentos ou que ocorre secreção desse íon pelas células da parede do intestino e

que isso seja necessário para estabelecer gradientes iônicos essenciais para o transporte de nutrientes através da mucosa (Bishop et al. 1994).

Ocorreu variação inter-específica na regulação iônica entre as três espécies de equinodermos tidos de forma geral como osmoconformadores e estenohalinos. Essa variação no comportamento osmótico das espécies diante dos desafios apresentados pode ser explicada pela permeabilidade seletiva, tamanho do corpo ou a posição ecológica ao longo do costão rochoso (Vidolin et al . 2007).

Os ouriços-do-mar em um costão rochoso, na região de entre marés, estão sujeitos de formas distintas ao regime das marés. Aqueles da região de mesolitoral podem ficar expostos ao ar na maré baixa, no entanto aqueles de sublitoral dificilmente ficarão expostos. Ouriços da espécie *Lytechinus variegatus* não são submetidos diariamente às mudanças na salinidade do ambiente, pois habitam regiões constantemente submersas. Neste estudo apresentaram tamanho médio da circunferência da carapaça de ~ 112 mm e espinhos curtos. Está descrito ainda que seus pés ambulacrais não suportam o batimento das ondas o que impede sua fixação às rochas (Sharp e Gray 1962). Quando foram expostos aos experimentos de diluição e concentração da água do mar sustentaram gradientes entre o fluido celômico e a água experimental, para a maioria dos íons. *L. variegatus* apresentou, dentre as três espécies testadas, a maior capacidade de manutenção de gradientes iônicos mesmo ocupando regiões submersas.

A espécie *Echinometra lucunter* apresentou tamanho da circunferência da carapaça de ~ 140 mm. Habita locas no costão rochoso na região de entre marés, portanto está sujeita ao regime das marés. Esta espécie mostra-se tolerante às condições mais desafiadoras das regiões superiores no costão rochoso, e apresenta a carapaça bastante robusta; seus espinhos são grossos e resistentes e esse fato

evita de serem levados com o batimento das ondas. De forma semelhante à *L. variegatus*, apresentou capacidade de manutenção dos gradientes entre o fluido celômico e a água quando submetidos aos experimentos de diluição e concentração, para todos os íons exceto para o cloreto.

A espécie *Arbacia lixula* apresentou o tamanho da circunferência da carapaça de ~84 mm. No costão rochoso está posicionado na região intermediária que fica entre a região mais superior no costão e a faixa de areia, mas sempre submerso. Seus espinhos são longos e seus pés fortes e resistentes ao batimento das ondas. Quando submetida aos mesmos experimentos que as outras duas espécies não sustentaram gradiente para nenhum íon, exatamente como já havia sido observado em estudo anterior, com protocolo de 6 horas de exposição a diluição da água do mar (Vidolin et al. 2007). Esta espécie apresenta grande relação superfície/volume e assim pode dissipar gradientes mais rapidamente do que *L. variegatus* e *E. lucunter*.

## CONCLUSÕES

1) De forma geral revelaram-se alguns padrões de conformação osmótica e iônica similares, porém não idênticas, entre as três espécies dentro do filo Echinodermata/Classe Echinoidea.

2) *Lytechinus variegatus* habita regiões submersas em contato com a areia e são capazes de manter gradientes para a todos os íons, entre seu fluido celômico e a água, nos experimentos de diluição e concentração da água mar.

3) *Echinometra lucunter* habita a porção batida do costão, ficam presos a locas e mostrou também capacidade de regular íons, menos para o cloreto.

4) *Arbacia lixula* habita o estrato intermediário onde não ocorre quebra de ondas, não fica dentro de locas e não apresentaram capacidade de manter a estabilidade nas concentrações.

5) O tamanho do animal não foi o fator determinante da capacidade de manutenção de gradientes iônicos, apesar de provavelmente interferir sobre o fenômeno.

6) *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* apresentaram diferença na concentração de potássio entre o fluido celômico e do intestino.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barker MF, Russell MP (2008) The distribution and behaviour of *Patiriella mortenseni* and *P. regularis* in the extreme hyposaline conditions of the Southern New Zealand Fiords. *J Exp Mar Biol Ecol* 355:76–84
- Benedetti-Cecchi L, Bulleri F, Cinelli F (1998) Density dependent foraging of sea urchins in shallow subtidal reefs on the west coast of Italy (Western Mediterranean). *Mar Ecol Prog Ser* 163:203-211
- Binyon J (1962) Ionic regulation and mode of adjustment to reduced salinity of the starfish *Asterias rubens*. *Mar Biol Ass UK* 42:49-69
- Binyon J (1966) Salinity tolerance and ionic regulation. In: Boolootian, R.A (ed) *Physiology of Echinodermata*. Interscience Publishers, New York
- Bishop D, Lee KJ, Watts SA (1994) A comparison of osmolality and specific ion concentrations in the fluid compartments of the regular sea urchin *Lytechinus variegatus* Lamarck (Echinodermata: Echinoidea) in varying salinities. *Comp Biochem Physiol* 108 A:497-502
- Boolootian RA (1966) *Physiology of Echinodermata*. Interscience Publishers, New York
- Brusca GJ, RC Brusca (2007) *Invertebrados*. 2ª Ed. Guanabara Koogan
- Bulleri F, Benedetti-Cecchi L, Cinelli F (1999) Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* L. and *Paracentrotus lividus* Lam. in the northwest Mediterranean. *J Exp Mar Biol Ecol* 241:81-95
- Castro CB, Echeverria C A, Pires DO, Mascarenhas BJA, Freitas SG (1995) Distribuição de Cnidaria e Echinodermata no infralitoral de costões rochosos de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Biol* 55:471-480
- Cavey MJ, Märkel K (1994) Echinoidea. In Harrison F.W. and Chia F.S. (eds) *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Echinodermata. Vol. 14*. New York: Wiley-Liss, pp. 345–400.
- Chelazzi G, Serra G, Bucciarelli, G (1997) Zonal Recovery after experimental displacement in two sea urchins co-occurring in the Mediterranean. *J Exp Mar Biol Ecol* 212:1-7
- Diehl WJ, Lawrence JM (1984) The effect of salinity on coelomic fluid osmolyte concentration and intracellular water content in *Luidia clathrata* (say) (Echinodermata:Asteroidea). *Comp Biochem Physiol* 1:119-126

Drouin G, Himmelman JH, Béland P (1985) Impact of tidal salinity fluctuations on echinoderm and mollusc populations. *Can J Zool* 63:1377-1387

Ernest RG, Blake NJ (1981) Reproductive patterns within subpopulations of *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). *J Exp Mar Biol Ecol* 55:25-37

Freire CA, Santos IA, Vidolin D (2010) Osmolality and ions of the perivisceral coelomic fluid of the intertidal sea urchin *Echinometra lucunter* upon salinity and ionic challenges. *Submetido ao Zool Stud*.

Foglietta LM, Herrera FC (1996) Ionosmotic response of respiratory trees of the holothurian *Isostichopus badionotus* Selenka preincubated in hyper-, iso- and hypo-osmotic sea water. *J Exp Mar Biol Ecol* 202:151-164

Forcucci D, Lawrence JM (1986) Effect of low salinity on the activity, feeding, growth and absorption efficiency of *Luidia clathrata* (Echinodermata: Asteroidea) *Mar Biol* 92:315–321

Gondim AI, Lacouth P, Alonso C, Manso CLC (2008) Echinodermata from Cabo Branco Beach, João Pessoa, Paraíba, Brazil. *Biota Neotrop* 8(2):151-159

Griinbaum H, Bergman G, Abbott DP, Ogden JC (1978) Intraspecific agonistic behavior in the rock-boring sea urchin *Echinometra lucunter* (L.) (Echinodermata: Echinoidea). *Bull Mar Sci* 28(1):181-188

Hartwig A (2001) Role of magnesium in genomic stability. *Mutation Research* 475:13-121

Hendler G, Miller JE, Pawson DL, Kier PM (1995) Echinoderms of Florida and the Caribbean: Sea Stars, Sea Urchins, and Allies. Smithsonian Institution Press, Washington

Hill SK, Lawrence JM (2003) Habitats and characteristics of the sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Arbacia punctulata* (Echinodermata) on the Florida Gulf-coast shelf. *Mar Ecol* 24(1):15-30

Himmelman JH, Guderley H, Vignault G, Drouin G, Wells PG (1984) Response of the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, to reduced salinities: importance of size, acclimation, and interpopulation differences. *Can J Zool* 62, 1015–1021

Hyman HL (1955) *The Invertebrates: Echinodermata, Vol. IV*. New York: McGraw-Hill Book Company

Junqueira AOR, Ventura CRR, Carvalho ALPS, Schmidt AJ (1997) Population recovery of the sea urchin *Lytechinus variegatus* in a seagrass flat (Araruama Lagoon, Brazil): the role of recruitment in a disturbed environment. *Invert Rep Dev* 31:143-150

Kinne, O (1964) The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II-salinity and temperature salinity combination. *Oceanogr. Mar Biol ANN Rev* 2:281-339

Lange R (1964) The osmotic adjustment in the echinoderm, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Comp Biochem Physiol* 13:205–216

Lawrence JM (1975) The effect of temperature salinity combinations on the functional well-being of adult *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Echinodermata, Echinoidea). *J Exp Mar Biol Ecol* 18:271-275

Lessios HA (1981) Reproductive periodicity of the echinoids *Diadema* and *Echinometra* on the two coasts of Panama. *J Exp Biol Ecol* 50:47-61

Lewis JB, Storey GS (1984) Differences in morphology and life history traits of the echinoid *Echinometra lucunter* from different habitats. *Mar Ecol Prog Ser* 15:207-211

McPherson BF (1969) Studies on the biology of the tropical sea urchins, *Echinometra lucunter* and *Echinometra viridis*. *Bull Mar Sci* 19(1):194-213

Metaxas A (1998) The effect of salinity on larval survival and development in the sea urchin *Echinometra lucunter*. *Invert Reprod Dev* 34:323-330

Pagett RM (1980) Distribution of sodium, potassium and chloride in the ophiuroid, *Ophiocomina nigra* (Abildgaard). *J Mar Biol Ass UK* 60:163-170

Prusch RD (1977) Solute secretion by the tube foot epithelium in the starfish *Asterias forbesi*. *J Exp Biol* 68:35-43

