

IVONETE APARECIDA DOS SANTOS-GOUVEA

ULTRA-ESTRUTURA DE EPITÉLIOS DO OURIÇO-DO-MAR
***Echinometra lucunter* (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA) EM**
DIFERENTES SALINIDADES: EVIDÊNCIA MORFOLÓGICA DE
REGULAÇÃO IÔNICA E/OU FUNÇÃO EXCRETORA?

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, Programa de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Arruda
de Oliveira Freire

CURITIBA

2003

IVONETE APARECIDA DOS SANTOS-GOUVEA

**ULTRA-ESTRUTURA DE EPITÉLIOS DO OURIÇO-DO-MAR
Echinometra lucunter (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA) EM
DIFERENTES SALINIDADES: EVIDÊNCIA MORFOLÓGICA DE
REGULAÇÃO IÔNICA E/OU FUNÇÃO EXCRETORA?**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, Programa de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Arruda
de Oliveira Freire

CURITIBA

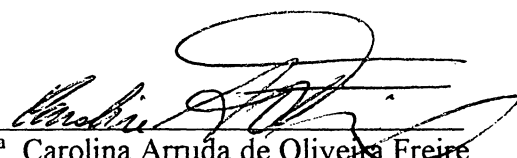
2003

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

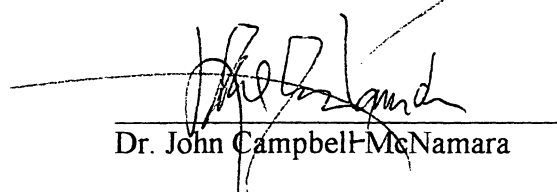
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

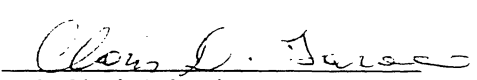
A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “**ULTRA-ESTRUTURA DE EPITÉLIOS DO OURIÇO-DO-MAR *Echinometra lucunter* (ECHINODERMATA: ECHINOIDEAS) EM DIFERENTES SALINIDADES: EVIDÊNCIA MORFOLÓGICA DE REGULAÇÃO IÔNICA E/OU FUNÇÃO EXCRETORA?**”, de autoria da pós-graduanda **Ivonete Aparecida dos Santos-Gouvea**, com a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dr^a. Carolina Arruda de Oliveira Freire (Orientadora e Presidente do Departamento de Fisiologia da UFPR), Dr. John Campbell McNamara (FFCLRP-USP, Ribeirão Preto) e Dr^a. Cloris Ditzel Faraco (Departamento de Biologia Celular– UFPR). Segundo a avaliação da Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado, a candidata foi: **APROVADA**. Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 02 de julho de 2003.



Dr^a. Carolina Arruda de Oliveira Freire



Dr. John Campbell McNamara



Dr^a. Cloris Ditzel Faraco

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 O ambiente aquático	01
1.2 Regulação osmótica e iônica	01
1.3 Equinodermos	03
1.4 Classe equinoidea: ouriços-do-mar e bolachas-da-praia	10
1.5 Efeito dos íons sobre a fisiologia dos equinodermos e evidência de regulação iônica.....	12
2 OBJETIVOS.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Coleta e aclimação dos ouriços-do-mar	16
3.2 Ultra-estrutura dos tecidos	19
4 RESULTADOS	22
4.1 Microanatomia e ultra-estrutura dos pés branquiais de <i>Echinometra lucunter</i>	22
4.2 Microanatomia e ultra-estrutura dos pés ambulacrais de <i>Echinometra lucunter</i>	24
4.3 Microanatomia e ultra-estrutura da parede celômica (ampolas) de <i>Echinometra lucunter</i>	26
4.4 Microanatomia e ultra-estrutura do reto de <i>Echinometra lucunter</i>	28
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha saúde, da minha família e da minha orientadora.

À professora Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire pela orientação, confiança e imensa contribuição ao meu crescimento científico e pessoal.

Aos amigos do LFCO: Denilton, Viviane, Alessandra, Maristela, Valéria, Vitor e Clarice pela ajuda e pelos momentos de descontração na cantina.

Novamente ao Denilton pelas coletas e pelos trabalhos realizados em paralelo ao mestrado.

Ao Prof^o. Dr. Paulo Zannin e seu aluno Fabiano pela ajuda na digitalização das figuras deste trabalho.

Às amigas Narali, Thaís Pacheco e Anna Raquel.

À todos os colegas da turma de 2001, em especial à Inês Rabitto, Fabiana, Renata, Fabíola e Rogério pelas ajudas nos momentos de sufoco.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular Cloris Faraco, Sílvio Veiga e Márcia Mendonça pela confiança, permitindo minha entrada no mestrado.

Novamente à prof^a Cloris Faraco e ao prof^o. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro pelas dicas preciosas.

À secretária da Coordenação Marlene B. Camargo pelo pronto atendimento.

Ao meu marido Antônio de Gouvea pelo amor, amizade, confiança, crédito e estímulos.

À minha mãe e à tia Zulmira pelas palavras de conforto e orações.

À minha irmã Meire pelo bom humor e convites para sair, raramente atendidos e aos meus irmãos Leandro e Wellington.

Aos meus cunhados Alfredo e Lúcia Gouvea pelas trocas de idéias e à minha sogra Angelina *in memoriam*.

À CAPES pelos 06 meses de bolsa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Echinometra lucunter</i> . A. face aboral de uma carapaça sem espinhos. B. face oral. C. detalhe de uma pedicelária. Retirada de Ribeiro-Costa e Rocha (2002)...	04
Figura 2- Corte longitudinal esquemático de um ouriço-do-mar mostrando o sistema vascular aquífero. Retirada de Kükenthal <i>et al.</i> (1986).....	06
Figura 3- Estrutura interna do ouriço-do-mar regular, <i>Arbacia</i> (vista lateral). 1) ânus, 2) madreporita, 3) gonoporo, 4) canal pétreo, 5) glândula axial, 6) canal radial, 7) gônada, 8) sifão, 9) placa da carapaça, 10) carapaça, 11) lanterna de Aristóteles, 12) ceco, 13) membrana peristomial, 14) faringe, 15) boca, 16) anel nervoso, 17) nervo radial, 18) sifão, 19) estômago, 20) intestino, 21) canal anelar, 22) corpos de Tiedmann, 23) canal radial, 24) ampolas, 25) esôfago. Retirada de Barnes e Olive (1995).....	07
Figura 4- Exemplares do ouriço <i>Echinometra lucunter</i> mostrando a diferença entre os espinhos curtos e mais rombudos de um animal da região de entre marés (direita) e espinhos mais longos e pontiagudos de um animal de sublitoral (esquerda)..	16
Figura 5- Costão rochoso: Balneário da Penha região de coleta dos animais de entre marés.....	17
Figura 6- Ilha da Galheta: região de coleta dos animais de sublitoral.	17
Figura 7- Disposição dos aquários experimentais no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação.	18
Figura 8- Esquema dos tecidos em relação aos fluidos de contato. A) Pé branquial: AM (água do mar) e FSPF (fluido do sistema perifaríngeo), B) Pé ambulacral: AM (água do mar) e FSA (fluido do sistema ambulacral), C) Parede celômica: FCP (fluido celômico perivisceral) e FSA (fluido do sistema ambulacral), D) Reto: FCP (fluido celômico perivisceral) e FI (fluido intestinal), traços curtos: microvilos, traços longos:	21
Figura 9- Fotomicrografias dos pés branquiais de <i>E. lucunter</i> . Animais controles (35‰) e experimentais (25‰ e 45‰) das regiões de marés e de sublitoral.....	33
Figura 10- Elétron-micrografias dos pés branquiais de <i>E. lucunter</i> região do epitélio externo com microvilos. Animais controles (35‰) e experimentais (25‰ e 45‰) das regiões de marés e de sublitoral.	35
Figura 11- Elétron-micrografias dos pés branquiais de <i>E. lucunter</i> região do epitélio ciliado interno. Animais controles (35‰) e experimentais (25‰ e 45‰) das regiões de marés e de sublitoral.	37
Figura 12- Fotomicrografias dos pés ambulacrais de <i>E. lucunter</i> . Animais controles (35‰) e experimentais (25‰ e 45‰) das regiões de marés e de sublitoral.....	39
Figura 13- Elétron-micrografias dos pés ambulacrais de <i>E. lucunter</i> região do epitélio externo com microvilos. Animais controles (35‰) e experimentais (25‰ e 45‰) das regiões de marés e de sublitoral.	41

Figura 14- Elétron-micrografias dos pés ambulacrais de <i>E. lucunter</i> região do epitélio ciliado interno. Animais controles (35‰) e experimentais (25‰ e 45‰) das regiões de marés e de sublitoral.	43
Figura 15- Fotomicrografias da parede celômica de <i>E. lucunter</i> . Animais controles (35‰) e experimentais (25‰ e 45‰) das regiões de marés e de sublitoral.	45
Figura 16- Elétron-micrografias da parede celômica de <i>E. lucunter</i> . Animais controles (35‰) e experimentais (25‰ e 45‰) das regiões de marés e de sublitoral.	47
Figura 17- Fotomicrografias do reto de <i>E. lucunter</i> . Animais controles (35‰) e experimentais (25‰ e 45‰) das regiões de marés e de sublitoral.	49
Figura 18- Elétron-micrografias do reto de <i>E. lucunter</i> . Região de epitélio luminal dos animais controles (35‰) e experimentais (25‰ e 45‰) das regiões de marés e de sublitoral.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista das diferenças encontradas em relação aos controles (35‰).....	31
--	----

RESUMO

Os equinodermos são invertebrados exclusivamente marinhos. osmoconformadores e estenohalinos. Entretanto, seus fluidos corporais não apresentam exatamente a mesma composição da água do mar, e algumas espécies de ouriços-do-mar são capazes de manter gradientes para determinados íons. Estudaram-se comparativamente duas populações distintas do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*: uma população de zona de marés (sujeita à variações de salinidade) e uma população de sublitoral (ambiente estável). Ambas foram submetidas por 5 dias à diluição da água do mar (25‰) e por 40 horas à concentração da água do mar (45‰), e foram comparadas com a condição controle mantida em água do mar 35‰. Em cada população investigaram-se 2 tecidos que ficam em contato direto com a água do mar (pés branquiais e pés ambulacrais), e 2 tecidos internos (parede celômica - ampolas do sistema ambulacral e reto), através do protocolo padrão de estudo por microscopia eletrônica de transmissão. Todos os animais das duas populações sobreviveram à diluição da água do mar. Contudo, a água do mar concentrada causou mortalidade no tempo de 48 horas. No seu ambiente natural é mais provável que estes animais enfrentem situações de diluição da água do mar e não sua concentração, principalmente os de entre marés. Entre as duas populações os animais de entre marés apresentaram-se mais tolerantes ao estresse salino, sugerindo que esta população tenha desenvolvido mecanismos morfológicos e/ou fisiológicos diferenciados para lidar com estas variações. Apesar da alta permeabilidade geral esperada para estes invertebrados marinhos osmoconformadores, os tecidos internos nas duas populações apresentaram-se mais preservados do que os externos. Os tecidos dos pés branquiais e dos pés ambulacrais apresentaram microvilos no epitélio que fica em contato com a água do mar e cílios no epitélio voltado para os fluidos internos. A parede celômica (ampolas do sistema ambulacral) apresentou apenas cílios, nos seus dois epitélios, e o reto apresentou apenas microvilos no epitélio luminal. Dos quatro tecidos apenas o reto apresentou estrutura compatível com transporte ativo, com numerosas mitocôndrias no

citoplasma. A exposição à redução ou aumento da salinidade não resultou em alterações ultra-estruturais nos tecidos estudados, indicativas de algum mecanismo do transporte de sal, que resultaria em regulação osmótica. Foi percebida apenas a gravidade do efeito da saída osmótica de água quando os ouriços foram expostos a água do mar concentrada. Ficou evidente a maior capacidade de regular volume celular diante da entrada osmótica de água.

ABSTRACT

Two populations of the sea urchin *Echinometra lucunter* have been studied: one from the ecologically challenging intertidal environment, and one from the stable subtidal environment. Urchins from both populations were submitted for 5 days to sea water dilution (25 ‰), or for 40 hours to sea water concentration (45 ‰), being compared to control urchins kept in control 35 ‰ sea water. Two external tissues, bathed by sea water - peristomial gills and ambulacral feet, and two internal tissues - ambulacral system ampullae and intestinal rectum - were investigated, in the 3 salinities, through standard transmission electron microscopy protocols. All urchins from both populations survived well to sea water dilution. However, hypersaline sea water caused mortality already after 48 hours. Intertidal urchins were more tolerant of salinity stress, displaying less tissue damage than subtidal urchins, a possible indication of physiological difference between both populations. Despite the high general permeabilities expected for echinoderm tissues, internal tissues were better preserved than external tissues, in both populations. Of all 4 tissues, only the intestinal rectum presented ultrastructure compatible with active transepithelial transport, with numerous mitochondria. The only alteration detected from the exposure to salinity stress was the damage caused by osmotic water efflux when urchins were exposed to concentrated sea water. A higher capacity to regulate cell volume when submitted to osmotic water influx was perceived, coherent with the more frequent sea water dilution than concentration in marine habitats.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ambiente aquático

A água dos ambientes aquáticos contém substâncias dissolvidas: sais inorgânicos, compostos orgânicos e gases. Além da temperatura da água, esses são os fatores abióticos de maior importância fisiológica. A água do mar contém 3,5% de sal (35‰ ou 35g. kg⁻¹ ou 35 ppt de salinidade), isto é, 1 litro de água contém 35 g de sal; os principais íons inorgânicos são o sódio e o cloreto, com magnésio, enxofre e cálcio presentes em grandes quantidades. O ambiente marinho oceânico é bastante estável, com a salinidade relativamente constante. A água do mar oceânica (35‰) contém principalmente sódio (470 mM) e cloreto (550 mM), junto com outros íons como o magnésio (54 mM) e o sulfato (28,25 mM), atingindo aproximadamente 1050 mOsm/kgH₂O⁻¹ de osmolalidade. Em regiões litorâneas o conteúdo de sal é frequentemente mais baixo do que no oceano, por aporte de água doce do continente ou influência das chuvas em profundidades menores (Schmidt-Nielsen, 1996).

A água salobra (marinha diluída com água doce) ocorre em regiões litorâneas, especialmente em estuários de rios. Nestas áreas, a salinidade não somente é menor do que a da água do mar oceânica, como também flutua amplamente durante o dia com os ciclos de maré. A água salobra corresponde de forma geral a uma salinidade entre 0,5‰ e 30‰ (Schmidt-Nielsen, 1996). A água doce dos rios e lagos apresenta um conteúdo de solutos baixo e bastante variável. Uma quantidade pequena de sal está presente na água da chuva, e sua composição é alterada e aumentada à medida que a chuva drena rochas de dureza e porosidade variável. O conteúdo total de sais na água doce pode variar de forma geral de 0,1 a 10 mM (Schmidt-Nielsen, 1996).

1.2 Regulação osmótica e iônica

Os líquidos corporais dos animais são soluções salinas diluídas, com o cloreto de sódio como sal predominante, assim como na água do mar. Isto reflete a origem da

vida no mar, entretanto existem diferenças apreciáveis entre os líquidos corporais e a água do mar (Aires, 1991). Invertebrados que vivem no ambiente marinho em geral não regulam significativamente a composição interna de seus líquidos corporais. A regulação é intensificada em meios aquáticos mais diluídos, estuários de rios e lagos de água doce, onde os habitantes enfrentam um ambiente de salinidade flutuante ou salinidade muito baixa (Ruppert e Barnes, 1996).