Ribeiro-Costa CS, Rocha RM (2002) *Invertebrados Manual de Aulas Práticas*. Holos, Ribeirão Preto

Robertson JD (1949) Ion regulation in some marine invertebrates. *J Exp Biol* 26: 182-200

Roller RA, Stickle WB (1993) Effects of temperature and salinity acclimation of adults on larval survival, physiology, and early development of *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Mar Biol* 116:583-591

Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD (2005) Zoologia dos Invertebrados. 7ª Ed. Roca, São Paulo

Sabourin TD, Stickle WB (1981) Effects of salinity on respiration and nitrogen excretion in two species of echinoderms. *Mar Biol* 65, 91–99

Sánchez-Jérez P, Cesar A, Cortez FS, Pereira CDS, Silva SLR (2001) Distribución espacial de las poblaciones de erizos más abundantes de la costa sudeste del litoral de São Paulo (Brasil). *Cienc Mar* 27(1):139-154

Santos-Gouveia IA, Freire CA (2007) Effects of hypo- and hypersaline seawater on the microanatomy and ultrastructure of epithelial tissues of *Echinometra lucunter* (Echinodermata: Echinoidea) of intertidal and subtidal populations. *Zoological Studies* 46: 203–215

Santos R, Flammang P (2005) Morphometry and mechanical design of tube foot stems in sea urchins: a comparative study. *J Exp Mar Biol Ecol* 315:211–223

Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A (2000) Magnesium: An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clinica Chimica Acta* 294:1–26

Schmidt-Nielsen K (2002) Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente. Santos, São Paulo

Schmiegelow JMM (2004) O Planeta Azul: Uma introdução às ciências marinhas. Interciência, Rio de Janeiro

Sharp DT, Gray IE (1962) Studies on factors affecting the local distribution of two sea urchins, *Arbacia punctulata* and *Lytechinus variegatus*. *Ecol* 43 (2):309-313

Shumway S (1977) The effects of fluctuating salinities on four species of asteroid echinoderms. *Comp Biochem Physiol* 58A:177-179

Stickle WB, Ahokas R (1974) The effects of tidal fluctuations of salinity on the perivisceral fluid composition of several echinoderms. *Comp Biochem Physiol* 47A:469-476

Stickle WB, Denoux GJ (1976) Effects of *in situ* tidal fluctuations on osmotic and ionic composition of body fluid in outeastern Alaska rocky intertidal fauna. *Mar Biol* 37:125-135

Stickle WB, Diehl WJ (1987) Effects of salinity on echinoderms. In: Jangoux M, Lawrence JM (ed) Echinoderm Studies, AA Balkema, Rotterdam 235-285

Talbot TD, Lawrence JM (2002) The effect of salinity on respiration, excretion, regeneration and production in *Ophiophragmus filigraneus* (Echinodermata: Ophiuroidea). *J Exp Mar Biol Ecol* 275:1–14.

Tavares YAG (2004) Biologia reprodutiva dos equinóides *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) e *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) na Ilha da Galheta, litoral paranaense, Brasil. Tese, Universidade Federal do Paraná

Turner RL, Meyer CE (1980) Salinity tolerance of the Brackish-water echinoderm *Ophiophragmus filigraneus* (Ophiuroidea). *Mar Ecol Prog Ser* 2:249-256

Vidolin D, Santos-Gouveia IA, Freire CA (2007) Differences in ion regulation in the sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Arbacia lixula* (Echinodermata: Echinoidea). *J Mar Biol Ass UK* 87:769-775

Warnau M, Jangoux M (1999) In vitro and in vivo investigations of the excretory function of the rectal caeca in the asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata). *Comp Biochem Physiol* 123A: 263-267

Warnau M, Temara A, Ameye L, Jangoux M (1998) The excretory function of the posteriormost part of the echinoid and holothuroid gut (Echinodermata). *Comp Biochem Physiol* 120A:687-691

**CAPÍTULO 2: FISIOLOGIA DA EXCREÇÃO: CELOMÓCITOS PRESENTES EM  
TECIDOS DO OURIÇO-DO-MAR *Echinometra lucunter* (LINNAEUS, 1758)**

Ivonete A. Santos, Sônia Grötzner and Carolina A. Freire

<sup>1</sup> Capítulo 2 formatado para a revista: Zoomorphology

## RESUMO

Os celomócitos são células livres presentes nos espaços celômicos, que vagam pelos tecidos e órgãos nos equinodermos. Em equinóides essas células são encontradas entre as células epiteliais dos pés ambulacrais, dos pés branquiais, do reto e da glândula axial. Quando estão dispersas no fluido celômico são coloridas havendo as células vermelhas, verde oliva, marrons, células ciliadas (e que vibram). Essas células podem ser classificadas de acordo com sua forma, tamanho e conteúdo citoplasmático. Há sete tipos de celomócitos descritos: 1) amebócitos fagocíticos, 2) célula esférica branca (célula mórula branca), 3) célula esférica vermelha com grânulos vermelhos (célula mórula vermelha), 4) célula vibrátil, 5) célula cristal, 6) célula progenitora e 7) hemócito. No entanto, ainda ocorrem divergências na literatura no que diz respeito à nomenclatura e funções de cada tipo. Elas são responsáveis pela mediação das respostas imunes através da fagocitose, pela limpeza de materiais estranhos como microorganismos, pelas trocas gasosas, pela estocagem de nutrientes, pela produção de componentes do tecido conjuntivo, e também participam do processo de cicatrização por remoção de tecidos mortos, produzem moléculas antimicrobiana, e estão envolvidas na regulação osmótica. Sabe-se que ocorre migração de celomócitos amebócitos do celoma perivisceral para o tecido conjuntivo peristomial e que essa migração é por quimiotaxia. Há poucas referências bibliográficas descrevendo células livres migrando por tecidos. As pesquisas concentram-se na capacidade fagocítica dos celomócitos em experimentos *in vitro*. Em *Echinometra lucunter* ficou demonstrado que os pés ambulacrais, pés branquiais, reto e glândula axial não são potenciais locais para o descarte de celomócitos carregados com levedura. Isso foi comprovado no presente estudo pela ausência de celomócitos com leveduras assim como a não alteração no

número de celomócitos nos tecidos. Os pés ambulacrais, os pés branquiais, o reto e a glândula axial mostraram, nesse estudo, que são tecidos que possuem atividade lisossômica. Essa atividade é maior na glândula axial quando comparada ao pé ambulacral. Essa inédita caracterização mostrou que dentre os tecidos verificados a glândula axial se sobrepõe na atividade de digestão intracelular.

## ABSTRACT

Coelomocytes are free cells present in the coelomic spaces, that dwell within tissues and organs of echinoderms. In echinoids these cells are found between epithelial cells of ambulacral feet, branchial feet, rectum, and axial gland. When they are freely dispersed in the coelomic fluid, these cells are coloured, either red, olive Green, Brown, and vibratile ciliated cells. These cells can be classified according to their shape, size, and cytoplasmatic content. Still, their function is not yet fully established in the literature. They are involved in the immune response through fagocytosis, destruction of microorganisms, gas exchange, stocking of nutrients, production of connective tissue components, among other functions. They also participate in the process of healing through the removal of dead tissues. Phagocytic coelomocytes can release the captured material in the axial gland and the rectum. Little information is available on free cells migrating through the tissues; most reports deal with the phagocytic capacity of coelomocytes *in vitro*. In *E. lucunter*, it could be shown that ambulacral feet, branchial feet, the intestinal rectum and the axial gland are not potential places for the discharge of yeast-loaded coelomocytes. There was no change in the density of either red or white coelomocytes in these four tissues of the urchin, up to 24 hours after the injection of yeasts in its coelomic fluid. Lysosomal activity was detected, through binding to Lamp1; a higher signal was noted in the axial gland than in the ambulacral feet. The axial gland seems to be the tissue mostly involved in intracellular digestion, among the 4 examined tissues.

## INTRODUÇÃO

Os celomócitos são células livres presentes nos espaços celômicos e nos tecidos e órgãos dos equinodermos (Hyman 1955; Millott e Farmanfarmaian 1967; Farmanfarmaian 1968; Boolootian 1966; Coleman 1969; Holland e Ghiselin 1970; Cobb e Sneddon 1977; Florey e Cahill 1977; Bachmann e Goldschmid 1978; Bachmann et al. 1980; Leclerc et al. 1980; Wood e Cave 1981; Santos-Gouvea e Freire 2007; Faria e Silva 2008). Especificamente essas células são encontradas entre as células epiteliais no tecido do reto, dos pés ambulacrais, dos pés branquiais e da glândula axial (Hyman 1955; Bachmann et al. 1980; Eliseikina e Magarlamov 2002; Santos-Gouvea e Freire 2007).

Quando estão dispersas no fluido celômico podem apresentar várias cores. Estão descritas células brancas, vermelhas, verde-oliva e marrons. Há sete tipos de celomócitos: 1) amebócitos fagocíticos, 2) célula esférica branca (célula mórula branca), 3) célula esférica vermelha com grânulos vermelhos (célula mórula vermelha), 4) célula vibrátil, 5) célula cristal, 6) célula progenitora e 7) hemócito (Hyman 1955; Chia e Xing 1996; Lin et al. 2007).

Todas essas células podem ser classificadas de acordo com seu tamanho, forma e conteúdo citoplasmático (Bachmann e Goldschmid 1978; Höbaus 1978; Bachmann et al. 1980; Kaneshiro e Karp 1980; Coteur et al. 2002; Eliseikina e Magarlamov 2002; Borges et al. 2005; Smith et al. 2006; Santos-Gouvea e Freire 2007). As funções dos celomócitos sugeridas na literatura são as de: 1) mediação das respostas imunes por citotoxicidade, 2) fagocitose, 3) limpeza de materiais estranhos como microorganismos, 4) trocas gasosas, 5) estocagem de nutrientes, 6) produção de componentes do tecido conjuntivo, 7) cicatrização por remoção de tecidos mortos, 8) produção de moléculas antimicrobianas, 9) capacidade de

infiltração em locais lesionados, transporte de oxigênio, e até 11) regulação osmótica (Karp e Hildemann 1976; Kaneshiro e Karp 1980; Leclerc et al. 1980; Edds 1993; Silva e Peck 2000; Borges et al. 2002; Eliseikina e Magarlamov 2002; Haug et al. 2002; Smith et al. 2006; Arizza et al. 2007; Lin et al. 2007; D'Andrea et al. 2008; Dolmatov e Ginanova, 2009).

Na população de celomócitos, aqueles do tipo amebócito fagocítico, célula redonda branca e vermelha são os mais representativos na função imunológica. Foi identificada alta atividade citotóxica das células redondas brancas na presença de amebócitos fagocíticos, indicando a ocorrência de interação entre os celomócitos (Arizza et al. 2007).

As células esféricas vermelhas *in vitro* mostraram quimiotaxia por bactérias e posterior degranulação do pigmento Equinocromo A (Messer e Wardlaw 1979; Smith et al. 1995; Gross et al. 1999), que é um agente bactericida e que também confere a cor rosada ao fluido celômico (Messer e Wardlaw 1979; Haug et al. 2002). Pinsino et al. (2008) sugerem um aumento na quantidade de celomócitos vermelhos no ouriço *Paracentrotus lividus* sujeitos a contaminação ambiental devido à rápida divisão dessas células ou seu recrutamento dos locais hematopoiéticos, como o epitélio celômico. Injetando-se leveduras ou bactérias na cavidade celômica de equinodermos comprovou-se esse fato (Yui e Bayne 1983; Plytycz e Seljelid 1993; Smith et al. 1995; Borges et al. 2002; Coteur et al. 2002) identificando alta atividade fagocítica no fluido celômico. Os lisossomos são organelas presentes em todas as células eucariontes e estão envolvidas na digestão intracelular. As proteínas de lisossomo Lamp-1 e Lamp-2 são homólogas e representam 50% de todas as proteínas da membrana dos lisossomos (Fukuda 1991; Rohrer et al. 1996; Bräuer et al. 2004; Natarajan e Linstedt 2004; Eskelinen 2006; Yadavalli e Nadimpalli, 2008).

Essas proteínas podem ser identificadas por imunomarcação (Rohrer et al. 1996; Lee et al. 2006).

O destino dos celomócitos após a fagocitose é pouco relatado na literatura. As pesquisas se detêm nas atividades dos celomócitos livres no fluido celômico ou *in vitro*. Este trabalho propôs verificar *in vivo* possíveis vias de descarte de material fagocitado no fluido celômico, associando as atividades dessas células com a função excretora. O estudo foi direcionado para verificar se a injeção de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* na cavidade celômica aumenta a densidade de celomócitos nos tecidos dos pés ambulacrais, dos pés branquiais, do reto e da glândula axial no ouriço do mar *Echinometra lucunter* e também verificar qual desses tecidos apresenta maior intensidade de imunomarcação para a proteína de membrana de lisossomo (Lamp-1). A primeira hipótese testada foi que: a presença de células fagocíticas nos tecidos é estimulada pela injeção de leveduras na cavidade celômica. E a segunda hipótese foi que: ocorre diferença na quantidade de lisossomos entre os tecidos dos pés ambulacrais, pés branquiais, reto e glândula axial. Não ocorreu aumento na densidade de celomócitos em nenhum dos tecidos tampouco o aparecimento de células carregadas com levedura. Na imunomarcação, todos os tecidos apresentaram fluorescência, entretanto verificou-se uma diferença significativa entre a glândula axial, com mais intensidade quando comparada ao pé ambulacral.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e aclimatação dos ouriços-do-mar

Ouriços da espécie *Echinometra lucunter* (L., 1758) (Echinodermata: Echinoidea) da zona entremarés foram coletados manualmente durante maré baixa no costão rochoso da praia da Sepultura na cidade de Bombinhas, Santa Catarina (27° 08' 48" S e 48° 28' 54" W) no ano de 2009, e na praia da Paciência também em 2009 (26° 46' 59" S e 48° 36' 07" W) município de Penha, Santa Catarina, Brasil. Após coleta, os animais foram colocados em caixas de isopor contendo alga marinha (*Ulva* sp) para manter atmosfera úmida dentro da caixa, e transportados para o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO) da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, Paraná. No laboratório foram imediatamente transferidos para aquário estoque de 190 litros contendo água do mar de salinidade 35‰, temperatura de 20-24°C e aeração constante. Machos e fêmeas adultos foram utilizados indiscriminadamente. O diâmetro médio da carapaça dos ouriços foi de 138 mm (n=12). Passado o prazo de aclimatação de três dias às condições de laboratório os animais foram submetidos aos protocolos de exposição às leveduras para a indução de fagocitose, seus tecidos retirados e submetidos aos protocolos de microscopia de luz. Os mesmos tecidos de animais não injetados (animais controle) também foram submetidos aos protocolos de microscopia de luz.

### Injeção das leveduras

A câmara de Neubauer foi usada para contar os celomócitos presentes em 10 µl de fluido celômico dos animais. Após contagem, a suspensão de leveduras foi feita para obter uma proporção aproximada de 10 leveduras/celomócito dentro da cavidade celômica. Um mililitro de suspensão de leveduras (*Saccharomyces*

*cerevisiae*) foi injetado na cavidade celômica de quatro animais, com agulha de insulina. Passados os tempos de 20, 60, 120 minutos e 24 horas do momento da injeção, os ouriços foram crioanestesiados por 20 min em freezer -20°C. Em seguida fragmentos de tecidos dos pés ambulacrais, dos pés branquiais, do reto e da glândula axial foram retirados e submetidos aos protocolos de microscopia de luz (Anexo 1).

### **Microscopia de luz**

Os pés ambulacrais e os pés branquiais (brânquias peristomiais) dos ouriços foram retirados do hemisfério oral sob microscópio estereoscópico, usando pinça e tesoura oftalmológica. Posteriormente os animais foram seccionados na altura do "equador" com serra para retirada de fragmentos do reto e a glândula axial inteira. Os tecidos foram fixados em solução de formol 10% em PBS 0,1M, pH 7,4 por seis horas. Após esse tempo as peças foram transferidas para formol 0,5% em PBS 0,1M permanecendo no refrigerador (4°C) por 24 horas. Os tecidos foram submetidos à série de banhos de alcoóis para desidratar, e foram posteriormente emblocados em resina Paraplast Plus® (Sigma). Os cortes de cinco  $\mu\text{m}$  foram obtidos utilizando micrótomo Leica RM 2145 e corados com hematoxilina/eosina. Para cada animal foram confeccionadas duas lâminas por tecido. As lâminas foram fotografadas no fotomicroscópio Leica DM LS2, com câmera acoplada Leica DFC 300FX, do Laboratório de Citogenética Animal do Departamento de Genética/UFPR. A área total de cada foto foi de  $58.000 \mu\text{m}^2$ , e desta área foram analisados (contagem de células) três campos amostrais aleatórios de  $10.000 \mu\text{m}^2$  cada. Sendo assim, 52% da área fotografada foram amostrados para a contagem das células (n=6 fotos para cada tecido). As contagens foram realizadas através do programa Adobe Photoshop CS4 Extended.

## **Quantificação da Proteína de Membrana Associada à Lisossoma (Lamp-1) por imunofluorescência**

### **Obtenção das células**

Após três dias de aclimatação em laboratório, os animais (n= 6) foram anestesiados como descrito anteriormente e os fragmentos dos pés ambulacrais, dos pés branquiais, do reto e da glândula axial foram submetidos aos protocolos de dissociação celular. Em placa de *Petri* os tecidos foram picotados em solução de PBS-EDTA. Após 15 minutos os fragmentos foram passados por rede fina para retirada de massas maiores de tecidos. Posteriormente foram filtrados em malha de mesh 40  $\mu\text{m}$  e centrifugados por 5 minutos a 1200 G. O *pellet* formado foi ressuscitado em 1 ml de PBS para a contagem e obtenção de  $10^6$  células. Para contagem de  $10^6$  células foram aliqotados 10  $\mu\text{l}$  do PBS com as células em suspensão, colocadas na câmara de Neubauer e contadas usando o microscópio invertido Leica DMIL. Ao eppendorf já contendo o *pellet* de  $10^6$  células foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de PBS + formaldeído 4% por 40 minutos, para a fixação das células. Depois o material foi centrifugado (5 minutos a 1200 G) e lavado com PBS, centrifugado novamente e foram adicionados 500  $\mu\text{l}$  de PBS e azida de sódio (10mg/L) (Anexo 2).

### **Imunocitoquímica da Lamp-1**

As células fixadas com paraformaldeído receberam 10  $\mu\text{l}$  de triton X-100 por 15 min. Em seguida o material foi centrifugado e lavado com PBS (2 ou 3 vezes). As células foram então ressuscitadas em 500  $\mu\text{l}$  de PBS e receberam 20  $\mu\text{l}$  de soro de cabra, por 12-16 horas (pernoite). Três microlitros de anticorpo contra a proteína de membrana do lisossomo, Lamp-1, produzido em camundongo (Santa Cruz

Biotechnology) foram diluídos em 100 µl de PBS. Do anticorpo diluído foram retirados 10 µl os quais foram adicionados ao tubo com as células, e deixados pernoitar. O material foi centrifugado (1200 G por 5 minutos) e lavado duas vezes com PBS. Às células suspensas em 500 µl de PBS já ligadas ao anticorpo primário foram adicionados 20 µl do anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo, produzido em cabra), conjugado com o fluorocromo fluoresceína (FITC) (Pierce, EUA) diluído 1:10 em PBS e deixado para incubação overnight. As células foram novamente centrifugadas, e os *pellets* lavados uma vez com PBS (procedimentos realizados no escuro). Em microplaca preta de fundo chato foram colocados 200 µl de amostra em cada poço. As leituras das placas foram realizadas no leitor de microplaca “Tecan Infinity M 200”. O comprimento de onda para excitação foi de 488 nm e comprimento de onda para emissão foi de 518 nm, temperatura de 32.9°C do aparelho.

### **Análise estatística**

Os resultados foram analisados utilizando o programa SigmaStat versão 2.03. ANOVA de uma via foi realizada para comparar os tempos: controle, 20 minutos, 1 hora, 2 horas e 24 horas. Outra ANOVA de uma via foi realizada para comparar os quatro tecidos no mesmo tempo de exposição. O teste t de *Student* foi utilizado para comparar a fluorescência emitida pelos tecidos. O nível de significância foi sempre de 0,05.