Alguns animais aquáticos toleram variações na concentração salina da água na qual vivem, são ditos eurihalinos (do Grego, eury = amplo; halos = sal). Os animais que toleram limitadas variações na concentração do meio são ditos estenohalinos (do Grego stenos = próximo). O animal que mantém estável ou regula a concentração osmótica do seu líquido extracelular apesar das alterações na concentração externa, é denominado osmorregulador. Quando a concentração dos líquidos internos do animal varia acompanhando a variação na concentração do meio, o animal é dito osmoconformador. Animais que possuem fluidos corpóreos osmoticamente mais concentrados que o meio são hiperosmóticos. Aqueles que possuem fluidos corpóreos mais diluídos são hiposmóticos ao meio. Regulações e conformações se aplicam também aos íons; na maioria das vezes os invertebrados marinhos são osmoconformadores, porém regulam íons específicos. Tais diferenças nas concentrações de íons específicos em relação à água do mar podem ser mantidas se a superfície do corpo for relativamente impermeável, ou tiver "permeabilidade controlada" ao íon em questão, sugerindo mecanismos de transporte para este íon. Portanto, os animais que realizam regulação iônica teriam mecanismos para a eliminação e/ou absorção de alguns íons (Schmidt-Nielsen, 1996).

As concentrações de íons no interior das células são diferentes do meio extracelular ou meio interno do animal. Por exemplo, as concentrações de sódio e cloreto são baixas no meio intracelular e altas no extracelular, o potássio e o magnésio (total, livre e ligado) encontram-se elevados no interior e baixos no exterior da célula. Entretanto, as células são sempre isosmóticas em relação aos fluidos teciduais

circundantes e ao sangue (Schmidt-Nielsen, 1996). O volume do fluido extracelular e a concentração de solutos num organismo precisam ser mantidos pelo menos dentro de uma faixa estreita de variação para um melhor funcionamento deste, e para evitar grandes fluxos osmóticos de água para dentro ou para fora das células (Aires, 1991).

Os equinodermos, por exemplo, possuem os líquidos corporais numa concentração osmótica estável e quase igual à do ambiente onde vivem, que é a água do mar. Contudo, seus fluidos corporais não mostram exatamente a mesma composição de solutos da água mar, por causa dos solutos orgânicos (Schmidt-Nielsen, 1996), o que sugere que eles sejam osmoconformadores, porém íon-reguladores (Robertson, 1949; Binyon, 1962; Prusch, 1977; Diehl, 1986; Bishop *et al.*, 1994; Vidolin, 2000). Sua capacidade de regular íons, contudo, não está ainda claramente demonstrada na literatura.

1.3 Equinodermos

No Filo Echinodermata todos os representantes são marinhos, considerados osmoconformadores, estenohalinos e possuem características que os distinguem dos outros filos: 1) a simetria radial pentâmera, 2) o sistema vascular aquífero, 3) o endoesqueleto subepidérmico e 4) o tecido conjuntivo mutável (Hyman, 1955; Ribeiro-Costa e Rocha, 2002).

Os equinodermos são gonocóricos; com sexos separados, mas sem dimorfismo sexual externo aparente (Hyman, 1955; Cavey e Märkel, 1994). Contudo, são conhecidas algumas espécies hermafroditas. Estes invertebrados apresentam tratos reprodutivos simplificados e intimamente associados com os derivados do celoma. As gônadas estão localizadas dentro do seio genital, destas saem os gonodutos, que são presos pelo mesentério. Os gonodutos se dirigem ao gonoporo, por onde os gametas são externalizados. Não há cópula e a fertilização é externa, com o encontro dos gametas ocorrendo na água circundante (Storer *et al.*, 1991) (Fig. 1).

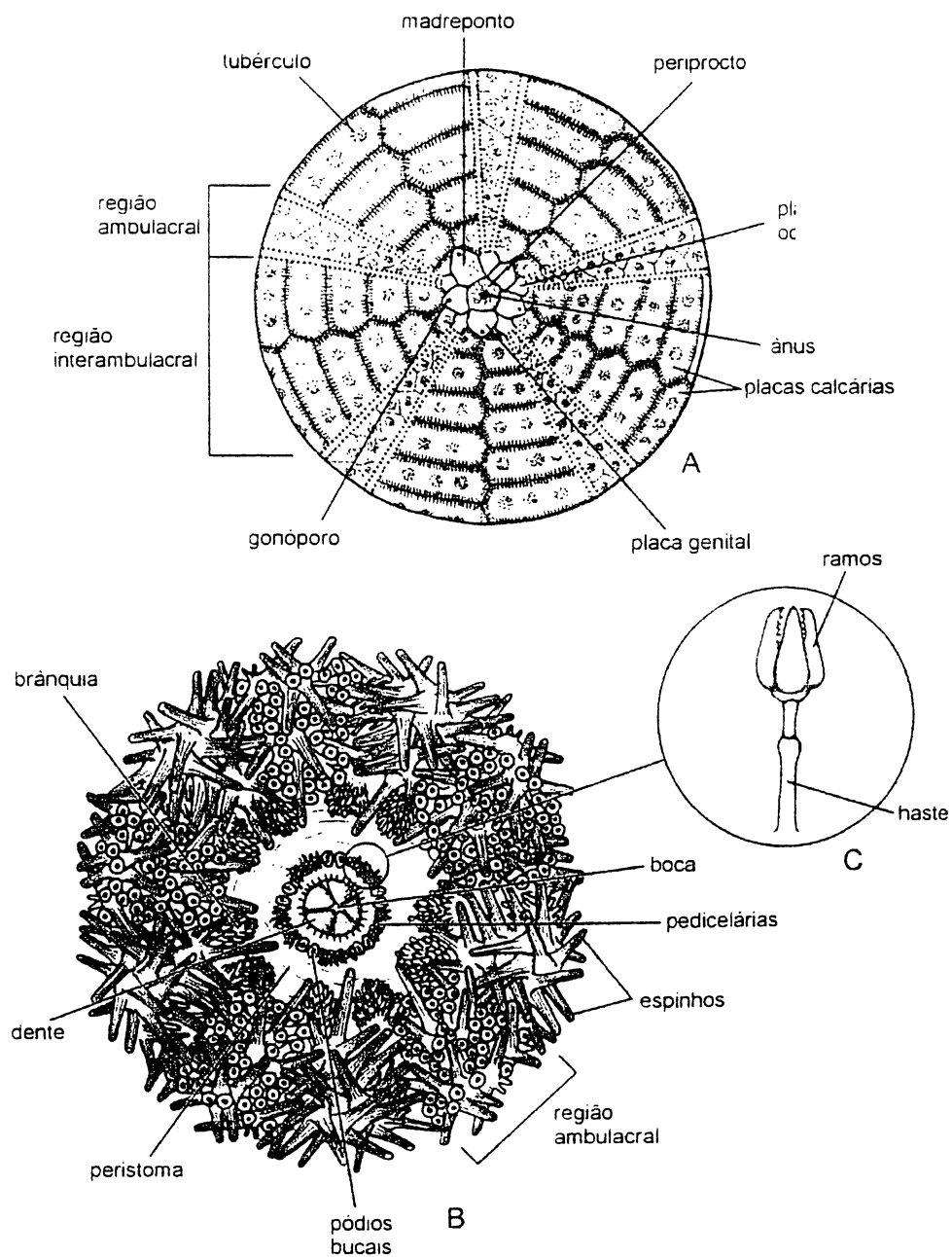


Figura 1 – *Echinometra lucunter*. A. face aboral de uma carapaça sem espinhos. B. face oral. C. detalhe de uma pedicelária. Retirada de Ribeiro-Costa e Rocha (2002).

Estes invertebrados apresentam desenvolvimento indireto, possuem ovos com pouco vitelo. No estágio larval apresentam simetria bilateral, com comportamento pelágico planctônico. As larvas de equinodermos são nomeadas de acordo com a classe à qual pertencem; as larvas ditas braquiolárias são de asteróides (estrelas-do-mar), as equinoplúteos são de equinóides (ouriços-do-mar e bolachas-da-praia), as ofioplúteos são de ofiuróides (serpentes-do-mar), as auriculárias são de holoturóides (pepinos-do-mar) e as doliolárias são de crinóides (lírios-do-mar) (Brusca e Brusca, 1990; Cavey e Märkel, 1994; Barnes e Olive, 1995; Ruppert e Barnes, 1996).

A sua simetria radial pentâmera é derivada secundariamente. Na metamorfose ocorrem alterações nas posições de todos os órgãos, com perda das estruturas juvenis e é quando o animal assume o comportamento bentônico, passando a habitar tanto zonas de maré bem como trechos oceânicos profundos podendo ocupar substratos arenosos assim como consolidados (Hyman, 1955; Leake, 1975; Lawrence, 1987; Villee *et al.*, 1988; Brusca e Brusca, 1990; Cavey e Märkel, 1994; Ruppert e Barnes, 1996).

O sistema vascular aquífero consiste de uma interconexão de tubos que fica acomodado no grande celoma, se comunicando com o exterior através da madreporita. A madreporita é uma placa perfurada revestida por uma epiderme ciliada, localizada na superfície aboral nas estrelas, ouriços, bolachas (Ferguson, 1996) e localizada internamente em pepinos (Ribeiro-Costa e Rocha, 2002). Esta estrutura possibilita a entrada da água do mar no corpo do animal. O fluido do sistema vascular aquífero apresenta composição parecida com a água do mar, porém apresenta vários celomócitos, proteínas e alta concentração de íons potássio (Prusch, 1977; Brusca e Brusca, 1990; Cavey e Märkel, 1994; Barnes e Olive, 1995). Da madreporita parte um tubo revestido com tecido ciliado (Bachmann e Goldschmid, 1978) e com deposições calcárias chamado canal pétreo, que por sua vez liga-se ao canal anelar (Fig. 2).

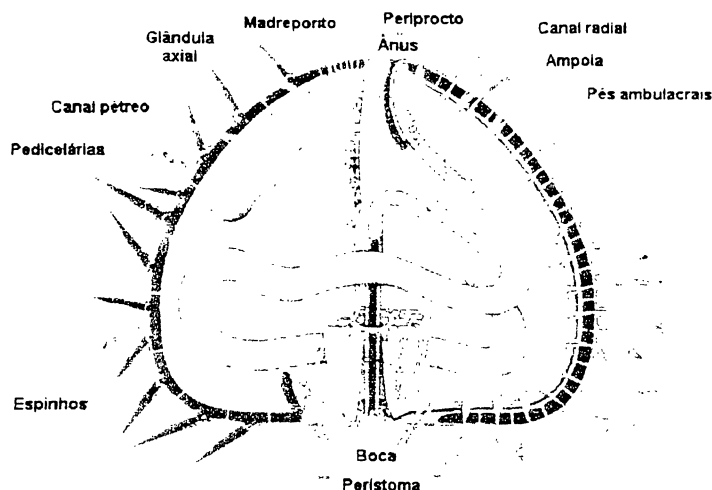


Figura 2 – Corte longitudinal esquemático de um ouriço-do-mar mostrando o sistema vascular aquífero. Retirada de Kükenenthal *et al.* (1986).

No canal anelar estão as vesículas de Poli e os corpos de Tiedemann, que ajudam na regulação da pressão interna do sistema vascular aquífero e na produção de celomócitos, respectivamente (Cavey e Märkel, 1994). O canal anelar conecta-se com os canais radiais que estão distribuídos internamente nos ambulacros e estes possuem os canais laterais que se ligam às ampolas (parede celômica), de onde saem os pés tubulares ambulacrais para serem externalizados do corpo do animal. A operação dos pés ambulacrais depende da regulação da pressão hidráulica do fluido do sistema e da ação individual dos músculos da ampola (Brusca e Brusca, 1990). A madreporita, o canal pétreo, o canal anelar, as vesículas musculares de Poli e o canal radial fazem a manutenção do volume de água apropriado para a operação dos pés (Figs 2 e 3). O sistema vascular aquífero se comunica com outro componente do celoma, o sistema hemal, que é uma complexa rede de canais e espaços dispostos nos seios perihemais. Este sistema caminha paralelamente ao sistema vascular aquífero e possui um anel hemal oral e outro aboral. Estes dois anéis são unidos pelo seio axial, onde está o canal pétreo (Brusca e Brusca, 1990). O canal pétreo, por sua vez, é envolto pelo órgão axial ou glândula axial; um tecido esponjoso, alongado, de coloração escura e que recebe

vários nomes na literatura; “rim”, glândula ovóide, glândula marrom. Há inclusive indícios de que pode estar envolvido com processos de ultrafiltração, com a presença de podócitos (Hyman, 1955; Millott, 1966; Millott e Farmanfarmanian, 1967; Welsch e Rehkämper, 1987; Warnau e Jangoux, 1991; Cavey e Märkel, 1994) (Figs 2 e 3).

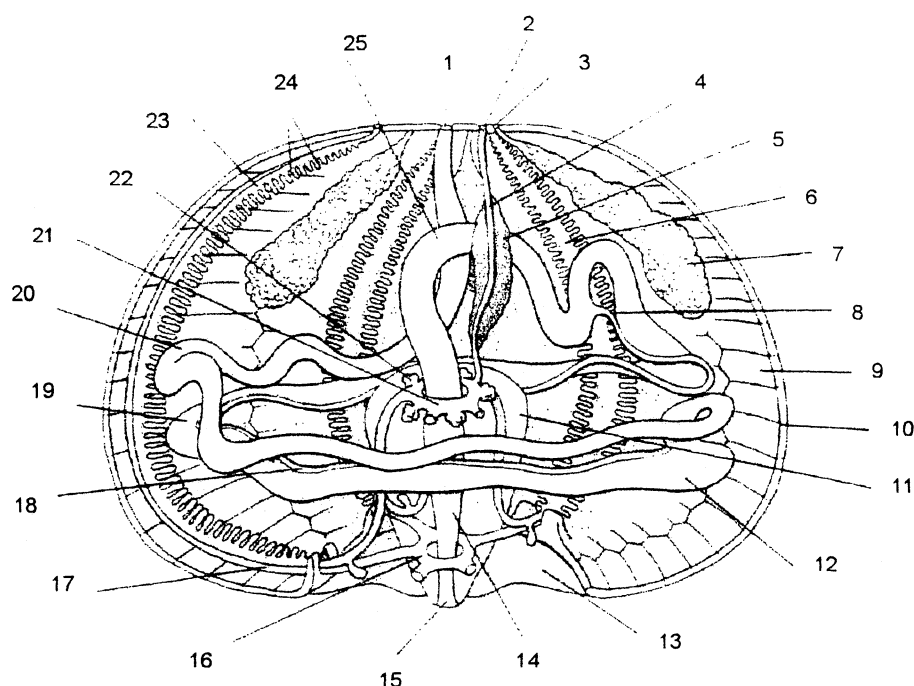


Figura 3 - Estrutura interna do ouriço-do-mar regular, *Arbacia* (vista lateral). 1) ânus, 2) madreporita, 3) gonoporo, 4) canal pétreo, 5) glândula axial, 6) canal radial, 7) gônada, 8) sifão, 9) placa da carapaça, 10) carapaça, 11) lanterna de Aristóteles, 12) ceco, 13) membrana peristomial, 14) faringe, 15) boca, 16) anel nervoso, 17) nervo radial, 18) sifão, 19) estômago, 20) intestino, 21) canal anelar, 22) corpos de Tiedmann, 23) canal radial, 24) ampolas, 25) esôfago. Retirada de Barnes e Olive (1995).

Outra característica própria destes invertebrados marinhos é o endoesqueleto subepidérmico de carbonato de Ca^{++} (calcita) que compreende uma série de ossículos produzidos pela mesoderme (Cavey e Märkel, 1994; Barnes e Olive, 1995) (Fig. 1). Estes ossículos podem fundir-se e formar placas perfuradas. Cada placa é formada como um simples cristal de calcita formando uma rede aberta que é preenchida com tecido, o estroma (Brusca e Brusca, 1990). 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).

Estes invertebrados marinhos possuem um tecido conjuntivo mutável, significando que eles podem alterar voluntariamente a plasticidade do tecido conjuntivo com rapidez. Os ouriços-do-mar, por exemplo, ondulam seus espinhos e quando entram em fendas de rochas para proteger-se, elevam-nos, fixando-se à rocha. Isto ocorre porque os ligamentos flexíveis do tecido conjuntivo mutável na base de cada espinho se polimerizam e enrijecem, em geral pela concentração iônica de cálcio. Já os pepinos-do-mar moldam seus corpos de acordo com o local em que estão alojados; sob as rochas ou enterrados na areia. Um aumento na concentração de Ca^{++} enrijece o tecido conjuntivo mutável pela formação de pontes cruzadas entre as macromoléculas da matriz extracelular. A matriz extracelular tem seu estado controlado por dois tipos de nervos; um que enrijece e um que a amolece (Ruppert e Barnes, 1996).

Nos equinodermos o trato digestivo está ancorado no grande celoma formando um tubo pouco enrolado que começa com a boca na região oral, indo até o ânus (Figs 1 e 3) que fica na região aboral. Todo sistema digestivo é composto pela boca, esôfago, estômago, ceco, intestino, reto e ânus (Fig.3). Após a ingestão e a passagem pelo estômago, no intestino termina a digestão extracelular e ocorre a absorção do alimento (Ruppert e Barnes, 1996).

O tipo de alimento e a forma de adquiri-los são bastante variados nestes invertebrados marinhos. As estrelas-do-mar evertem o estômago sobre a presa, são

predadoras de outros invertebrados como ouriços, moluscos, pólipos de corais, de matéria orgânica em suspensão e também se alimentam de animais mortos; os ouriços-do-mar são herbívoros, comedores de material em suspensão e detritos, com poucas espécies predadoras. Os ouriços apresentam hábitos escavadores, se alimentando de algas que crescem sobre as rochas; as bolachas-da-praia se enterram no sedimento alimentando-se de partículas orgânicas misturadas ao sedimento, e algumas espécies capturam micro-crustáceos; as serpentes-do-mar são predadoras, comedoras de restos depositados ou matéria orgânica em suspensão; os pepinos-do-mar são comedores de materiais particulados em suspensão ou depositados. Também podem comer plâncton, se utilizando dos tentáculos para levar o alimento até a boca. Os lírios-do-mar são comedores de material orgânico em suspensão e se utilizam as pínulas para adquiri-lo (Brusca e Brusca, 1990; Ruppert e Barnes, 1996).

Os equinodermos não possuem um órgão excretor aparente (Hyman, 1955), e a amônia atravessa a superfície do corpo, representando a forma essencial de eliminação de compostos nitrogenados, como é típico de invertebrados aquáticos (Schmidt-Nielsen, 1996). Este tipo de excreção ocorre nos pés ambulacrais e nas pápulas de asteróides bem como nas árvores respiratórias das holotúrias (Brusca e Brusca, 1990).

A forma de excreção nos equinodermos das classes Asteroidea; *Asterias rubens*, Echinoidea; *Echinocardium cordatum* e Holothuroidea; *Holothuria tubulosa* ocorre 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 destes 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, 1990).

Apesar da situação pouco clara da excreção e mais ainda da regulação osmótica nestes animais, algumas espécies de equinodermos são encontradas habitando áreas com flutuações de salinidade como as zonas de marés (McPherson, 1969). Estas alterações de salinidade podem interferir na locomoção, alimentação, metabolismo, taxa de crescimento, reprodução e desenvolvimento destes animais (Diehl, 1986). Os ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* (L., 1758), por exemplo, apresentam uma ampla distribuição em toda a costa brasileira, com populações que ocupam regiões de costões, onde ocorrem variações ambientais devido aos ciclos de marés, bem como populações que ocupam regiões continuamente submersas, ambientes mais estáveis (Castro *et al.*, 1995; Sánchez-Jérez *et al.*, 2001). Esta espécie de ouriço pode ser encontrada desde o médio litoral inferior até o infralitoral, chegando à profundidade de 45 m (Hendler, 1995), distribuindo-se ao longo da costa dos Estados Unidos para o sul através do Caribe, América Central e Brasil, ocorrendo também no oeste da África.

1.4 Classe Echinoidea: ouriços-do-mar e bolachas-da-praia

A classe Echinoidea é composta atualmente por aproximadamente 900 espécies divididas em 2 sub-classes: Cidaroidea e Euechinoidea. A sub-classe Euechinoidea inclui os equinóides irregulares achatados (bolachas-da-praia) com 6 ordens, e os equinóides regulares globosos (ouriços-do-mar) com 8 ordens (Hendler, 1995).

Os equinóides apresentam uma variedade de formas e tamanhos, não possuem 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 carapaça é composta por 20 colunas de placas, com 5 pares de placas perfuradas para saída dos pés ambulacrais formando o ambulacro e 5 pares de placas não perfuradas compondo interambulacro sem pés ambulacrais, porém ornamentadas com tubérculos e botões onde ancoram-se os espinhos (Hyman, 1955; Cavey e Märkel, 1994) (Fig 1). Os espinhos são conectados nos tubérculos da carapaça pelo “catch apparatus” que consiste de uma bainha cilíndrica de tecido de colágeno que rodeia sua

base (Hidaka, 1983), e uma camada de tecido muscular que atua na movimentação dos espinhos (Hendler, 1995). Os espinhos são classificados como primários (grandes) e secundários (pequenos). Existem também as pedicelárias, que são espinhos modificados em pinças utilizadas na remoção de detritos que se acumulam no corpo do animal (Hyman, 1955) (Figs 1 e 2).

O corpo dos equinóides é dividido em região oral que fica em contato com o substrato, apresenta a boca que é denteada (Cavey e Märkel, 1994) e circundada por um tecido flexível que conecta a carapaça ao aparato mastigatório, a membrana peristomial. A membrana peristomial que consiste de 3 subcamadas de fibras diferentes e cruzadas de colágeno (Wilkie *et al.*, 1994), apresenta 5 pares de curtos pés ambulacrais fortes modificados que levam o alimento até a boca. 5 pares de pés modificados em brânquias (pés branquiais) que atuam possivelmente na troca de gases e na excreção (Cobb e Sneddon, 1977; Cavey e Märkel, 1994; Ribeiro-Costa e Rocha, 2002) além de espinhos pequenos e pedicelárias (Brusca e Brusca, 1990; Ruppert e Barnes, 1996) (Figs 1 e 2). Os pés branquiais apresentam formato dendriforme (arborescente) com a abertura luminal voltada para o interior da cavidade celômica, em torno da lanterna de Aristóteles; o fluido que circula nesta região é o perifaríngeo (Cavey e Märkel, 1994) (Fig 1). A região interna da carapaça dos ouriços apresenta um espaçoso celoma onde estão dispostos seus órgãos, ocupado principalmente pelas gônadas e pelo intestino (Hyman, 1955).

O sistema digestivo de ouriços-do-mar começa com a cavidade bucal que possui um aparelho raspador/triturador, composto por dentes e um conjunto de músculos, chamado “lanterna de Aristóteles”, utilizada para raspar algas de substratos duros (Fig. 1). Da cavidade bucal sobe o esôfago que se junta ao estômago, nesta junção está presente um ceco. A partir do estômago inicia-se o intestino que por sua vez sobe para juntar-se ao reto que se esvazia através do ânus (Barnes e Olive, 1995) (Fig. 3).

Estes invertebrados apresentam reprodução sexuada e dispõem de cinco gônadas com os gonoporos localizados em placas calcáreas na região aboral (Hyman, 1955;

Brusca e Brusca, 1990; Cavey e Märkel, 1994; Barnes e Olive, 1995; Ruppert e Barnes, 1996) (Fig. 1). A região aboral, que fica do lado oposto ao oral, contém uma membrana circular chamada periprocto um sistema composto por 5 placas genitais de onde saem os gametas, e também onde está o ânus. Em uma das placas está presente a madreporita do sistema vascular aquífero. Nesta região estão também 5 placas chamadas oculares que possuem pés ambulacrais modificados que são sensíveis à luz (Hyman, 1955; Kükenthal *et al.*, 1986; Hendler, 1995) (Fig. 1).

1.5 Efeito dos íons sobre a fisiologia dos equinodermos e evidência de regulação iônica

O volume e a composição dos fluidos de um organismo são mantidos dentro de limites fisiológicos compatíveis com a vida (Aires, 1991). Os equinodermos, como a grande maioria dos invertebrados marinhos, mantêm seus fluidos corporais basicamente isosmóticos com a água do mar, porém, sem ter exatamente a mesma composição de solutos que a água do mar (Schmidt-Nielsen, 1996).

Quanto à regulação de íons, Vidolin (2000) verificou que *Lytechinus variegatus* mantém gradientes especialmente de Cl^- entre seu fluido celômico e a água ambiente, quando submetido a diluição da água do mar. Estes resultados corroboraram os estudos de Bishop *et al.* (1994), que observaram que a concentração de Cl^- foi significativamente menor no fluido celômico em comparação com a água ambiente, ou com os fluidos do estômago e intestino. Contudo, estudos adicionais são necessários para comprovar o fenômeno.

A concentração de K^+ no fluido do sistema vascular aquífero da estrela *Marthasterias glacialis* é 11% mais concentrado que no líquido corporal. Robertson (1949), sugere absorção ativa deste íon da água circundante através da parede dos pés ambulacrais. Já as observações de Pagett (1980) com o ofiuróide *Ophiocomina nigra*, demonstraram ser esta espécie capaz de manter a concentração de K^+ no fluido celômico 27% maior que a água ambiente (34‰). Também evidência de regulação frente a estresse salino, é mostrada pelas células intestinais do ouriço

Strongylocentrotus droebachiensis que possuem capacidade de realizar ajuste osmótico utilizando o aminoácido taurina. isto ocorre quando o animal é submetido a um meio diluído (Lange, 1964). As variações de salinidade do ambiente interferem na distribuição bem como no tamanho dos equinodermos (Drouin *et al.*, 1985). Sendo que mudanças abruptas da salinidade provocam mais danos aos animais do que o tempo de exposição a esta mudança (Stickle e Ahokas, 1974).

As estrelas *Asterias rubens* fazem o ajuste osmótico em um meio diluído absorvendo água de maneira rápida, pois secretam K^+ por processo ativo no lúmen dos pés ambulacrais, desta maneira fazendo com que o meio interno fique no nível do externo antes que ocorra perda de sais e para que o volume de fluido seja mantido. A estrela *Asterias forbesi* também secreta K^+ no fluido dos pés ambulacrais, tornando-os hiperosmóticos em relação ao meio ambiente formando um gradiente para entrada de água para manutenção do volume dos pés (Prusch e Whoriskey, 1976). De fato as concentrações de K^+ e de Cl^- nos pés ambulacrais destas estrelas são maiores do que na água circundante e no fluido celômico. Sabe-se que estrelas desta espécie adaptam-se em ambientes com salinidade de 15‰, ocorrendo no Mar Báltico e no Mar do Norte (Binyon, 1962; Prusch, 1977). As larvas da estrela *A. forbesi* excretam água e os íons Na^+ e Cl^- pela parede do corpo e pelo canal do poro que é ciliado, com podócitos e faz regulação iônica (Newton e Potts, 1993). Na verdade vários invertebrados marinhos, ao excretarem (hipo-regulando) íons mais pesados como o Mg^{++} e o SO_4^- , substituindo-os pelos mais leves como Na^+ , Cl^- , H^+ e NH_4 , são capazes de manter um estado de flutuabilidade neutra (Schmidt-Nielsen, 1996).

A função fisiológica da possível regulação de íons específicos nos equinodermos pode ter relação com a manutenção da pressão hidráulica dos pés ambulacrais assim como do tecido conjuntivo mutável (Eylers, 1982; Ruppert e Barnes, 1996). Pepinos-do-mar mudam a viscosidade do corpo de acordo com a concentração de íons; o Ca^{++} e o Mg^{++} por exemplo, aumentam a viscosidade do tecido conjuntivo mutável e baixas concentrações diminuem a viscosidade (Hidaka, 1983; Motokawa, 1994; Trotter e

Chino, 1997). Por outro lado, em ouriços-do-mar e ofiuróides, o íon Mg^{++} em altas concentrações diminui a viscosidade dos ligamentos dos espinhos e do corpo, respectivamente (Hidaka, 1983; Motokawa, 1994).

Em suma, pode-se esperar, pelas evidências apresentadas acima, que íons possam ser regulados especificamente. Para haver regulação iônica, com manutenção de gradientes, necessita-se de epitélios de interface entre o meio interno do animal e o meio externo (água) com características ultra-estruturais de epitélios de transporte: membrana luminal com microvilos, presença de vesículas sub-apicais, mitocôndrias abundantes envolvidas por dobramentos de membrana. Este tipo de estrutura foi demonstrada para o intestino de ouriços, estrelas e holotúrias (Warnau *et al.*, 1998), porém faz-se necessária uma investigação mais ampla, analisando outros tecidos de interface nos ouriços-do-mar: pés branquiais, pés ambulacrais, parede celômica do sistema ambulacral e reto. Adicionalmente, serão investigados os tecidos de duas populações ecologicamente distintas da mesma espécie (*Echinometra lucunter*); uma população naturalmente submetida diariamente à variação de salinidade (zona de maré) e outra de ambiente salino estável (submerso).

2 OBJETIVOS

Verificar evidências estruturais de transporte de íons e função excretora em tecidos do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*, estudando 2 populações ecologicamente distintas: uma de zona de marés e outra continuamente submersa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e aclimação dos ouriços-do-mar

Para este trabalho foram utilizadas 2 populações (Fig. 4) de ouriços *Echinometra lucunter* (L., 1758) (Echinodermata: Echinoidea) uma que ocorre em regiões sujeitas a variações de marés (zona de entre marés) e outra que vive em regiões continuamente submersas (sublitoral). As coletas dos animais de zona de marés foram realizadas manualmente durante a maré baixa nas poças de marés dos costões rochosos na praia do Quilombo e do Trapiche no balneário da Penha, Santa Catarina, Brasil, (latitude 26°46'S, longitude 48°38'W) em janeiro e março/2002. Este local não apresenta aporte de água doce (Fig. 5).

As coletas dos animais da população de sublitoral (profundidade de 3-4 m) foram realizadas, através de mergulho livre na Ilha da Galheta, Pontal, Paraná (latitude 25°30'S, longitude 48°15'W) em abril/2002. A região não apresenta aporte de água doce assim como os animais nunca ficam expostos ao ar (Fig. 6).

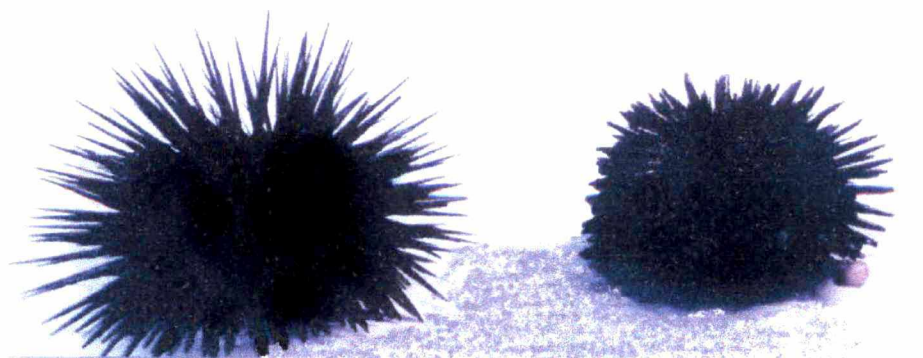


Figura 4 - Exemplares do ouriço *Echinometra lucunter* mostrando a diferença entre os espinhos curtos e mais rombudos de um animal da região de entre marés (direita) e espinhos mais longos e pontiagudos de um animal de sublitoral (esquerda).



Figura 5 - Costão rochoso: Balneário da Penha região de coleta dos animais de entre marés.



Figura 6 – Ilha da Galheta: região de coleta dos animais de sublitoral.

Os animais das duas populações, depois de coletados, foram colocados em caixas de isopor contendo água do local da coleta e foram transportados para o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, Paraná, onde foram imediatamente transferidos para aquário estoque com capacidade de 390 litros, abastecido com água do mar de salinidade 35‰, temperatura entre 20° - 24°C e aeração constante. Machos e fêmeas adultos foram utilizados indiscriminadamente, e o tamanho médio dos ouriços foi de 77 mm (Fig. 4).

Passado o prazo de aclimação de 3 dias nas condições do laboratório (com exceção do grupo 35‰, controle da região entre marés, que foi dissecado no dia seguinte), 2 animais foram transferidos e mantidos por 5 dias em aquário de 30 litros com aeração constante, pH entre 7,5 e 8,0, a temperatura entre 20° - 24°C e contendo água de salinidade 45‰ ou 25‰, medida diariamente com o salinômetro refratômetro S-28 (Shibuya[®]). Os animais foram alimentados uma vez com algas durante os experimentos. Cada experimento foi realizado em duplicata, 2 animais por aquário, totalizando um número final de 4 animais para cada condição (Fig. 7).