## RESULTADOS

### Microscopia de luz

As imagens de microscopia de luz mostraram diferenças nos tipos celulares presentes nos tecidos. Foram observados celomócitos vermelhos (também chamados de amebócito vermelho, célula esférica vermelha, eleócitos, célula mórula, célula pigmentada) e brancos (também chamadas de célula esférica descolorida, célula mórula branca) entre as células epiteliais dos pés ambulacrais, dos pés branquiais e do reto (Figs. 1, 2, 3). Também entre as células do estroma na glândula axial (Fig. 4). As células constituintes dos tecidos continham o núcleo com a cromatina frouxa. Os celomócitos vermelhos apresentaram formatos variados, com citoplasma repleto de grânulos secretores pigmentados de vermelho, o núcleo mostrou-se arredondado e a cromatina condensada. Os celomócitos brancos apresentaram o núcleo bem evidente e com cromatina condensada e o citoplasma com ausência de grânulos ou vacúolos. Mesmo com o citoplasma vazio o formato dessa célula foi mantido sugerindo perda de material após a fixação ou pouca afinidade com os corantes.

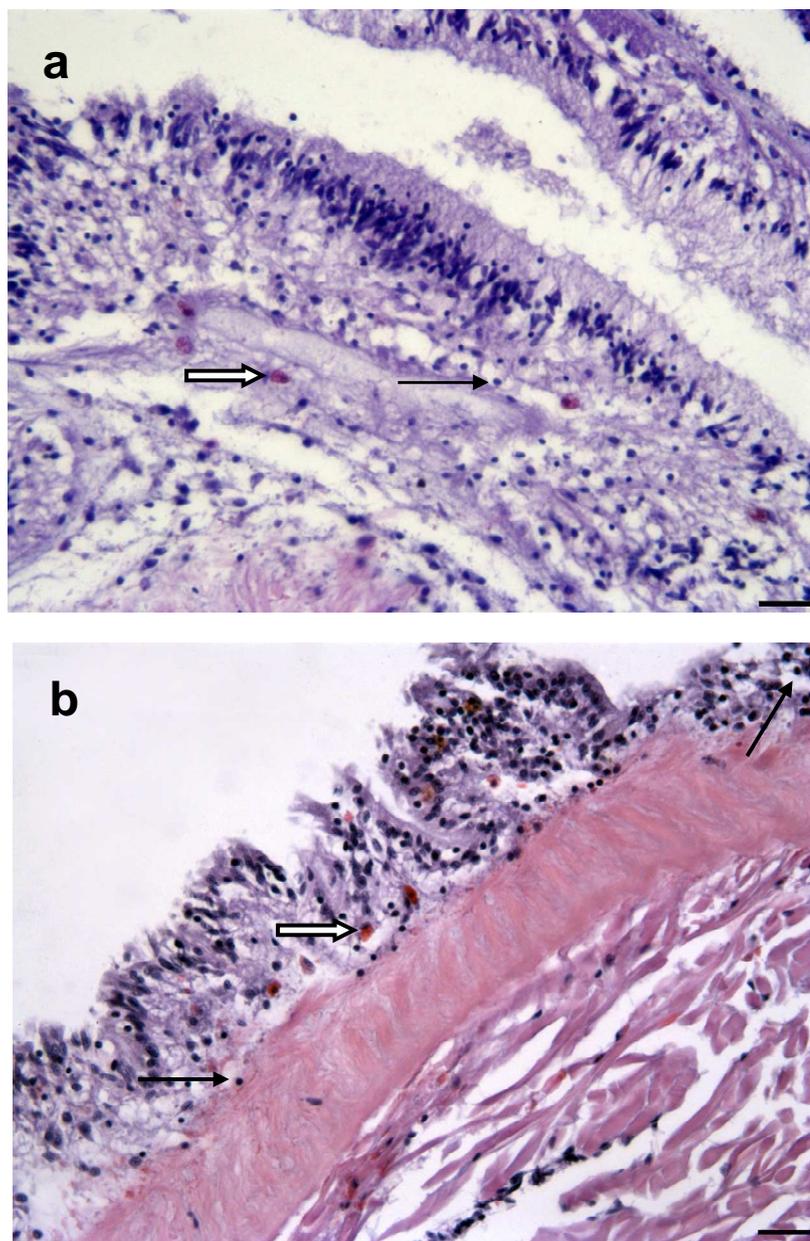


Figura 1. Celomócitos nos pés ambulacrais de *Echinometra lucunter* submetidos à injeção de *Saccharomyces cerevisiae*. Após 1 hora (a) e 24 horas (b). Celomócitos vermelhos (seta branca), celomócitos brancos (seta preta). Barra de escala 20  $\mu$ m.

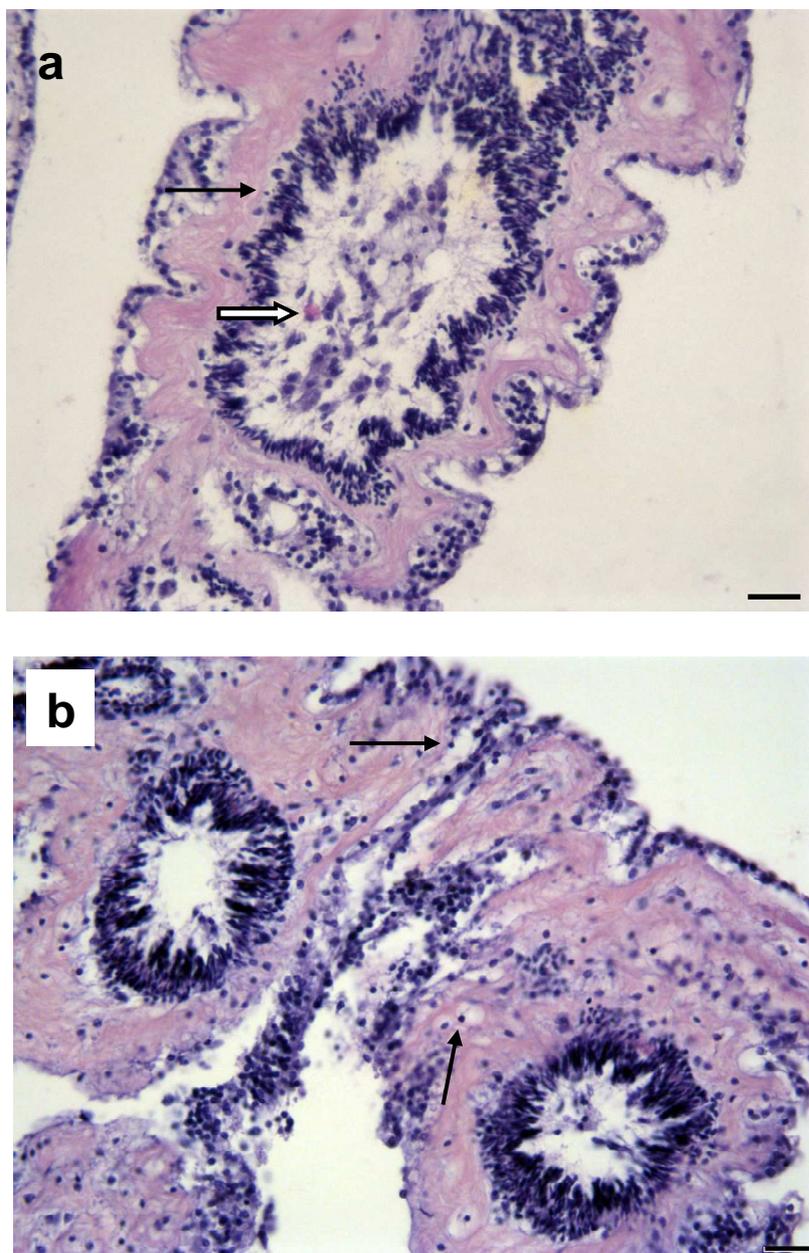


Figura 2. Celomócitos nos pés branquiais de *Echinometra lucunter* submetidos à injeção de *Saccharomyces cerevisiae*. Após 24 horas. Celomócitos vermelhos (seta branca), celomócitos brancos (seta preta). Barra de escala 20  $\mu$ m.

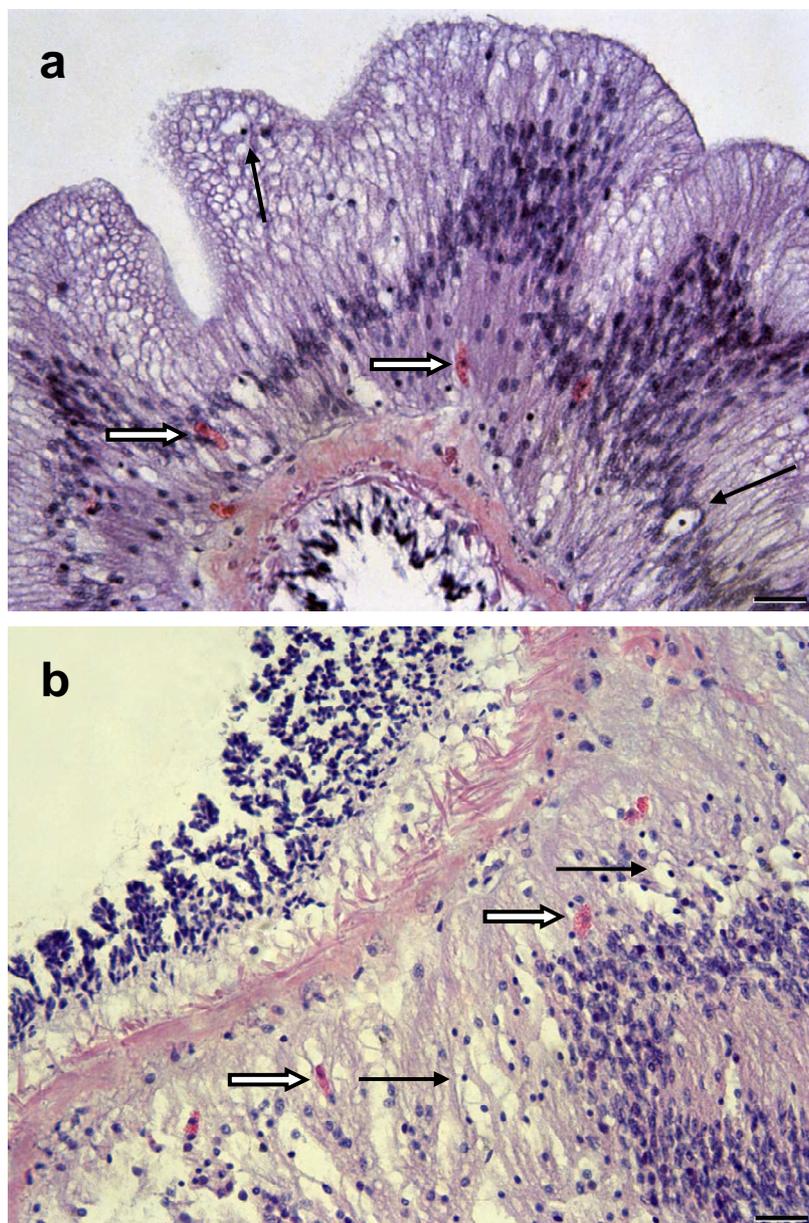


Figura 3. Celomócitos nos tecidos reto de *Echinometra lucunter* submetidos à injeção de *Saccharomyces cerevisiae*. Após 24 horas (a) e 1 hora (b). Celomócitos vermelhos (seta branca), celomócitos brancos (seta preta). Barra de escala 20  $\mu$ m.