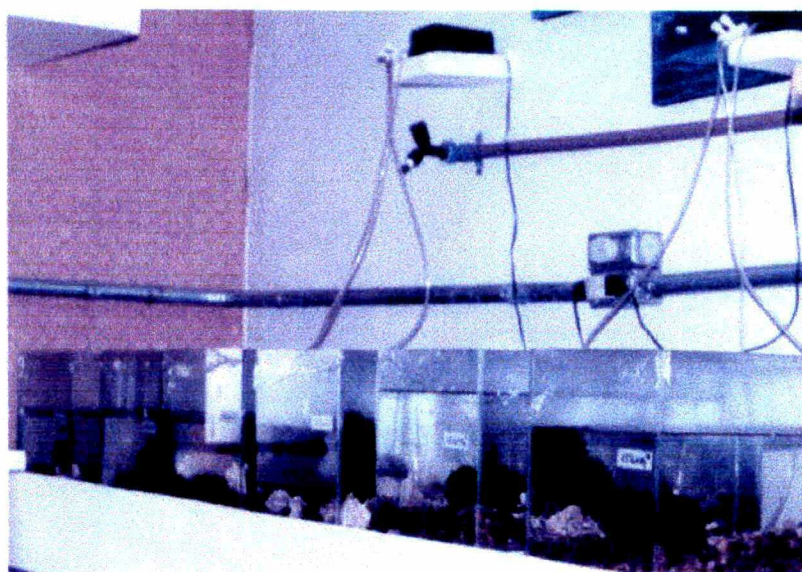


Figura 7 – Disposição dos aquários experimentais no Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação.

Após o período de exposição às diferentes salinidades (35‰ – controle, 25‰ e 45‰), os animais foram anestesiados com solução de cloreto de magnésio. O

Após o período de exposição às diferentes salinidades (35‰ – controle, 25‰ e 45‰), os animais foram anestesiados com solução de cloreto de magnésio. O relaxamento é ideal antes da dissecação para análises histológicas ou para microscopia eletrônica de tecidos leves. Os efeitos desta solução são reversíveis até certo ponto; os indivíduos voltam da anestesia quando são recolocados na água do mar (Hendler *et al.*, 1995). A solução isotônica de $MgCl_2$ é preparada dissolvendo-se 73 g do sal em 1000 ml de água destilada (Hendler *et al.*, 1995). Para a anestesia os indivíduos são transferidos diretamente da água do mar para recipientes com a solução de $MgCl_2$ (0.36 M) que é isotônica à água do mar 35‰, 0.26 M para água do mar 25‰ e 0.46 M para água do mar 45‰, a anestesia se completa em 15 minutos. Para a retirada dos pés branquiais (brânquias peristomiais), dos pés ambulacrais do hemisfério oral, da parede celômica do sistema ambulacral que pode incluir o canal radial, o canal lateral e a (s) ampola (s) e do reto utilizou-se lupa, pinça e tesoura oftalmológica.

3.2 Ultra-estrutura dos tecidos

Um fragmento de cada um dos 4 tecidos de cada animal foi então fixado por imersão em solução de fixação primária (no gelo por 2 horas). O fixador primário continha glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 200 mM em tampão de cacodilato de sódio 100 mM e NaCl em quantidade apropriada para cada salinidade. Para a salinidade 35‰, foi acrescentado 300 mM de NaCl; para a salinidade 25‰ 180 mM de NaCl e 385 mM de NaCl para a salinidade 45‰. A osmolalidade do fluido celômico (medida previamente) foi de 1061 mOsm.kgH₂O⁻¹ em 35‰, 778 mOsm.kgH₂O⁻¹ em 25‰, e a osmolalidade do fluido celômico de aproximadamente 1468 mOsm.kgH₂O⁻¹ em 45‰ havendo osmoconformação após mais de 48 horas nas salinidades.

Os fragmentos dos tecidos foram a seguir lavados em solução tampão contendo os mesmos sais do fixador primário, porém sem os aldeídos, 3 vezes por 5 minutos cada, e foram pós-fixados em tampão cacodilato com sais na mesma composição salina do fixador primário e tetróxido de ósmio 1% por 1,5 horas em gelo.

Os fragmentos foram a seguir desidratados em série alcoólica de 50 a 100%: 10 minutos em álcool 50%, 10 minutos em álcool 70%, 10 minutos em álcool 95% e duas vezes de 15 minutos em álcool 100%. Foram então transferidos para óxido de propileno (2 vezes de 15 minutos), sendo infiltrados por 1 hora em mistura 1:1 de óxido de propileno e resina Araldite 502, e posteriormente “overnight” em mistura 1:3 de óxido de propileno e resina. No dia seguinte, os fragmentos foram transferidos para resina pura, permanecendo 1 hora a 45°C em frasco aberto, e por fim 24 horas a 60°C nas fôrmas para polimerização (Freire e McNamara, 1995). Os fragmentos foram colocados para emblocar em posição transversal (quando possível). Os cortes semi-finos (500 nm) e finos (50 nm) foram realizados no Ultramicrotomo Leica Ultracut UCT do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR; cortes semi-finos com navalhas de vidro, e cortes finos com navalha de diamante (Delaware Diamond Knives). Cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina 1% em bórax aquoso (1%), e fotografados no fotomicroscópio Zeiss Axiophot (Setor de Ciências Biológicas da UFPR). Cortes finos foram contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963), examinados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1200 EXII do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, a 80 kV de voltagem acelerante e fotografados em aumento de 3.000 vezes.

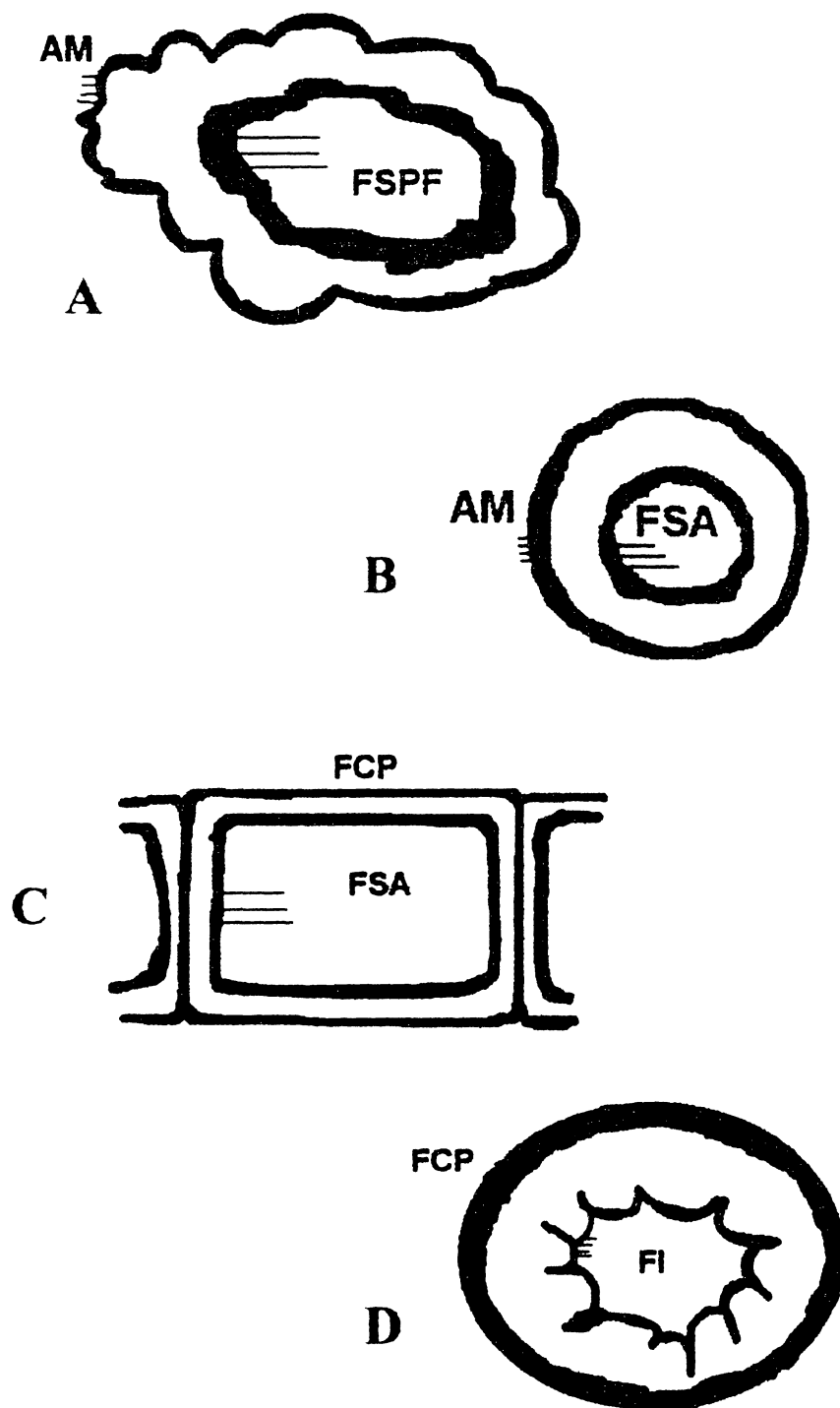


Figura 8 – Esquema dos tecidos em relação aos fluidos de contato. A) Pé branquial: AM (água do mar) e FSPF (fluido do sistema perifaríngeo), B) Pé ambulacral: AM (água do mar) e FSA (fluido do sistema ambulacral), C) Parede celômica: FCP (fluido celômico perivisceral) e FSA (fluido do sistema ambulacral), D) Reto: FCP (fluido celômico perivisceral) e FI (fluido intestinal), traços curtos: microvilos, traços longos: cílios.

4 RESULTADOS

Os ouriços da espécie *E. lucunter* tanto da zona de marés quanto de sublitoral toleraram bem os 5 dias na água do mar diluída (25‰). Quando submetidos a esta diluição da água do mar não manifestaram alterações comportamentais em relação aos animais controles mantidos em água do mar 35‰. No momento da dissecação todos se apresentaram com os espinhos erguidos, os pés ambulacrais em atividade e com a membrana peristomial ativa. Na água concentrada (45‰) os ouriços morreram no tempo de 48 horas. Passadas 40 horas já se apresentavam debilitados, com os espinhos prostrados, os pés ambulacrais flácidos, a membrana peristomial afundada e a boca bem aberta, porém ainda vivos.

4.1 Microanatomia e ultra-estrutura dos pés branquiais de *Echinometra lucunter*

Ao microscópio de luz foi observado que o tecido que constitui o pé branquial é composto por uma camada de epitélio externo, que fica em contato com a água do mar, seguida por uma faixa de tecido conjuntivo e também uma camada epitelial interna que fica em contato com o fluido celômico (Figs 9A - 9F). A circunferência dos pés mostrou-se bastante irregular, pelo seu formato “arborescente”, não houve diferenças entre os animais controles (Fig. 9A) (35‰) da zona de marés quando comparados com os animais de sublitoral (Fig. 9B). Metade dos indivíduos de cada região apresentou material escuro e frouxo preenchendo o lúmen. Todos os animais experimentais das duas populações que permaneceram 5 dias em salinidade 25‰ (Figs 9C e 9D), quando comparados com os grupos controles, apresentaram o lúmen mais inchado, visto que a circunferência apresentou-se mais regular. Os experimentais de sublitoral apresentaram maior presença de material no lúmen e também a faixa de conjuntivo mais larga quando comparados com os animais experimentais da zona de maré. Dentre os animais experimentais que permaneceram 40 horas em salinidade 45‰, metade (2/4) dos indivíduos da região de marés e todos os de sublitoral (4/4) apresentaram material

escuro obstruindo completamente o lúmen (Figs 9E e 9F). A circunferência dos pés branquiais destes experimentais mostrou-se irregular como nos animais do grupo controle.

A ultra-estrutura do epitélio externo (que fica em contato com a água do mar) dos pés branquiais dos grupos da região de marés e de sublitoral (Figs 10A - 10G) mostrou células epiteliais com microvilos, com o citoplasma apresentando algumas vesículas subapicais, contendo material pouco elétron-denso. Estas vesículas ocorreram em 3/4 dos indivíduos controles da região de marés (Fig. 10A) e em 2/4 dos indivíduos de sublitoral (Fig. 10B). Observou-se a presença de mitocôndrias dispostas mais na região externa, próxima aos microvilos. Logo abaixo da camada de células epiteliais observou-se a membrana basal. Entre a membrana basal do epitélio externo e a membrana basal do epitélio luminal ocorre uma faixa de tecido conjuntivo mesclada com feixes de tecido muscular. Não houve evidência na região de epitélio externo, de diferenças ultra-estruturais entre os indivíduos das duas populações. As eletromicrografias das células do epitélio externo do grupo submetido à redução de salinidade (25‰) da região de marés e da região de sublitoral não mostraram alterações nestes experimentais quando comparados com os grupos controles das mesmas regiões (Figs 10C e 10D). Os experimentais em 45‰ mostraram que em 2/4 dos indivíduos da região de marés o tecido epitelial externo apresentou-se danificado (Fig. 10E). Esta alteração ocorreu em 1/4 dos indivíduos da região de sublitoral (Figs 10F e 10G).

A ultra-estrutura do epitélio luminal em contato com o fluido celômico mostrou camadas de células epiteliais pequenas e ciliadas, com o volume quase todo ocupado pelo núcleo (Figs 11A - 11H). Alguns cílios apresentaram-se rodeado por microvilos. Entre estas células, porém mais próximo da membrana basal, apareceram porções com material amorfo (músculo). As eletromicrografias dos experimentais em 25‰ revelaram que as células do epitélio luminal (ciliado), em apenas um indivíduo da zona de marés e um de sublitoral apresentaram espaço alargado entre o epitélio e a membrana basal (Fig. 11D). Todos os demais experimentais mostraram-se semelhantes

aos controles (Figs 11C e 11E). Em 3/4 dos experimentais em 45‰ de zona de marés as células do epitélio ciliado apresentaram as mesmas características dos grupos controles (Fig. 11F). Apenas um exemplar da zona de marés e todos os animais de sublitoral mostraram estas células sem citoplasma, porém não apresentando núcleo normal e sim, vesicular de material amorfo (Figs 11G e 11H).

4.2 Microanatomia e ultra-estrutura dos pés ambulacrais de *Echinometra lucunter*

Ao microscópio de luz, o tecido que constitui o pé ambulacral possui epitélio externo que fica em contato com a água do mar, uma faixa de tecido conjuntivo, e epitélio interno que fica em contato com o fluido do sistema ambulacral (Figs 12A e 12B). A circunferência do pé ambulacral em todos os indivíduos controles, de ambas as populações apresentou-se normal, bastante regular. Nenhum indivíduo dos grupos controles apresentou o lúmen preenchido por celomócitos. Todos os experimentais da zona de marés, que permaneceram 5 dias em salinidade 25‰ apresentaram os tecidos iguais aos controles (Fig. 12C). Contudo, apresentaram sutis evidências de edema. Por outro lado, todos os experimentais da região de sublitoral apresentaram severa destruição dos tecidos (Fig. 12D). Os de sublitoral apresentaram também a circunferência dos pés bem mais irregular. Nenhum indivíduo das duas regiões mostrou o lúmen obstruído por células. Dos grupos que foram expostos a água do mar concentrada (45‰) por 40 horas, todos os animais da zona de marés (Fig. 12E), assim como 3/4 dos indivíduos da região de sublitoral (Fig. 12F) apresentaram material precipitado no lúmen e/ou aspecto de destruição tecidual. Juntando-se as duas populações e comparando-se as diferentes salinidades com relação à espessura do epitélio e o diâmetro médio do pé ambulacral, observou-se o seguinte: entre os indivíduos do grupo controle (35‰) (média = $0,23 \pm EP = 0,02 \mu m$) $n = 8$ e os experimentais (média = $0,023 \pm EP = 0,009 \mu m$) 25‰ $n = 6$ não houve diferença significativa ($p = 0,98$). Houve diferença significativa apenas entre os indivíduos do grupo controle e os experimentais 45‰ ($0,33 \pm 0,03 \mu m$) $n = 6$: $p = 0,009$, com

aumento nos animais submetidos a estresse salino. Comparando-se a espessura do tecido dos pés ambulacrais entre os indivíduos do grupo controle ($113.1 \pm 12.8 \mu\text{m}$) $n = 8$ e os experimentais 25‰ ($135.8 \pm 28.5 \mu\text{m}$) $n = 7$ observou-se que não houve diferença significativa $p = 0,46$. Novamente, de forma coerente, houve diferença significativa apenas entre os indivíduos do grupo controle e os experimentais 45‰ ($181,2 \pm 25 \mu\text{m}$) $n = 6$: $p = 0,022$. Este aumento em 45‰ provavelmente deve-se ao fato da água do mar concentrada causar descamação de células luminiais. Ao comparar-se o diâmetro dos pés ambulacrais observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos controle ($505 \pm 46 \mu\text{m}$) $n = 8$ e experimentais 25‰ ($480 \pm 39 \mu\text{m}$) $n = 6$: $p = 0,69$ ou entre indivíduos do grupo controle e os experimentais em 45‰ ($571 \pm 51,2 \mu\text{m}$) $n = 8$: $p = 0,35$.