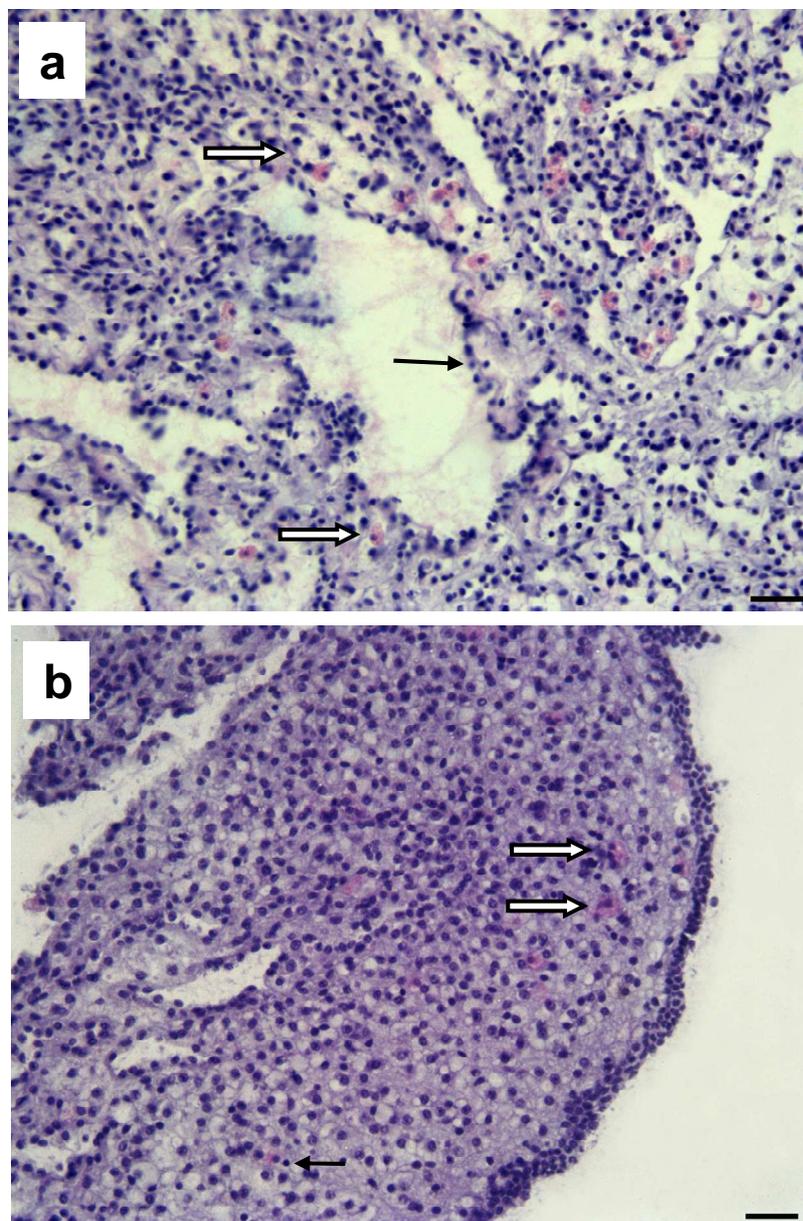


Figura 4. Celomócitos na glândula axial de *Echinometra lucunter* submetidos à injeção de *Saccharomyces cerevisiae*. Após 24 horas (a) e 20 minutos (b). Celomócitos vermelhos (seta branca), celomócitos brancos (seta preta). Barra de escala 20  $\mu\text{m}$ .

### **Pés ambulacrais**

A injeção da solução de *Saccharomyces cerevisiae* na cavidade celômica de *Echinometra lucunter* não alterou, ao longo do tempo, a quantidade de celomócitos vermelhos nos pés ambulacrais quando comparados ao controle ( $p= 0.112$ ). Entretanto, após 1 hora ( $12.1 \pm 2.52$ ) e 24 horas ( $11.6 \pm 2.14$ ) a quantidade de celomócitos brancos aumentou quando comparada ao controle ( $2.9 \pm 1.9$ ) (Fig. 5).

### **Pés branquiais, Reto e Glândula Axial**

Após os tempos de 20 minutos, 1, 2 ou 24 horas da injeção da solução de *Saccharomyces cerevisiae* não houve mudança na quantidade de celomócitos vermelhos ( $p= 0.183$ ) ou brancos ( $p= 0.159$ ) nos pés branquiais. O mesmo padrão foi encontrado para os celomócitos vermelhos ( $p= 0.568$ ) e brancos ( $p= 0.502$ ) do reto e da glândula axial; celomócitos vermelhos ( $p= 0.530$ ) e brancos ( $p= 0.221$ ) (Fig. 6b, c, d).

Quando comparados os quatro tecidos nos mesmos tempos não foram encontradas diferenças nas quantidades de celomócitos vermelhos ou brancos. Controle: celomócitos vermelhos ( $p= 0.160$ ), celomócitos brancos ( $p= 0.849$ ). Após 20 minutos: vermelhos ( $p= 0.102$ ) brancos ( $p= 0.620$ ). Após 1 hora: celomócitos vermelhos ( $p= 0.366$ ) celomócitos brancos ( $p= 0.298$ ). Após 2 horas: celomócitos vermelhos ( $p= 0.052$ ) e celomócitos brancos ( $p= 0.432$ ). Após 24 horas: celomócitos vermelhos ( $p= 0.689$ ) e celomócitos brancos ( $p= 0.190$ ) (Fig. 5 e Fig. 6b, 6c, 6d).

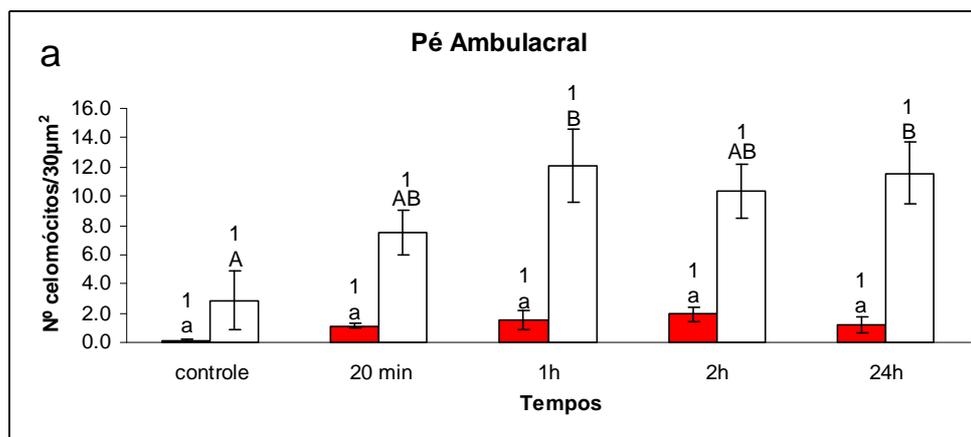


Figura 5. Celomócitos nos pés ambulacrais de *Echinometra lucunter* submetidos à injeção de *Saccharomyces cerevisiae*. Celomócitos vermelhos (barra vermelha); celomócitos brancos (barra branca). Barras com letra em comum não são significativamente diferentes. Quando comparados celomócitos vermelhos X tempo: letras minúsculas. Quando comparados celomócitos brancos X tempo: letras maiúsculas. Comparação entre os tecidos: algarismos.  $P < 0.05$ .

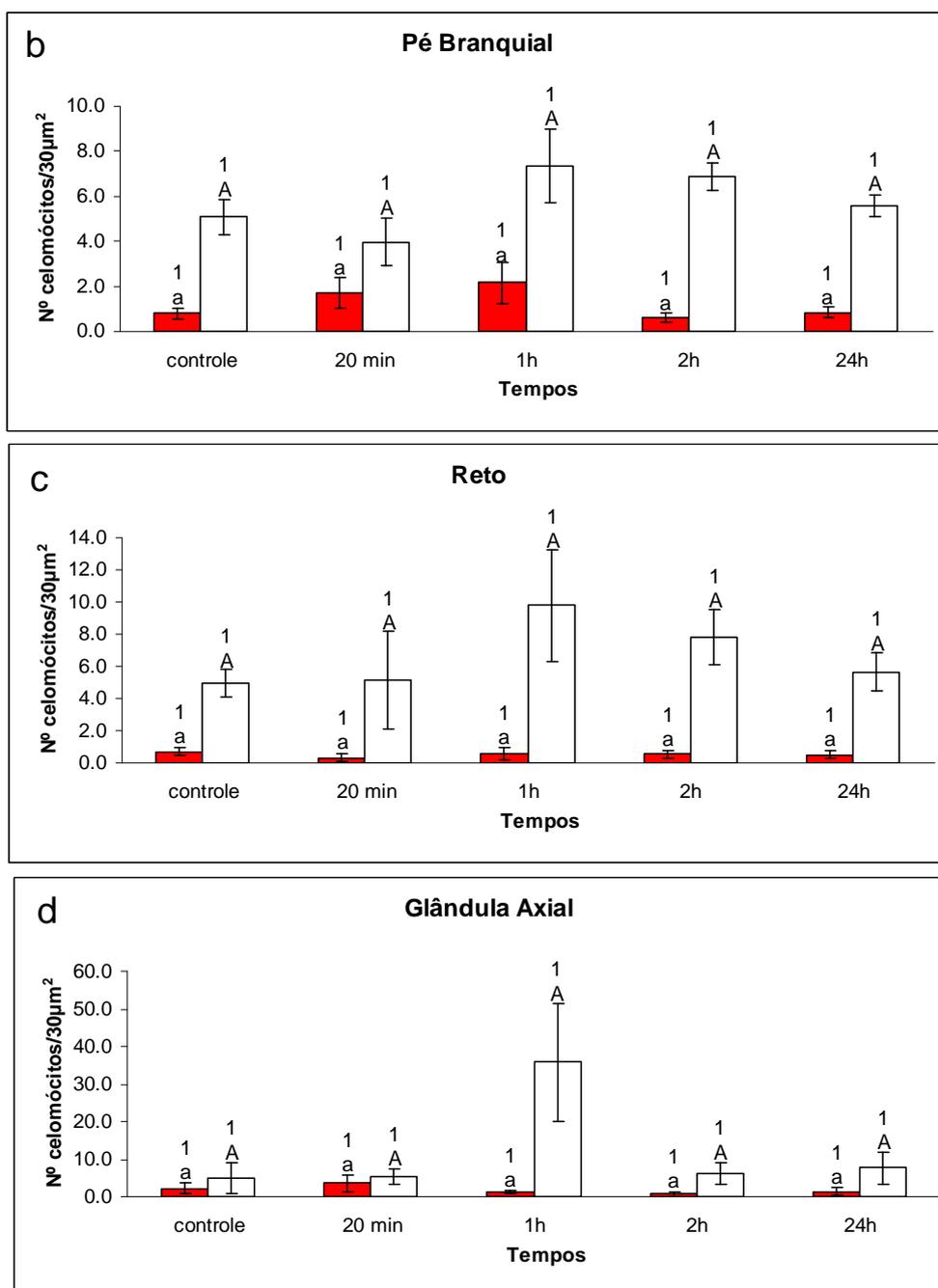


Figura 6. Celomócitos nos tecidos dos pés branquiais, do reto e da glândula axial de *Echinometra lucunter* submetidos à injeção de *Saccharomyces cerevisiae*. Celomócitos vermelhos (barra vermelha); celomócitos brancos (barra branca). Barras com letra em comum não são significativamente diferentes. Quando comparados celomócitos vermelhos X tempo: letras minúsculas. Quando comparados celomócitos brancos X tempo: letras maiúsculas. Comparação entre os tecidos: algarismos.  $P < 0.05$ .

### Proteína de Membrana Associada a Lisossomas (Lamp-1)

Os tecidos dos pés ambulacrais, dos pés branquiais, do reto e da glândula axial de *Echinometra lucunter* emitiram sinal positivo para o anticorpo primário (Lamp-1, Santa Cruz Biotechnology). A maior quantidade de fluorescência foi emitida pelo tecido da glândula axial ( $506 \pm 116.41$  unidades arbitrárias) seguida pelo tecido do reto ( $431 \pm 104.09$ ), pelo tecido dos pés branquiais ( $415.2 \pm 68.70$ ) e dos pés ambulacrais ( $351 \pm 29.34$ ). Houve diferença apenas entre a fluorescência emitida pela glândula axial e pé ambulacral ( $p= 0.02$ ) (Fig. 7).

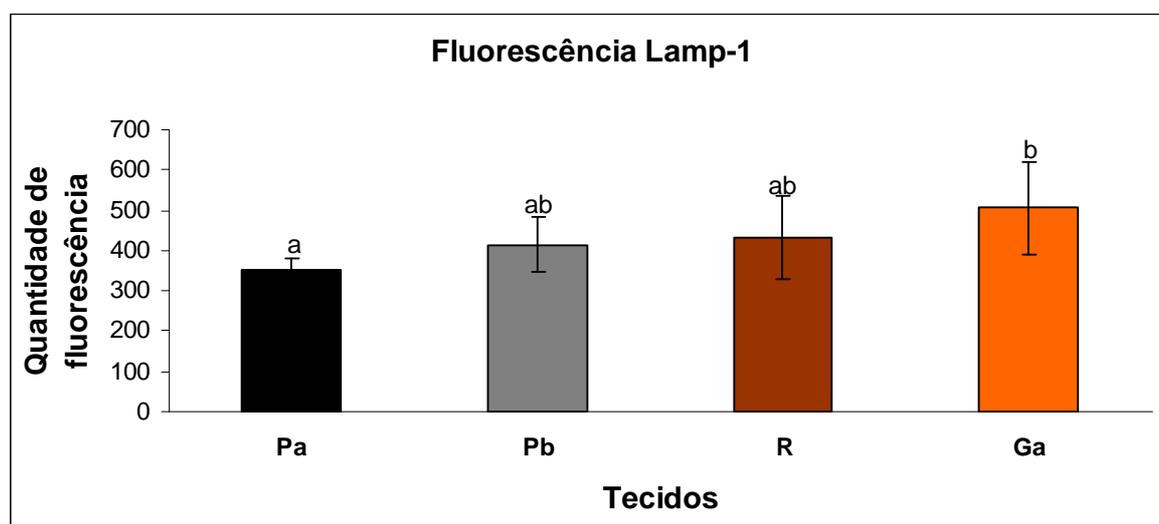


Figura 7. Quantificação da imunofluorescência para Lamp-1 nos tecidos de *Echinometra lucunter* (Ga= glândula axial; R= Reto; Pb= pé branquial e Pa= pé ambulacral). Barras com letras em comum não são significativamente diferentes.  $P < 0.05$ .

## DISCUSSÃO

As perguntas que motivaram este trabalho foram: se existe algum tecido responsável por receber as células fagocíticas oriundas do fluido celômico. E também se dentre os quatro tecidos estudados qual teria maior atividade de digestão intracelular tentando correlacionar esse fato com uma possível via de excreção.

Neste trabalho foi investigada, através de microscopia de luz, a presença de celomócitos contendo leveduras *Saccharomyces cerevisiae* nos tecidos dos pés ambulacrais e dos pés branquiais, do reto e da glândula axial. As células vermelhas com grânulos e as células redondas brancas que foram observadas nos tecidos analisados estão de acordo com aquelas descritas na literatura (Hyman 1955; Boolootian 1966; Messer e Wardlaw 1979; Kaneshiro e Karp 1980; Haug et al. 2002; Borges et al. 2005; Faria e Silva 2008). Não houve diferença na densidade de celomócitos nos tecidos após a injeção de leveduras. Houve diferença na densidade de células brancas no tecido dos pés ambulacrais apenas entre os controles e o tempos 1 e 24 horas (Fig. 5). Foi avaliado também a intensidade da proteína de membrana lisossômica, Lamp-1, nos mesmos tecidos supracitados. Na análise da intensidade de Lamp-1 foi por imunofluorescência de células dissociadas. Os tecidos da glândula axial emitiram mais sinal do que os dos pés ambulacrais, indicativo de maior quantidade de lisossomas no tecido.

O aumento de celomócitos vermelhos no fluido celômico de *Paracentrotus lividus* foi indicativo de estresse diante de ambientes contaminados (Matranga et al. 2000). Em injúria severa como a evisceração em pepinos do mar são perdidos muitos tipos celulares e há a necessidade de reposição, ocorrendo então migração de células juvenis que se diferenciam em celomócitos (Dolmatov e Ginanova 2009). A atividade dos celomócitos pode estar relacionada à quantidade de estímulos assim

como a espécie da qual o tecido foi utilizado (Yui e Bayne 1983). Em equinodermos injetados com bactérias ou leveduras na cavidade celômica, o tempo para de fagocitose pelos celomócitos variou de 10 minutos a 2 semanas (Yui e Bayne 1983; Plytycz e Seljelid 1993; Mangiaterra e Silva 2001; Borges et al. 2002; Coteur 2002; Borges et al. 2005). Além da presença dessas células na cavidade celômica, os pés ambulacrais dos ouriços do mar *Diadema antillarum*, *Stylasterias forreri*, *Strongylocentrotus franciscanus* e *Echinometra lucunter* apresentam celomócitos amebócitos e células mórula entre as células epiteliais e tecido conjuntivo (Coleman 1969; Florey e Cahil 1977; Wood e Cavey 1981; Motokawa 1982; McKenzie 1987; Santos-Gouvea e Freire 2007).

Da cavidade celômica ocorre migração de celomócitos fagocíticos para tecidos da membrana peristomial (Mangiaterra e Silva 2001; Faria e Silva 2008) e também celomócitos danificados foram encontrados entre as células epiteliais dos pés branquiais do ouriço *Echinus esculentus* em direção ao meio externo para descarte (Cobb e Sneddon 1977).

Células oriundas dos sinus axial podem alcançar o meio externo através dos pés ambulacrais (Bachmann e Goldschmid 1978). Smith (1981) propôs que após a ingestão de materiais estranhos, alguns celomócitos fagocíticos parecem migrar para os pés branquiais de onde podem ser externalizados. Corroborando com a descrita motilidade dos celomócitos do tipo amebócitos fagocíticos petalóides e os celomócitos granulócitos vermelhos (D'Andrea et al. 2008). Inesperadamente neste trabalho com *E. lucunter* não apareceram celomócitos com leveduras entre as células do tecido dos pés ambulacrais e dos pés branquiais, havendo apenas celomócitos carregados com vesículas e celomócitos brancos de citoplasma vazio. A partir desses dados pode-se afirmar que os pés ambulacrais e branquiais de

*Echinometra lucunter* não são potenciais locais para o descarte de celomócitos carregados com leveduras.