As eletromicrografias do epitélio externo dos pés ambulacrais do grupo controle (35‰) da zona de marés e de sublitoral mostraram a ultra-estrutura das células com microvilos e abundantes vesículas subapicais. Estas vesículas ocorreram em todos os indivíduos da zona de marés (Fig. 13A), assim como em todos de sublitoral (Figs 13B e 13C). Observaram-se células mórula contendo vesículas com material amorfo e granuloso no citoplasma e também entre as células epiteliais. Foram observadas em todos os indivíduos, de ambas as populações (Fig. 13C). Estas células foram distintamente mais frequentes nos pés ambulacrais do que nos pés branquiais. As eletromicrografias dos experimentais 25‰ da zona de marés (Fig. 13D) e de sublitoral (Figs 13E e 13F) não mostraram diferenças óbvias no epitélio externo (microvilos) quando comparados com os grupos controles (35‰). Observou-se também a presença de células grandes com conteúdo bastante elétron-denso (Figs 13D e 13F). As eletromicrografias dos experimentais mantidos por 40 horas na salinidade de 45‰ da zona de marés (Figs 13G e 13H) e de sublitoral (Figs 13I e 13J) mostraram que apenas 2/4 dos indivíduos de marés e 1/4 dos indivíduos de sublitoral apresentaram vacúolos subapicais em alta densidade (Figs 13G e 13I), os demais não apresentaram vesículas

abundantes (Fig. 13H). Outros 2/4 dos indivíduos de sublitoral as células que suportam os microvilos mostraram-se danificadas (Fig. 13J).

As eletromicrografias do epitélio interno (luminal) dos pés ambulacrais dos animais controles (35%) das duas regiões revelaram células musculares opostas à membrana basal. Entre estas células musculares observaram-se neurônios contendo vesículas com neurotransmissores (Figs 14A e 14B). Margeando o lúmen observaram-se células epiteliais pequenas e ciliadas, porém, com poucos cílios e com seu volume ocupado quase que inteiramente pelo núcleo (Fig. 14A). Abaixo da membrana basal observaram-se feixes de colágeno organizadas de forma circular e longitudinal (Fig. 14B). As eletromicrografias do epitélio interno nos experimentais 25% revelaram que em 2/4 dos indivíduos da população marés, porém os outros 2 não (Fig. 14C) e em todos os indivíduos de sublitoral (Figs 14D e 14E), este epitélio apresentou aspecto de edema quando comparado com os grupos controles, mostrando as células musculares bem separadas entre si (Figs 14D e 14E). As eletromicrografias dos experimentais 45% mostraram que no epitélio interno (ciliado) de todos os indivíduos da população de marés analisados (Figs 14F e 14G) e de sublitoral (Fig. 14H), havia precipitação de células para o interior do lúmen.

4.3 Microanatomia e ultra-estrutura da parede celômica do sistema ambulacral de *Echinometra lucunter*

A microscopia de luz revelou as camadas de tecido que compõem a parede celômica do sistema ambulacral. Este tecido possui um epitélio externo (que fica em contato com o fluido celômico perivisceral), uma camada de tecido conjuntivo e o epitélio interno (que fica em contato com o fluido do sistema ambulacral). A parede celômica do sistema ambulacral em *E. lucunter* apresentou o epitélio bastante fino, facilitando a difusão de gases entre o fluido ambulacral e o fluido celômico perivisceral. Os animais da zona de marés (Fig. 15A) e os de sublitoral (Fig. 15B) dos grupos controles (35%) apresentaram tanto parede celômica do sistema ambulacral

com o espaço entre septos vazio, quanto espaço entre septos preenchido por material. Os animais experimentais mantidos por 5 dias em água do mar 25‰ da zona de marés não apresentaram diferenças quando comparados com os animais dos grupos controles, também apresentando parede celômica do sistema ambulacral com septos totalmente preenchidas e parede celômica do sistema ambulacral com septos com pouco material (Figs 15C e 15D). Apenas um indivíduo de cada população apresentou tecido danificado, com evidência de acúmulo de fluido, edema, entre os dois epitélios. As micrografias dos experimentais mantidos por 40 horas em água a 45‰ da região de marés mostraram que 3/4 destes animais estavam com os tecidos preservados, apenas 1 indivíduo não apresentou distinção clara entre as parede celômica do sistema ambulacral (Fig. 15E). Todos os indivíduos de sublitoral mantidos em 45‰ apresentaram o tecido epitelial interno das parede celômica do sistema ambulacral bastante estreito e o lúmen sempre bem vazio (Fig. 15F). Juntando-se as duas populações, comparando as diferentes salinidades com relação entre a espessura da parede da câmara do sistema ambulacral e o diâmetro médio da câmara observou-se que não houve diferença significativa entre os indivíduos do grupo controle ($0,171 \pm 0,02 \mu\text{m}$) $n = 6$ e os experimentais 25‰ ($0,195 \pm 0,03 \mu\text{m}$) $n = 6$: $p = 0,55$. Também não se observou diferença significativa entre os indivíduos controle e os experimentais 45‰ ($0,196 \pm 0,04 \mu\text{m}$) $n = 6$: $p = 0,63$. Comparando-se a espessura da parede da câmara novamente observou-se que não houve diferença significativa entre os indivíduos do grupo controle ($18,3 \pm 2,77 \mu\text{m}$) $n = 6$ e os experimentais 25‰ ($21,5 \pm 3,9 \mu\text{m}$) $n = 6$: $p = 0,53$. Finalmente, não houve diferença entre o grupo controle e os experimentais 45‰ ($18,7 \pm 3,3 \mu\text{m}$) $n = 6$: $p = 0,94$. Por formar um tecido interno, estas estruturas mostraram-se mais preservadas.

As eletromicrografias das parede celômica do sistema ambulacral dos animais dos grupos controles (35‰) mostraram que o epitélio voltado para a cavidade celômica é composto por uma camada de células com poucos cílios. Estas células apresentaram o núcleo com formato irregular e pouco citoplasma. Tecido conjuntivo frouxo foi

encontrado entre as membranas basais dos epitélios externo e interno (Figs 16A e 16B). Entre a membrana basal e as células do epitélio interno observou-se tecido muscular (Fig. 16B). A região de epitélio interno da ampola (lúmen), em contato com o fluido do sistema ambulacral, apresentou uma monocamada de células com cílios abundantes, freqüentemente rodeados por paliçada de microvilos (Fig. 16B). Assim como as células epiteliais externas, estas células epiteliais internas também apresentaram citoplasma bem reduzido (Fig. 16B). Nas eletromicrografias dos animais da população da zona de marés que permaneceram 5 dias em 25‰ (Figs 16C e 16D), 2/4 dos indivíduos apresentou a faixa de conjuntivo ampliada, com evidência de edema, os outros 2 experimentais apresentaram-se parecidos com os controles. O epitélio interno mostrou-se desorganizado em todos os indivíduos (Figs 16C e 16D). Em 2/3 dos os animais de sublitoral observou-se evidência de edema contudo, 1 não (Fig. 16E). As eletromicrografias dos animais experimentais da zona de marés que permaneceram 40 horas em 45‰ mostraram que apenas 1/4 apresentou dano tecidual, os outros 3 estavam parecidos com os controles (Fig. 16F). Os animais de sublitoral submetidos também a 45‰ apresentaram os dois epitélios muito danificados quando comparados com os controles (Fig. 16G).

4.4 Microanatomia e ultra-estrutura do reto de *Echinometra lucunter*

As fotomicrografias revelaram que o tecido do reto dos ouriços é composto pelo epitélio externo (que fica em contato com o fluido perivisceral), seguido de uma faixa de conjuntivo e pelo espesso epitélio luminal (Figs 17A e 17B). Observaram-se, espalhadas pelas camadas de tecido, abundantes células grandes contendo muitas vesículas, as mesmas já relatadas para o pé branquial e pé ambulacral (Fig. 17B). A borda do epitélio luminal apresentou uma faixa com vesículas claras (Figs 17A e 17B). Nos animais experimentais da zona de marés (Fig. 17C) e nos de sublitoral (Fig. 17D), que foram submetidos à redução de salinidade (25‰), houve também a presença da espessa faixa clara de vesículas (Figs 17C e 17D). Em todos os experimentais o epitélio

externo apresentou-se preservado, semelhante aos controles. Ao microscópio de luz os indivíduos da zona de marés e de sublitoral submetidos à salinidade de 45‰ também mostraram abundantes vesículas claras formando uma faixa subapical (Figs 17E e 17F). O epitélio externo mostrou-se também preservado em todos os indivíduos. Juntando-se as duas populações, comparando as diferentes salinidades com relação à espessura do tecido do reto observou-se que não houve diferença significativa entre os indivíduos do grupo controle ($218,3 \pm 28,1 \mu\text{m}$) $n = 7$ quando comparados com os experimentais 25‰ ($201,8 \pm 13,5 \mu\text{m}$) $n = 5$: $p = 0,65$. Também não se observou diferença significativa entre os indivíduos do grupo controle quando comparados aos experimentais 45‰ ($174,4 \pm 15,5 \mu\text{m}$) $n = 7$: $p = 0,2$. Ao comparar-se a espessura da camada de vesículas da região luminal observou-se que novamente não houve diferença significativa entre os indivíduos do grupo controle ($35,3 \pm 6,1 \mu\text{m}$) $n = 8$ e os experimentais 25‰ ($54,2 \pm 9,2 \mu\text{m}$) $n = 5$: $p = 0,099$. Também não houve diferença significativa entre o grupo controle e os experimentais 45‰ ($28,5 \pm 3,1 \mu\text{m}$) $n = 6$: $p = 0,4$. Este resultado é compatível com o fato deste tecido ser interno, o que sugere, assim como ocorreu com a parede celômica do sistema ambulacral, algum tipo de proteção osmótica exercida pela parede do corpo.

As eletromicrografias do reto dos ouriços mostraram que as células da região voltada para o lúmen apresentaram microvilos e abundantes vesículas contendo material pouco elétron-denso, além de muitas mitocôndrias (Figs 18A e 18B). As eletromicrografias dos animais experimentais da população da zona de marés em 25‰ mostraram que em apenas 1/4 dos indivíduos observou-se os microvilos danificados (Fig. 18C). Todos os animais experimentais de sublitoral também submetidos à redução de salinidade (25‰) não apresentaram diferenças quando comparados com os grupos controles (Fig. 18D). Apareceram, entre as células epiteliais do lúmen, as células arredondadas e grandes contendo muitas vesículas (Fig. 18E), também relatadas para o pé branquial e pé ambulacral e vistas abundantemente em microscopia de luz (Figs 17B e 17D) do reto, sendo observadas tanto nos controles quanto nos

experimentais. Ao microscópio eletrônico de transmissão, 2/4 dos animais experimentais da zona de marés que permaneceram por 40 horas em salinidade 45‰ apresentaram as células luminais com os microvilos preservados (Fig. 18F) e os outros 2 apresentaram este tecido sem os microvilos (Fig. 18G). O mesmo resultado foi observado na população de sublitoral, 2/4 com as células da porção luminal semelhantes aos controles (Fig. 18H) e os outros 2 com aparência de células luminais necrosadas descamando (Fig. 18I). A Tabela 1 a seguir apresenta resumo dos resultados descritos.

Tabela 1- Lista das diferenças observadas em relação aos controles (35‰)

	25‰ X 35‰		45‰ X 35‰
Pé branquial	EM	Luz: • lúmen inchado (4/4); Ultra: • edema entre epitélio luminal e a membrana basal (1/4);	Luz: • lúmen obstruído (2/4); Ultra: • epitélio externo danificado (2/4); • células do epitélio luminal sem citoplasma com núcleo amorfo núcleo amorfo e células sem citoplasma (1/4);
	SL	Luz: • lúmen inchado (3/3); • mais material no lúmen (3/3); • conjuntivo mais largo (3/3); Ultra: • edema entre o epitélio luminal e a membrana basal (1/3).	Luz: • lúmen obstruído (4/4); Ultra: • epitélio externo danificado (1/4); • células do epitélio luminal sem citoplasma com núcleo amorfo (4/4).
Pé ambulacral	EM	Luz: • evidência sutil de edema (4/4). Ultra: • edema epitélio luminal com células musculares afastadas (2/4).	Luz: • material no lúmen e aspecto de destruição tecidual (4/4). Ultra: • alta densidade de vesículas subapicais (2/4); • precipitação de células para o lúmen (4/4).
	SL	Luz: • severa destruição dos tecidos e circunferência mais irregular (3/3). Ultra: • edema epitélio luminal com células musculares afastadas (3/3).	Luz: • material no lúmen e destruição tecidual (3/4). Ultra: • alta densidade de vesículas subapicais (1/4); • células com microvilos danificadas (2/4); • células epiteliais danificadas (2/4); • precipitação de células para o lúmen (4/4).
Parede celômica (do sistema ambulacral)	EM	Luz: • tecido danificado e aspecto de edema (1/4). Ultra: • larga faixa de conjuntivo edema (2/4); • epitélio luminal desorganizado (4/4).	Luz: • tecido danificado (1/4); • tecido epitelial interno estreito (4/4). Ultra: • epitélios danificados com células desorganizadas (1/4).
	SL	Luz: • tecido danificado e aspecto de edema (1/3). Ultra: • larga faixa de conjuntivo edema (2/3); • epitélio interno desorganizado (3/3).	Luz: • tecido interno estreito e lúmen com pouco material (3/4). Ultra: • epitélios danificados com as células desorganizadas (4/4).
Recto	EM	Ultra: • microvilos danificados (1/4).	Ultra: • Células luminais danificadas sem microvilos (2/4).
	SL	Não foram observadas diferenças	Ultra: • descamação das células luminais danificadas (2/4).

Entre parênteses número de animais que apresentou a diferença/número de animais analisados.

EM= população de entre marés.

SL= população de sublitoral.

Figura 9- Fotomicrografias dos pés branquiais de *E. lucunter* (corte transversal). Ouriços em água do mar controle (35‰), da população da zona de marés (**A**) e da população de sublitoral (**B**); ouriços em água do mar diluída (25‰), da população de zona de marés (**C**) e da população de sublitoral com aumento no diâmetro (**D**); ouriços em água do mar concentrada (45‰), da população de zona de marés (**E**) e da população de sublitoral com lúmen obstruído por celomócitos (**F**). A barra de escala em F é válida para A – F: 50µm. Símbolos e abreviação: Epitélio externo de aparência normal (➡), epitélio interno camada de células (*, branca), celomócitos (➡), tecido conjuntivo (c).

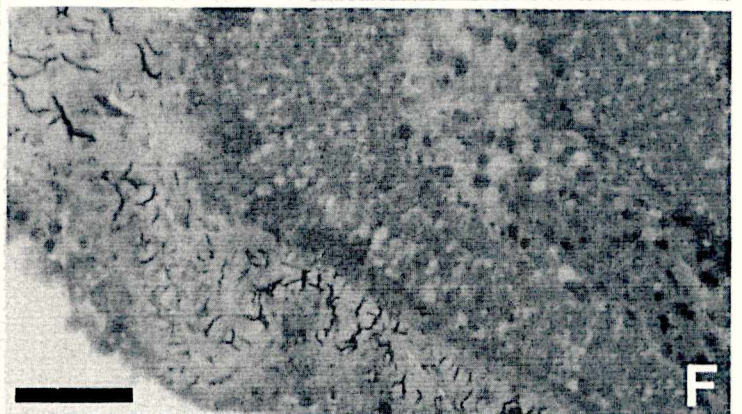
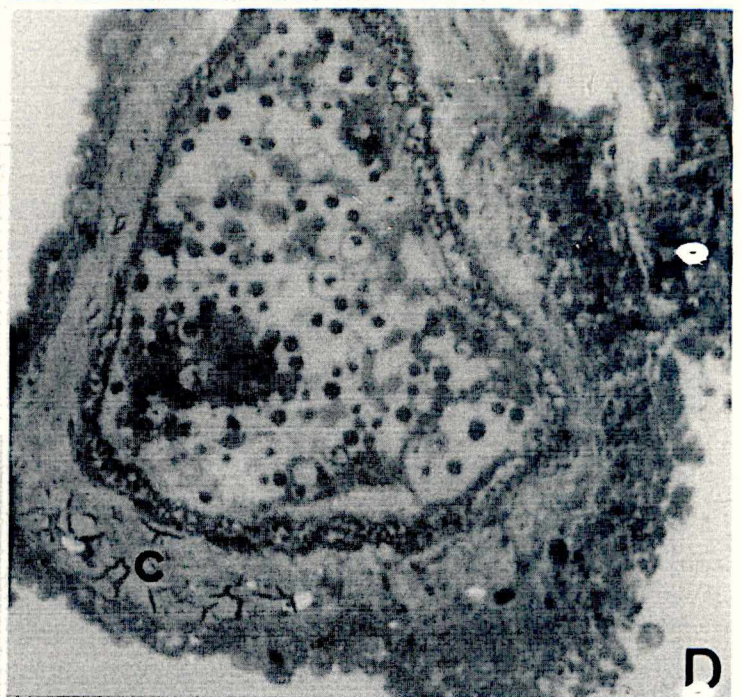
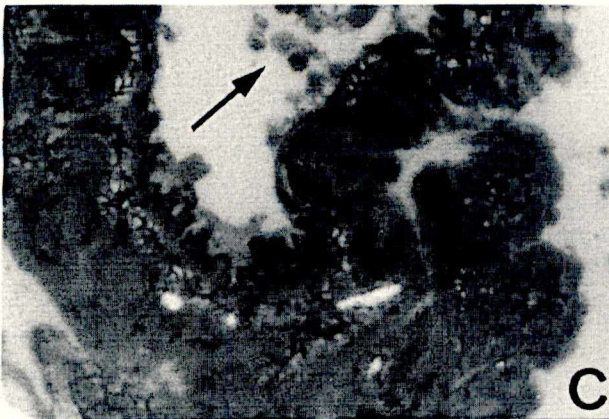
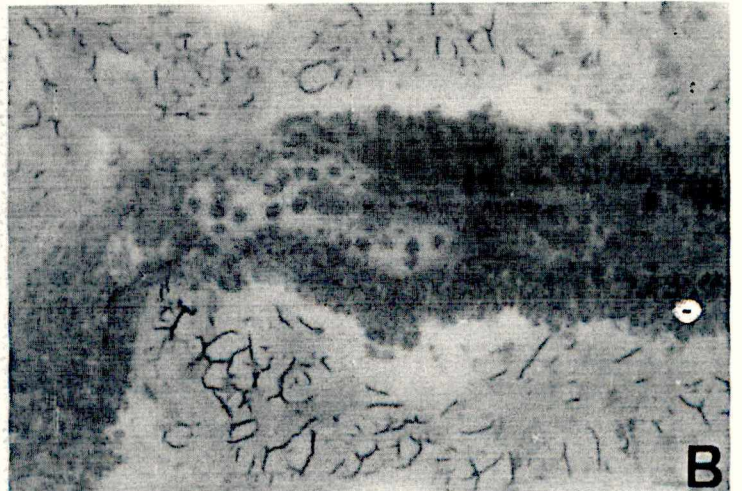
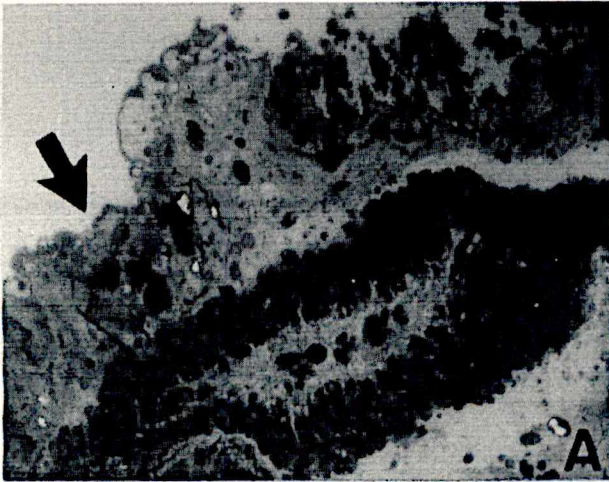


Figura 10- Elétron-micrografias dos pés branquiais de *E. lucunter*. Região do epitélio externo com microvilos, em contato com a água do mar. Ouriços em água do mar controle (35‰), da população de zona de marés (**A**) e da população de sublitoral (**B**); ouriços em água do mar diluída (25‰), da população de zona de marés (**C**) e da população de sublitoral (**D**); ouriços em água do mar concentrada (45‰), da população de zona de marés (**E**) e da população de sublitoral (**F** e **G**) em **G** microvilos danificados. Barras de escala: A = 500 nm, B – G = 2µm. Símbolos: Microvilos (→), membrana basal (→), vesículas subapicais (*).

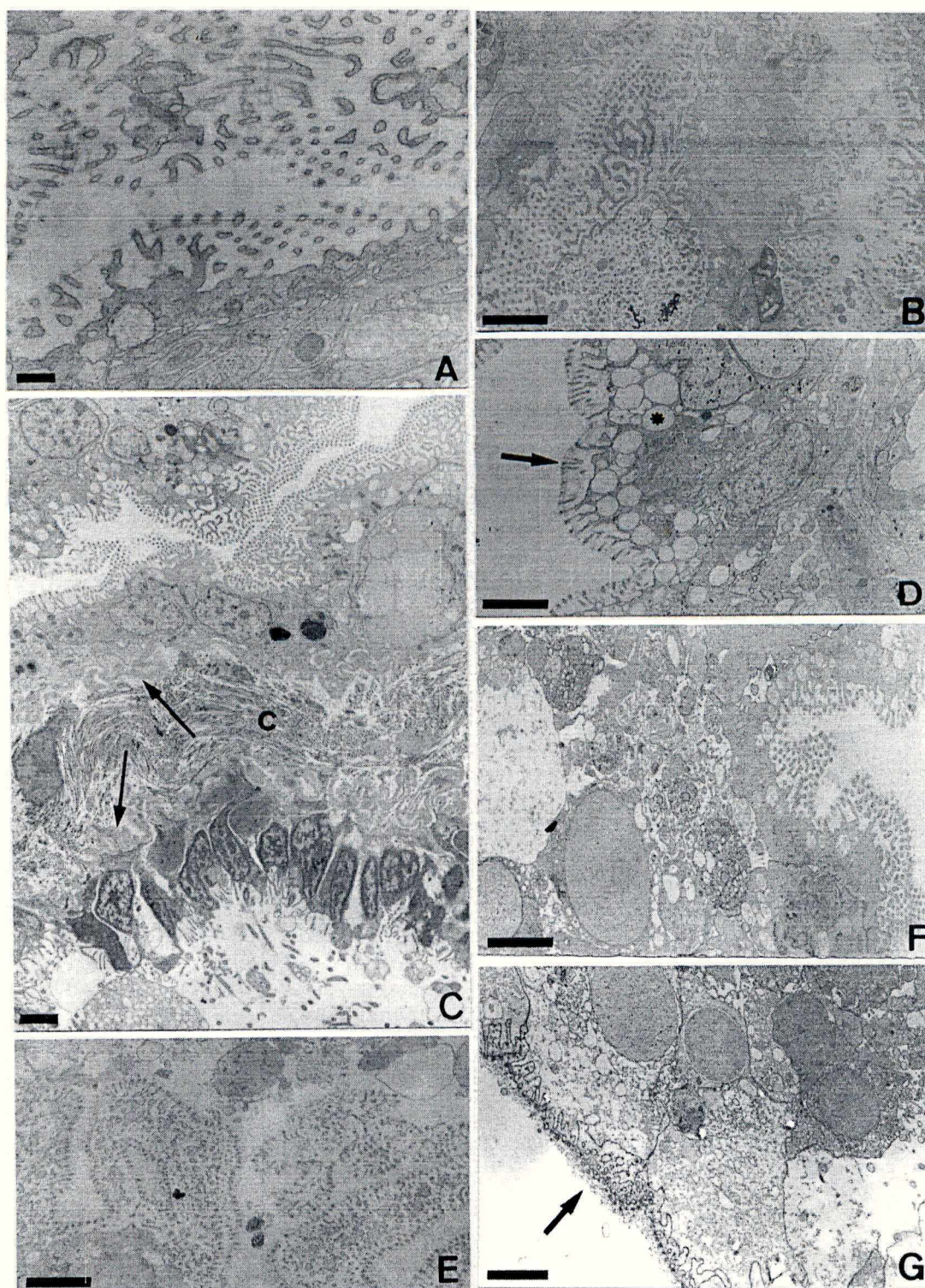


Figura 11- Elétron-micrografias dos pés branquiais de *E. lucunter*. Região do epitélio ciliado interno, em contato com o fluido do celoma perifaríngeo. Ouriços em água do mar controle (35‰), da população de zona de marés com cílios em abundância (**A**) e da população de sublitoral (**B**); ouriços em água do mar diluída (25‰), da população de zona de marés (**C** e **D**) sendo em **D** células epiteliais afetadas, e da população de sublitoral (**E**); ouriços em água do mar concentrada (45‰), da população de zona de marés (**F** e **G**) sendo **G** células epiteliais necrosadas descamando, e da população de sublitoral (**H**). Barras de escala: A – H = 2µm. Símbolos e abreviação: Cílios (♂), célula epitelial (e), membrana basal (→), músculo (*, preto ou branco).

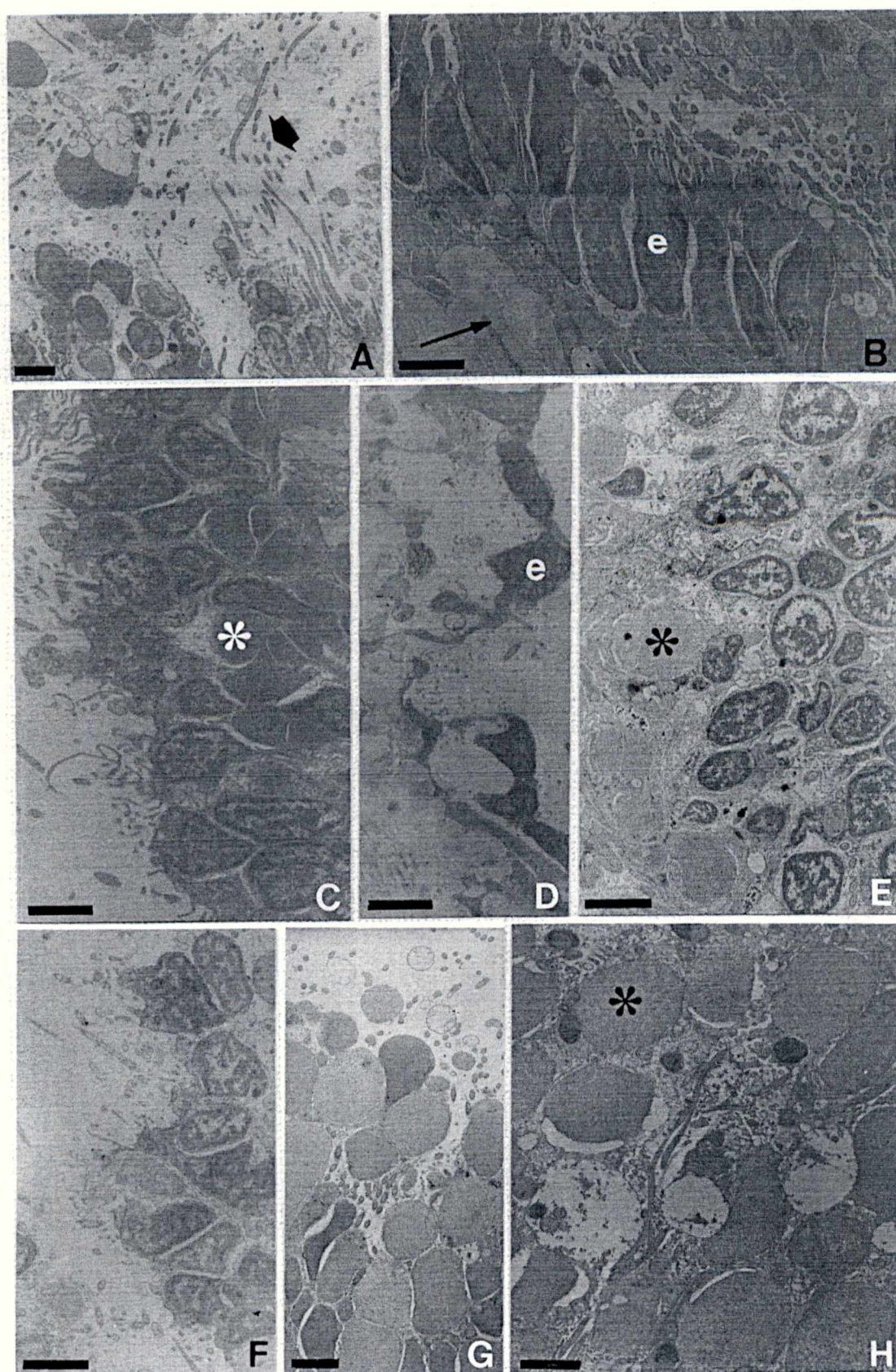


Figura 12- Fotomicrografias dos pés ambulacrais de *E. lucunter* (corte transversal). Ouriços em água do mar controle (35‰), da população de zona de marés (**A**) e da população de sublitoral (**B**); ouriços em água do mar diluída (25‰), da população de zona de marés (**C**) e da população de sublitoral com aspecto de edema na região tecido conjuntivo (**D**); ouriços em água do mar concentrada (45‰), da população de zona de marés com dano tecidual (**E**) e da população de sublitoral com circunferência modificada (**F**). A barra de escala em F é válida para A – F, porém: 100µm (B), 50µm (A, C – F). Símbolos: Epitélio externo (→), epitélio interno (*, branco), celomócitos (→).