Assim como nos órgãos externos, a injeção de leveduras na cavidade celômica também não aumentou a densidade de celomócitos no tecido do reto ou na glândula axial, havendo como nos pés ambulacrais e branquiais, apenas celomócitos carregados com vesículas e celomócitos brancos de citoplasma vazio. O epitélio luminal do reto de *Echinometra lucunter* apresenta celomócitos constitutivos bem como células com ultra-estrutura compatível com função excretora (Santos-Gouvea e Freire, 2007). Corantes vitais injetados na cavidade celômica dos equinodermos *Asterias rubens* e *Holothuria tubulosa* foram encontrados no lúmen do reto (Warnau e Jangoux 1999; Warnau et al. 1998). O reto e a glândula axial compartilham funções no sistema imune. Ocorre migração de fagócitos da cavidade celômica para a glândula axial (Smith 1981) onde ficam armazenados na forma de fagócitos tardios. Posteriormente essas células migram até o epitélio do reto em direção ao lúmen para o descarte (Bachmann e Goldschmid 1978; Bachmann et al. 1980). Além disso, a glândula axial também é considerada um órgão hematopoiético, pois produz as células redondas vermelhas (Matranga et al. 2000). Millott e Farmanfarmaian (1967) descreveram a glândula axial como um dos maiores locais de degradação de produtos do celoma demonstrando que este órgão pode absorver materiais diretamente do celoma ou após a ingestão pelos fagócitos. Em contrapartida, esse órgão parece não ser de extrema importância na homeostasia de ouriços do mar, pois *Arbacia punctulata* sem a glândula axial sobreviveu por 9 meses (Farmanfarmaian 1968).

Pela primeira vez ficou demonstrado que tanto o reto quanto a glândula axial apesar de serem extensivamente relatados com funções excretoras parecem não

participar da eliminação de celomócitos carregados com leveduras provenientes do fluido celômico. Neste trabalho a ausência de celomócitos contendo leveduras nos tecidos de *Echinometra lucunter* pode estar associada ao fato de que houve total degradação das leveduras ainda no fluido celômico. A cinética de limpeza do fluido celômico e o destino das partículas em equinodermos não estão esclarecidos. Não é apenas a fagocitose que determina a taxa de limpeza do fluido celômico, mas também a existência de substâncias de defesa nele diluídas (Yui e Bayne 1983). Plytycz e Seljelid (1993) sugerem que a redução na quantidade de amebócitos da cavidade celômica invadida por bactérias seja devido a aglutinação, destruição ou remoção dos coágulos para outros órgãos e posterior eliminação. Muitos autores utilizando o método de injeção com leveduras tiveram respostas quanto a densidade de celomócitos no fluido celômico (Mangiaterra e Silva 2001; Borges et al. 2002; Coteur 2002; Borges et al. 2005).

Nas espécies *Echinus esculentus* e *Strongylocentrotus purpuratus* e *Strongylocentrotus droebachiensis*, após injeção de bactérias, houve queda na quantidade de celomócitos na cavidade celômica, o que pode estar associado à formação de coágulos (Messer e Wardlaw 1979; Yui e Bayne 1983; Plytycz e Seljelid 1993) ou à sua saída do fluido celômico (Johnson 1969). Bachmann e Goldschmid (1978) encontraram celomócitos preenchendo os canais da madreporita em *Sphaerechinus granularis*, sugerindo que essa estrutura sirva de via de saída de células inteiras para o exterior. A migração de celomócitos na membrana peristomial (Borges et al. 2005) pode ser interpretada como uma potencial via de saída dessas células para o meio externo assim como acontece na madreporita. Em trabalho com *E. lucunter* houve continuidade no aumento de amebócitos fagocíticos na membrana

peristomial (tecido lesionado) após duas semanas da injeção com *Saccharomyces cerevisiae* (Faria e Silva 2008).

Os celomócitos apresentam quimiotaxia e migram para locais infectados (Johnson 1969). Se a injeção de leveduras na cavidade celômica de *Echinometra lucunter* tivesse sido direta nos tecidos estudados, possivelmente por quimiotaxia os amebócitos fagocíticos migrariam para a limpeza. Ou ainda pode ser que a quantidade de leveduras injetada na cavidade celômica não tenha sido suficientemente irritante para o animal a ponto de provocar aumento na densidade de celomócitos nos tecidos. Após 24 horas da injeção de leveduras diretamente na membrana peristomial, houve migração de amebócitos da cavidade celômica e estes posteriormente apresentaram leveduras no interior (Mangiaterra e Silva 2001).

Neste trabalho a injeção dentro da cavidade celômica foi feita com o objetivo de verificar o destino dos celomócitos e também se a levedura seria carregada inteira para uma região de descarte. No entanto os celomócitos fagocíticos, celomócitos vermelhos e os celomócitos brancos podem ter combatido os invasores, destruindo-os (Höbaus 1978; Chia e Xing 1996; Lin et al. 2007; Faria e Silva 2008). Cabe reforçar que esta pesquisa foi realizada *in vivo* e buscou-se a presença, por migração, de celomócitos do fluido celômico entre as células de tecidos. E também que dos tecidos dois ficam em contato com a água do mar e fluidos internos e dois tecidos que ficam em contato com o fluido celômico. A literatura mostra que ocorre diversidade na dinâmica dos celomócitos quando a pesquisa é *in vivo* ou *in vitro*.

As atividades dos celomócitos são essenciais para a vida do animal, pois são responsáveis por fazer a limpeza do fluido celômico bem como de partes com injúria (Booolootian 1966). Muitas espécies de equinodermos que vivem em ambientes estuarinos e costeiros, impactados ou não, estão diretamente expostos a

microorganismos de diferentes naturezas. Como já descrito anteriormente, o sistema imune destes animais é baseado em células de defesa e fatores humorais do fluido celômico (Gross et al. 1999; Chia e Xing 1996; Smith 1981).

Os pés ambulacrais e pés branquiais apresentam o epitélio externo em contato com a água do mar e o interno em contato com os fluidos extracelulares, tecido conjuntivo e o neuro-muscular (Florey e Cahil 1977; Santos-Gouvea e Freire 2007). Entre as células que constituem os pés ambulacrais e pés branquiais ocorrem algumas células migratórias preenchidas com grânulos eletrondensos (Florey e Cahil 1977; Santos-Gouvea e Freire 2007). Raramente foram encontrados pequenos grânulos eletrondensos e vesículas, possivelmente de natureza lisossomal nas células epiteliais dos pés ambulacrais (Coleman 1969; Wood e Cavey 1981). Concordando com esses resultados, a menor intensidade de fluorescência apresentada pelos pés ambulacrais em *Echinometra lucunter* pode estar relacionada à sua baixa densidade de lisossomos. As células contendo grânulos nos tecidos dos pés branquiais podem estar envolvidas na degradação de material porque neste trabalho esse tecido apresentou maior intensidade de fluorescência do que os pés ambulacrais. O mesmo padrão de fluorescência apresentado pelo reto e pela glândula axial está de acordo com os resultados apresentados por Bachmann et al. (1980) que encontraram migração de células em processo de digestão da glândula axial para o intestino. E outros pesquisadores relataram que o tecido do intestino apresenta células com grânulos eletrondensos no citoplasma (Santos-Gouvea e Freire 2007). A glândula axial apresenta células livres tais como: a célula mórula, fagócitos, leucócitos e fibrócitos. O citoplasma dessas células está preenchido por vacúolos e grande variedade de grânulos lisossomais (Bachmann e Goldschmid 1978; Bachmann et al 1980; Canicatti et al. 1989; Eliseikina e Magarlamov 2002).

Corroborando com esses dados a glândula axial apresentou maior fluorescência quando comparada aos outros tecidos testados.

## **CONCLUSÕES**

Em conclusão, pela primeira vez ficou demonstrado que os pés ambulacrais, os pés branquiais, o reto e a glândula axial não são potenciais locais para o descarte de celomócitos carregados com levedura em *Echinometra lucunter*. Fato esse comprovado pela ausência de celomócitos com leveduras assim, como pela inalteração na densidade de celomócitos nos tecidos estudados. Os pés ambulacrais, os pés branquiais, o reto e a glândula axial são constituídos por tecidos que possuem atividade lisossômica. Essa atividade é maior na glândula axial quando comparada ao pé ambulacral. Essa inédita caracterização mostrou que dentre os tecidos verificados a glândula axial se sobrepõe na atividade de digestão intracelular e potencialmente estar relacionada com função excretora. Os vários trabalhos dos anos anteriores definiram de maneira pouco comprometida a presença dos lisossomos nos tecidos. Neste trabalho através da imunofluorescência conseguiu-se demonstrar a presença dessas organelas em alguns tecidos de ouriço do mar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arizza V, Giaramita FT, Parrinelo D, Cammarata M, Parrinelo N (2007) Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes. *Comp Biochem Physiol* 147A:389-394
- Bachmann S, Goldschmid A (1978) Fine structure of the axial complex of *Sphaerechinus granularis* (Lam.) (Echinodermata: Echinoidea). *Cell Tiss Res* 193:107-123
- Bachmann S, Pohla H, Goldschmid A (1980) Phagocytes in the axial complex of the sea urchin, *Sphaerechinus granularis* (Lam.). *Cell Tiss Res* 213:109-120
- Booolootian, RA (1966) *Physiology of Echinodermata*. Interscience, New York
- Borges JCS, Porto-Neto LR, Mangiaterra MBBCD, Jensch-Junior BE, Silva JRMC (2002) Phagocytosis in vitro and in vivo in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* at 0°C. *Polar Biol* 25:891-897
- Borges JCS, Jensch-Junior BE, Garrido PAG, Mangiaterra MBBCD, Silva JRMC (2005) Phagocytic amoebocyte sub populations in the perivisceral coelom of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816). *J Exp Zool* 303A:241-248
- Brauer AU, Nitsch R, Savaskan NE (2004) Identification of macrophage/microglia activation factor (MAF) associated with late endosomes/lysosomes in microglial cells *FEBS Letters* 563:41-48
- Canicatti C, D'Ancona G, Farina-Lipari E (1989) The coelomocytes of *Holothuria polii* (Echinodermata). I. Light and electron microscopy. *Boll Zool* 56:29-36
- Chia FS, Xing J (1996) Echinoderm coelomocytes a review. *Zool Stud* 35:231-254
- Cobb JLS, Sneddon E (1977) An ultra-structural study of gills of *Echinus esculentus*. *Cell Tiss Res* 182:265-274
- Coleman R (1969) Ultrastructure of the tube foot wall of a regular echinoid, *Diadema Antillarum* Philippi. *Z. Zellforsch* 96:162-172
- Coteur G, DeBeker G, Warnau M, Jangoux M, Dubois P (2002) Differentiation of immune cells challenged by bacteria in the common European starfish, *Asterias rubens* (Echinodermata). *Eur J Cell Biol* 81:413-418

D'Andrea-Winslow L, Novitski A K (2008) Active bleb formation is abated in *Lytechinus variegatus* red spherule coelomocytes after disruption of acto-myosin contractility. *Integrative Zoology* 3:115–122