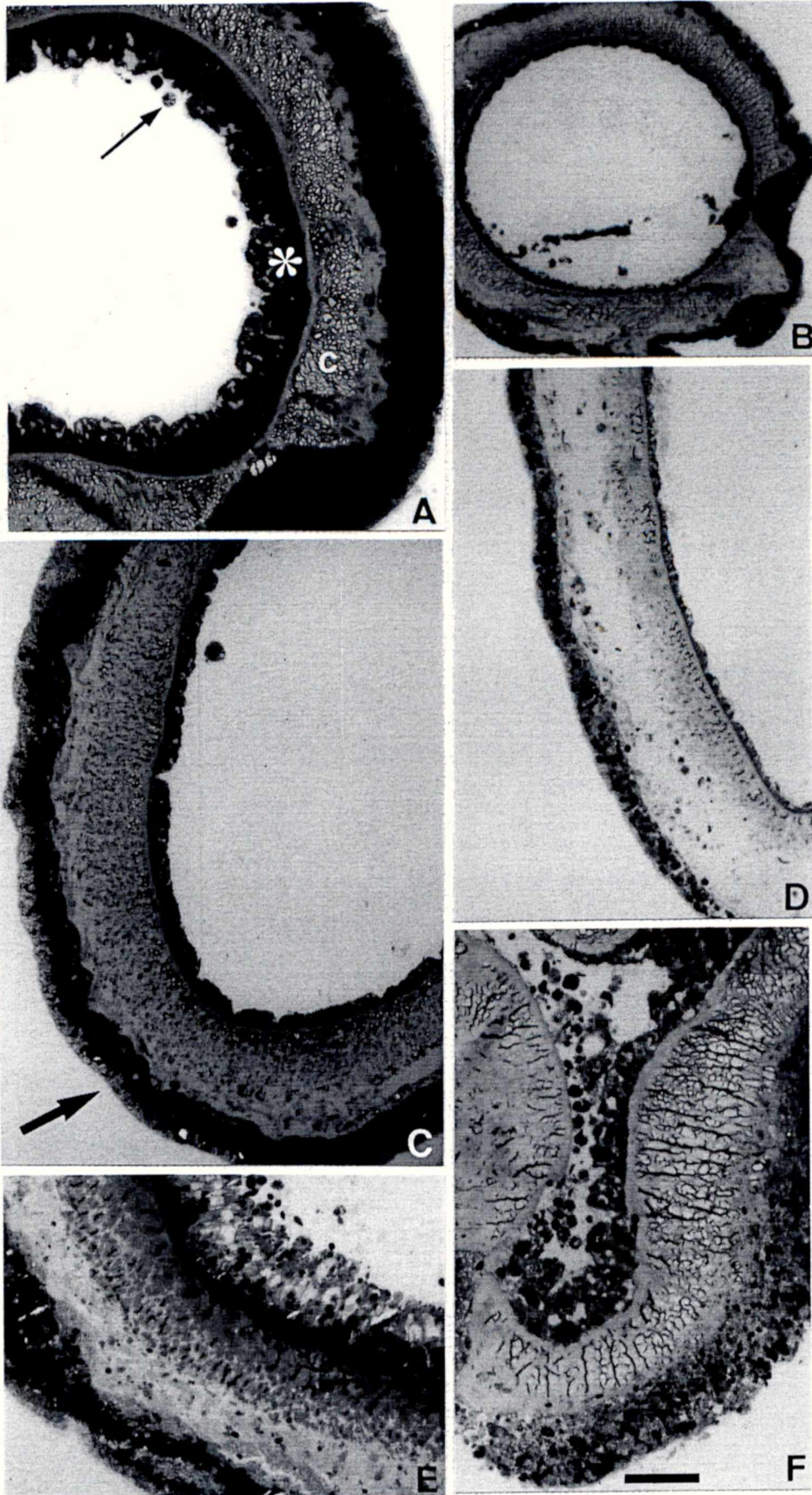


Figura 13- Elétron-micrografias dos pés ambulacrais de *E. lucunter*. Região do epitélio externo, com microvilos, em contato com a água do mar. Ouriços em água do mar controle (35‰), da população de zona de marés (**A**) e da população de sublitoral (**B** e **C**) em **C** abundância de células mórula; ouriços em água do mar diluída (25‰), da população de zona de marés (**D**) e da população de sublitoral (**E** e **F**); ouriços em água do mar concentrada (45‰), da população de zona de marés (**G** e **H**) e da população de sublitoral (**I** e **J**) em **J** microvilos danificados. Barras de escala: A e B = 1µm, C – J = 2µm. Símbolos: Microvilos (→), vesículas (*), célula mórula (★).

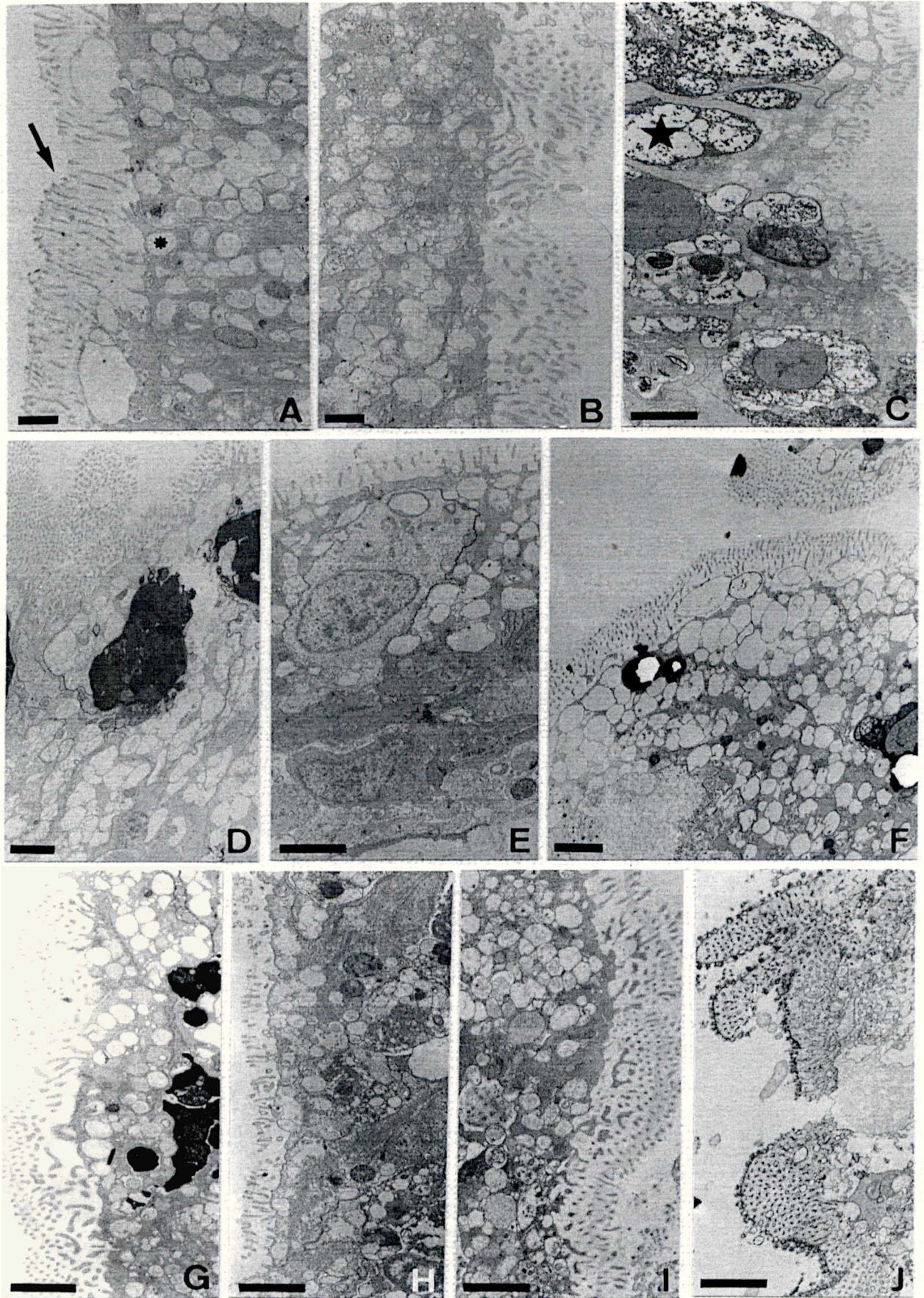


Figura 14- Elétron-micrografias dos pés ambulacrais de *E. lucunter*. Região do epitélio ciliado interno, em contato com o fluido do sistema ambulacral. Ouriços em água do mar controle (35‰), da população de zona de marés (**A**) e da população de sublitoral (**B**); ouriços em água do mar diluída (25‰), da população de zona de marés (**C**) e da população de sublitoral (**D** e **E**) com aspecto de edema; ouriços em água do mar concentrada (45‰), da população de zona de marés (**F** e **G**) descamação de células necrosadas, e da população de sublitoral (**H**) com células necrosadas. Barras de escala: A – H = 2µm. Símbolos e abreviações: Axônio com vesículas contendo neurotransmissores (⚡), fibras de colágeno (c), célula epitelial (e), célula muscular (*, preto ou branco).

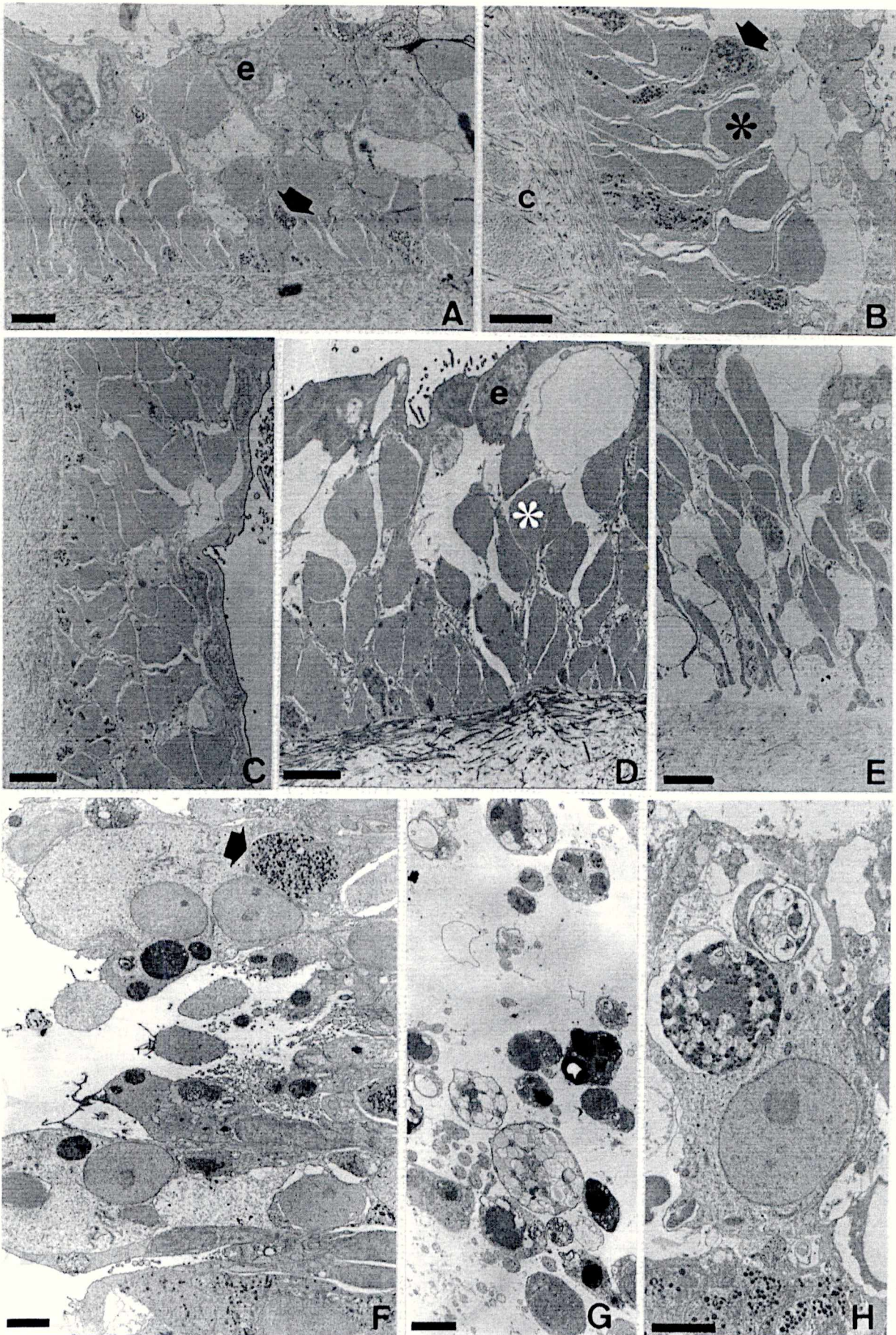


Figura 15- Fotomicrografias da parede celômica do sistema ambulacral de *E. lucunter*. Ouriços em água do mar controle (35‰), da população zona de marés (**A**) e da população de sublitoral (**B**); ouriços em água do mar diluída (25‰), da população de zona de marés (**C**) e da população de sublitoral (**D**); ouriços em água do mar concentrada (45‰), da população de zona de marés (**E**) e da população de sublitoral (**F**). A barra de escala em C é válida para A – F, porém: 50µm (B), 25µm (A, C – F). Símbolos: Epitélio externo (→), epitélio interno (↔), celomócitos (→).

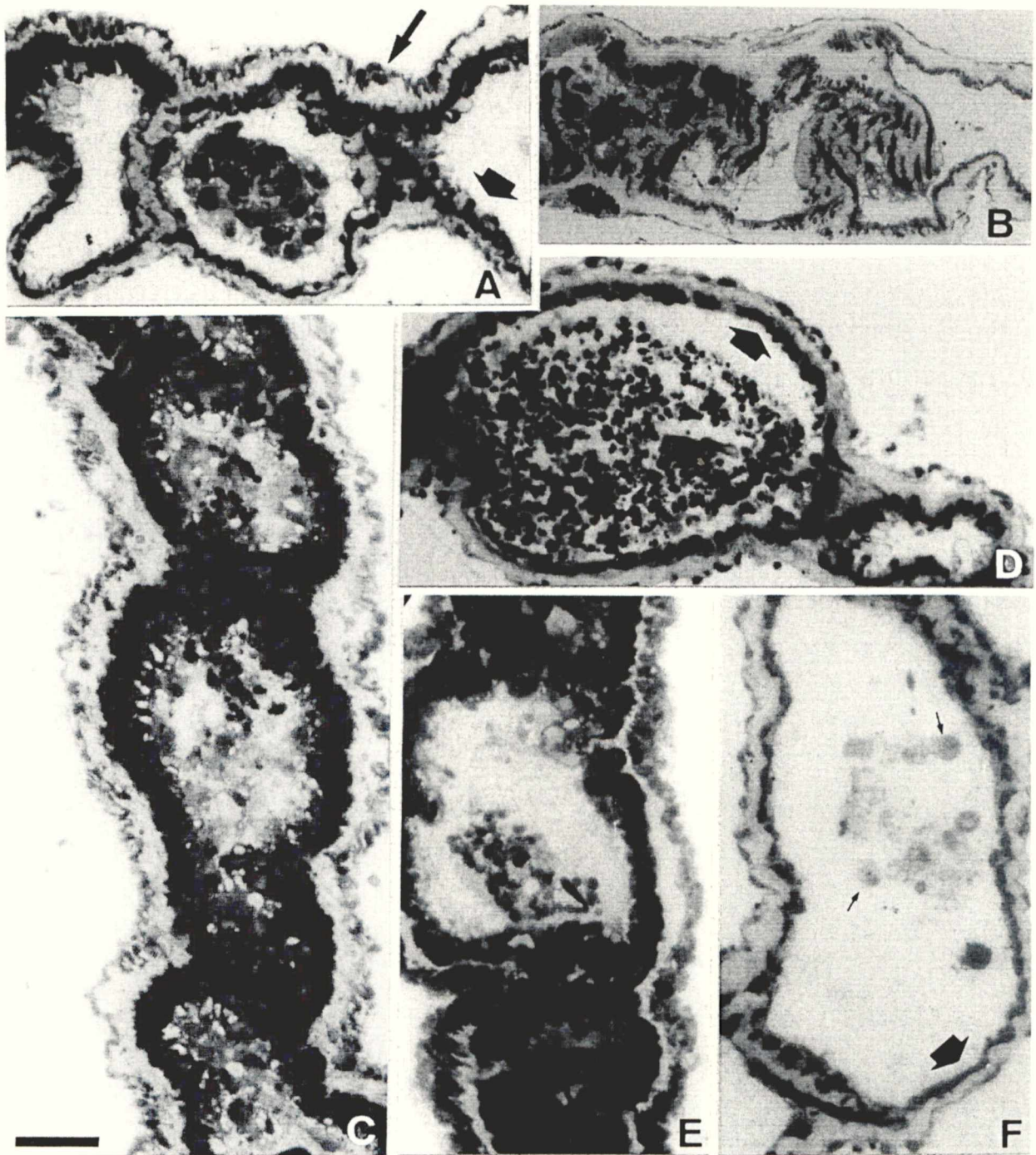


Figura 16- Elétron-micrografias da parede celômica do sistema ambulacral de *E. lucunter*. Ouriços em água do mar controle (35‰), da população de zona de marés com cílios epitélial interno (**A**) e da população de sublitoral (**B**); ouriços em água do mar diluída (25‰), da população de zona de marés (**C** e **D**) em **D** epitélial interno, e da população de sublitoral (**E**) panorâmica mostrando cílios no epitélial interno e externo; ouriços em água do mar concentrada (45‰), da população de zona de marés (**F**) e da população de sublitoral (**G**). Barras de escala: A – G = 2µm. Símbolos e abreviações: Cílios (⬮), fibras de colágeno (c), célula epitélial (e), célula muscular (*, branco), cílio com paliçada de microvilos (↗), membrana basal (→), celoma perivisceral (◆).