Dolmatov IY, Ginanova TT (2009) Post-autotomy regeneration of respiratory trees in the holothurian *Apostichopus japonicus* (Holothuroidea, Aspidochirotida). *Cell Tissue Res* 336:41-58

Edds KT (1993) Cell biology of echinoid coelomocytes. *J Invert Pathol* 61:173-178

Eliseikina MG, Magarlamov TY (2002) Coelomocyte morphology in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). *Russ J Mar Biol* 28(3):197-202

Eskelinen EL (2006) Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspect Med* 27:495-502

Faria MT, Silva JRMC (2008) Innate immune response in the sea urchin *Echinometra lucunter* (Echinodermata). *J Inv Pathol* 98:58-62

Farmanfarmaian A (1968) The controversial echinoid heart and hemal system – function effectiveness in respiratory exchange. *Comp Biochem Physiol* 24:855-863

Florey E, Cahill MA (1977) Ultrastructure of sea urchin tube feet. *Cell Tiss Res* 177:195-214

Fukuda M (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem* 266: 21327-21330

Gross PS, Al-Sharif WZ, Clow LA, Smith LC (1999) Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Dev Comp Immunol* 23:429-442

Haug T, Kjuul AK, Styrvold OB, Sandsdalen E, Olsen OM, Stensvag K (2002) Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *J Invert Pathol* 81:92-102

Höbaus E (1978) Studies on phagocytes of regular sea urchins (Echinoidea, Echinodermata). 1. The occurrence of iron containing bodies within the nuclei of phagocytes. *Zool Anz* 200: 31-40

Holland ND, Guiselin MT (1970) A comparative study of gut mucous cells in thirty-seven species of the class Echinoidea (Echinodermata). *Biol Bull* 138:286-305

Hyman HL (1955) *The Invertebrates: Echinodermata Vol. IV* Mc Graw-Hill Book Company, New York

Johnson PT (1969) The coelomic elements of sea urchin (*Strongylocentrotus*) III. In vitro reaction to bacteria *J Invert Path* 13:42-62

Kaneshiro ES, Karp RD (1980) The ultrastructure of coelomocytes of the sea star *Dermasterias imbricate*. *Biol Bull* 159:295-310

Karp RD, Hildemann WH (1976) Specific allograft reactivity in the sea star *Dermasterias imbricata*. *Transplant* 22:434-439

Leclerc M, Brillouet C, Luquet G (1980) The starfish axial organ: An ancestral lymphoid organ. *Dev Comp Immunol* 4:605-615

Lee THD, Streb JW, Georger MA, and Miano JM (2006) Tissue Expression of the Novel Serine Carboxypeptidase Scep1. *J Hist Cytochem* 54(6):701 – 711

Lin W, Grant S, Beck G (2007) Generation of monoclonal antibodies to coelomocytes of the purple sea urchin *Arbacia punctulata*: Characterization and phenotyping. *Dev Comp Immunol* 31:465-475

Mangiaterra MBBCD, Silva JRMC (2001) Induced inflammatory process in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *J Invertebr Biol* 120:178-184

Matranga V, Toia G, Bonaventura R, Müller WEG (2000) Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. *Cell Stress & Chaperones* 5(2):113-120

McKenzie JD (1987) The ultrastructure of the tentacles of eleven species of *dendrochirote holothurians* studied with special reference to the surface coats and papillae. *Cell and Tissue Research* 248:187-199

Messer LI, Wardlaw AC (1979) Separation of the coelomocytes of *Echinus esculentus* by density gradient centrifugation. *Proceedings of the European Colloquium on Echinoderms/Brussels* 3-8

Millott N, Farmanfarmaian A (1967) Regeneration of the axial organ of *Arbacia punctulata* and its implications. *Nat* 216:1136-1138

Motokawa T (1982) Fine structure of the dermis of the body wall of sea cucumber, *Stichopus chloronotus*, a connective tissue which changes its mechanical properties. *Galaxea* 1:55-64

Natarajan R, Linstedt AD (2004) A Cycling *cis*-Golgi Protein Mediates Endosome-to-GolgiTraffic *Mol Biol Cell* 15:4798-4806

Pinsino A, Della Torre C, Sammarini C, Bonaventura R, Amato E, Matranga V (2008) Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Southern Adriatic Sea, Italy. *Cell Biol Toxicol* 24:541-552

Plytycz B, Seljelid R (1993) Bacterial clearance by the sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Dev Comp Immunol* 17:283-289

Rohrer J, Schweizer A, Russell D, Kornfeld S (1996) The Targeting of Lampl to Lysosomes Is Dependent on the Spacing of its Cytoplasmic Tail Tyrosine Sorting Motif Relative to the Membrane. *J Cell Biol* 132:565-576

Santos-Gouvea IA, Freire CA (2007) Effects of hypo-and-hypersaline seawater on the microanatomy and ultrastructure of epithelial tissues of *Echinometra lucunter* (Echinodermata:Echinoidea) of intertidal and subtidal populations. *Zool Stud* 46:203-215

Silva JRMS, Peck L (2000) Induced in vitro phagocytosis of the Antarctic starfish *Odonaster validus* (Koehler 1906) at 0°C. *Polar Biol* 23:225-230

Smith VJ (1981) The echinoderms. In: Ratcliffe,NA, Rowley AF, Eds. *Invertebrate blood cells*, vol 2. Academic Press London 513-565

Smith L C, Britten R J, Davidson E H (1995) Lipopolysaccharide Activates the Sea Urchin Immune System. *Dev Comp Immunol* 19:217-224

Smith LC, Rast JP, Brockton V, Terwilliger DP, Nair SV, Buckley KM, Majeskie AJ (2006) The sea urchin immune system. *ISJ* 3:25-39

Warnau M, Temara A, Ameye L, Jangoux M (1998) The excretory function of the posteriormost part of the echinoid and holothuroid gut (Echinodermata). *Comp Biochem Physiol* 120A:687-691

Warnau M, Jangoux M (1999) In vitro and in vivo investigations of the excretory function of the rectal caeca in the asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata). *Comp Biochem Physiol* 123A:263-267

Wood RL, Cavey MJ (1981) Ultrastructure of the coelomic lining podium of the starfish *Stylasterias forreri*. *Cell Tiss Res* 218:449-473

Yadavalli S, Nadimpalli SK (2008) Mannose-6-phosphate receptors (MPR 300 and 46) from the highly evolved invertebrate *Asterias rubens* (Echinodermate): biochemical and functional characterization of MPR 46 protein *Glycoconj J* 25:889–901

Yui MA, Bayne CJ (1983) Echinoderm immunology: Bacterial clearance by the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Biol Bull* 165:473-486

## CONCLUSÕES GERAIS

Houve diferença no comportamento osmo-iônico do fluido celômico entre as três espécies quando submetidas aos mesmos desafios. *Lytechinus variegatus* habita regiões submersas permanecendo em contato com a areia, foi a espécie que apresentou maior capacidade de sustentar gradientes entre o fluido celômico e a água do mar. *Echinometra lucunter* habita a porção mais “batida” do costão rochoso quando comparada as demais espécies pesquisadas, é a única que fica dentro de locas ou fendas e mostrou capacidade intermediária de sustentar gradientes iônicos. *Arbacia lixula* habita a porção do costão onde ocorre ação das ondas e não apresentou capacidade de manter a estabilidade nas concentrações osmo-iônicas do seu fluido. Não houve evidência de que o tamanho dos animais está diretamente relacionado à sua capacidade de sustentar gradientes iônicos. *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter* apresentaram diferença na concentração de potássio entre o fluido celômico e do intestino. Tecidos de estruturas externas e internas como: dos pés ambulacrais, dos pés branquiais, do reto e da glândula axial não são potencialmente locais de descarte de celomócitos contendo levedura *Saccharomyces cerevisiae* na espécie *Echinometra lucunter*. Fato este, mostrado pela ausência de celomócitos com leveduras bem como pela manutenção na densidade dos mesmos nos tecidos. Estes quatro tecidos possuem atividade lisossômica, a maior atividade foi apresentada pela glândula axial quando comparada ao pé ambulacral. Essa inédita caracterização mostrou que dentre os tecidos verificados, a glândula axial se sobrepõe na atividade de digestão intracelular e potencialmente esta relacionada com função excretora. Demonstrou-se a presença de lisossomos nos tecidos analisados em *E. lucunter* através da imunofluorescência.

**ANEXO**

Anexo 1

**Fixação para Histoquímica**

Tampão fosfato 0,2 molar pH 7,4 (solução estoque) 1000 ml.

	Fórmula química	P.M.	Quantidade para 1000 ml
Fosfato de Sódio Monobásico	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O = 137,99	7,7 g
Fosfato de Sódio Dibásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Anidro = 141,96	20,3 g

**Preparar 100 ml de formol 10% em PB 0,1 M pH 7,4**

Utilizar formol 36% e tampão fosfato 0,2 M pH 7,4

$$C1.v1 = c2.v2$$

$$0,36. v1 = 0,1 . 100 \text{ ml}$$

$$V1 = 27,77 \text{ ml de formol 36\%}$$

Acrescentar 50 ml de PB 0,2 M pH 7,4

Acrescentar 22,3 ml de água destilada ou deionizada.

**Preparar 100 ml de formol 0,5% em PBS 0,1 M pH 7,4**

Utilizar formol 36% e tampão fosfato 0,2 M pH 7,4

Acrescentar 68,1 ml de PBS 0,2 M

Acrescentar 1,4 ml de formol 36%

Acrescentar 30,4 ml de água destilada ou deionizada

## Anexo 2

**Detecção da Lamp-1**

Solução de PBS-EDTA (tampão fosfato) para 1 litro a 911 mOsm/kgH<sub>2</sub>O

	Fórmula química	P.M.	Quantidade para 1000 ml
Cloreto de Sódio	NaCl	58,44	23 g
Monofosfato de Sódio	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	141,96	3,63 g
Bifosfato de Potássio	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	174,18	0,35 g
Cloreto de Potássio	KCl	74,56	1,38 g
Acido Etilenodiaminotetracético	EDTA	426,76	2 g

Solução de PBS com azida sódica (10 mg/l) para 100 ml.

	Fórmula química	P.M.	Quantidade para 100 ml
Azida Sódica	NaN <sub>3</sub>	65,01	1mg