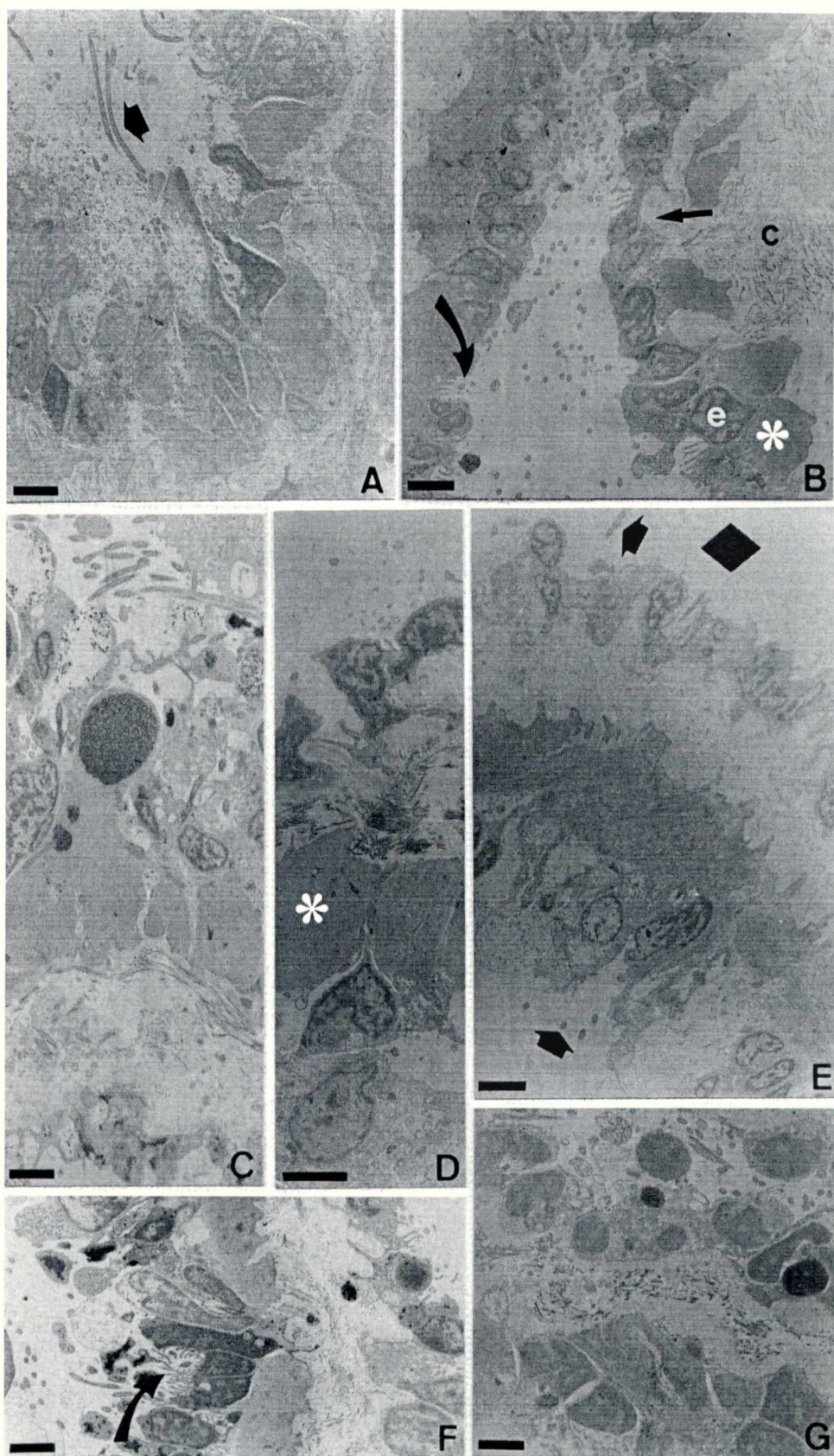


Figura 17- Fotomicrografias do reto de *E. lucunter* (a região luminal está evertida). Ouriços em água do mar controle (35‰), da população de zona de marés (**A**) e da população de sublitoral (**B**) abundância de células mórula; ouriços em água do mar diluída (25‰), da população de zona de marés (**C**) e da população de sublitoral (**D**); ouriços em água do mar concentrada (45‰), da população de zona de marés (**E**) e da população de sublitoral (**F**). A barra de escala em D é válida para A – F, porém: 50µm (A), 25µm (B – F). Símbolos: Células-mórula (→, branca), epitélio luminal (★), epitélio externo (★, branca).

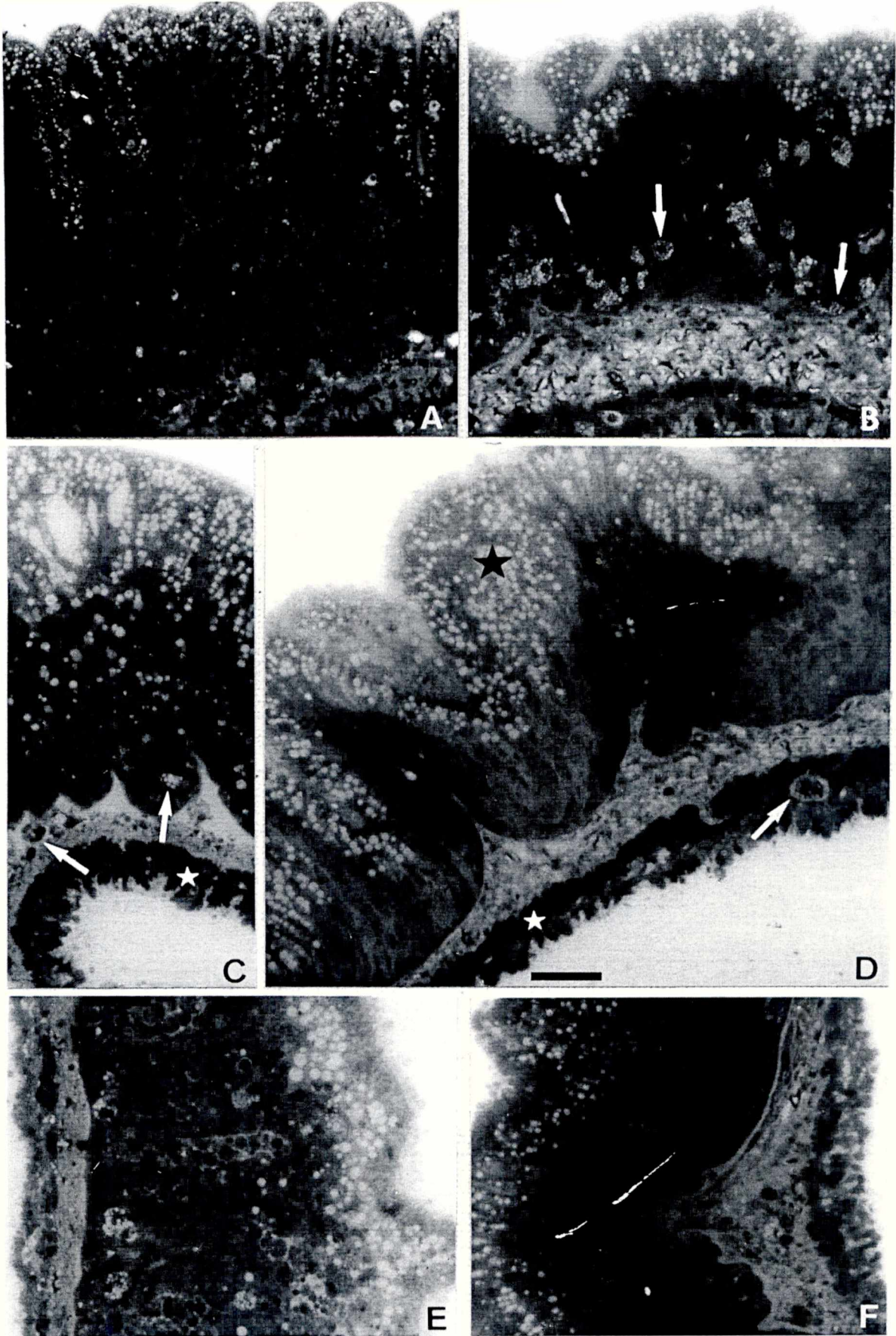
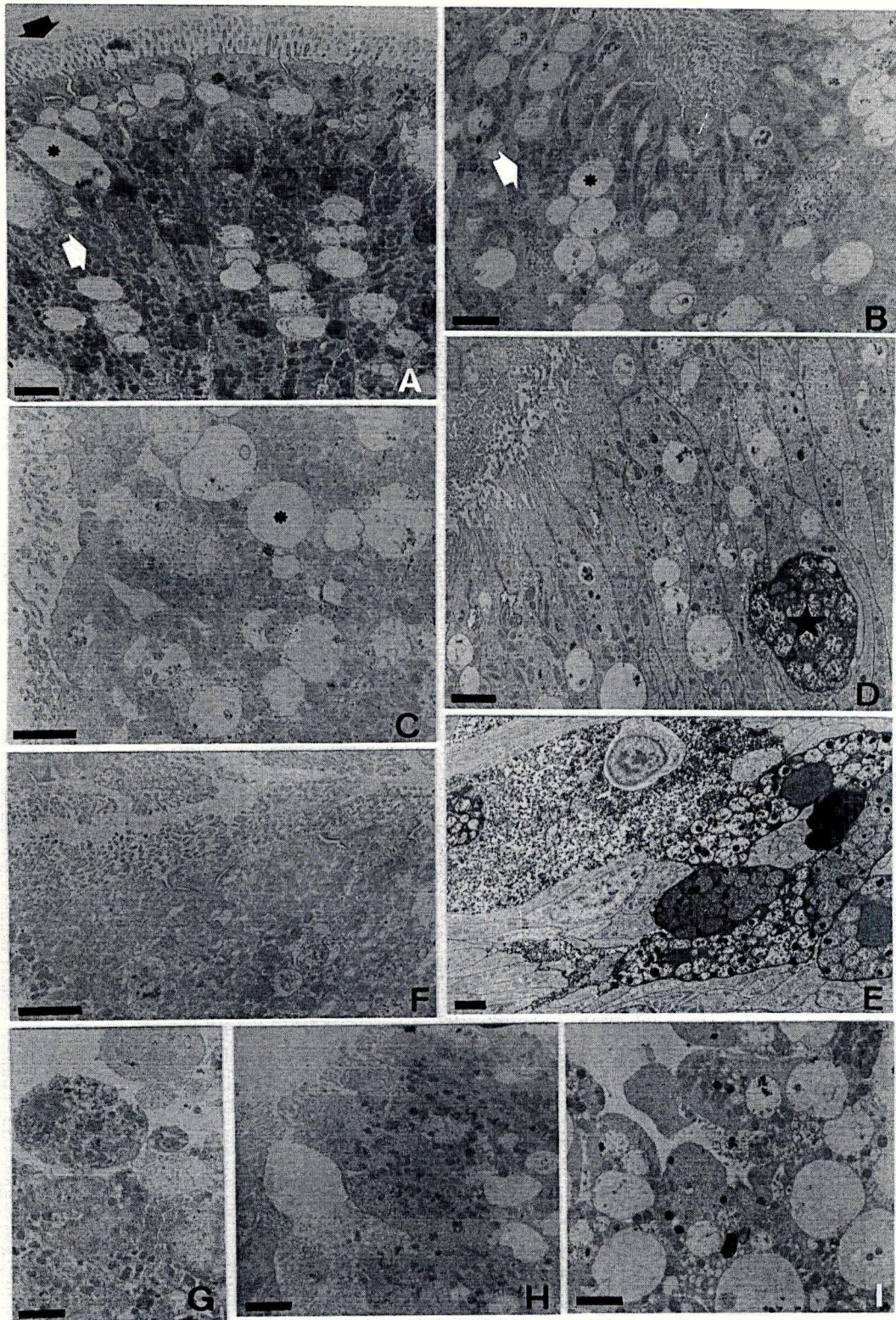


Figura 18- Elétron-micrografias do reto de *E. lucunter*. Região do epitélio luminal. Ouriços em água do mar controle (35‰), da população de zona de marés (**A**) com abundância de mitocôndrias, e da população de sublitoral (**B**); ouriços em água do mar diluída (25‰), da população de zona de marés (**C**) e da população de sublitoral (**D** e **E**) em **E** abundantes células mórula; ouriços em água do mar concentrada (45‰), da população de zona de marés (**F** e **G**) descamação de células luminais necrosadas, e da população de sublitoral (**H** e **I**). Barras de escala: A – I = 2µm. Símbolos: Microvilos (◆), vesículas subapicais (*), mitocôndrias (◆, branca), células-mórula (★).



5 DISCUSSÃO

As duas populações de ouriços *E. lucunter* analisadas neste trabalho, de entre-marés e de sublitoral, apresentaram diferenças no comprimento/aparência dos espinhos. Os indivíduos da zona de marés apresentaram espinhos mais curtos e rombudos. O desgaste dos espinhos se deve ao fato destes ouriços viver em locais, suportando a força mecânica das ondas na região de entre-marés. Por outro lado, os ouriços de sublitoral apresentaram-se com os espinhos mais compridos e pontiagudos (Fig. 4), menos desgastados porque não enfrentam turbulências no seu ambiente. Além desta diferença anatômica externa, os ouriços das duas populações diferiram também nas suas respostas ao tratamento experimental. Os tecidos dos ouriços de sublitoral mostraram-se mais sensíveis às variações de salinidade em relação aos tecidos dos ouriços de entre-marés. Isto pode ter relação com a estabilidade do ambiente de sublitoral; enquanto os animais de entre-marés são diariamente desafiados a cada ciclo de maré, os indivíduos da população de sublitoral não enfrentam variação de salinidade no seu ambiente. De forma compatível, estrelas-do-mar *Asterias rubens* e ouriços-do-mar *Strongylocentrotus droebachiensis* coletados em regiões com água de baixa salinidade são mais resistentes a maiores reduções na salinidade quando comparados com animais coletados em regiões de profundidade (Topping e Fuller, 1942).

As duas populações mostraram maior tolerância a diluição (25‰) da água do mar, porém não a sua concentração (45‰). Salinidades ainda mais baixas, entretanto, parecem ser intoleráveis para *Echinometra lucunter*. Quando expostos a águas de salinidade 20, 13 e 7‰ por 2 a 24 horas, ouriços-do-mar *E. lucunter* apresentaram sinais de desconforto, ficando imóveis no fundo do aquário (Gomes, 1973). Se 10‰ de redução na salinidade da água do mar foi perfeitamente tolerável para *E. lucunter* por vários dias, por outro lado, 10‰ de elevação na salinidade representou estresse insuportável, com mortalidade após 48 horas. Houve perda de água para o meio, com incapacidade de suas células de regular seu volume diante de tamanha perda

osmótica de água. Maior capacidade de regular volume celular diante de entrada osmótica de água, em relação a situação de saída osmótica de água é esperada (Diehl, 1986), uma vez que no ambiente natural de fato é mais provável que ouriços-do-mar da população de entre-marés enfrentem situações de diluição da água do mar (Diehl, 1986; Stickle e Diehl, 1987; Péqueux, 1995). Na maré baixa estes animais ficam nas poças formadas. Se neste momento chover intensamente é possível uma diluição da água do mar da poça (Vidolin *et al.*, 2003); por outro lado, para haver uma concentração da água da poça são necessárias várias horas de sol intenso (Nybakken, 1988). Exemplares deste ouriço em marés de sizigia podem ficar até expostos ao ar, porém no máximo por 1 ou 2 horas (Vidolin e Santos-Gouvea observação *in loco*).

Os 4 tecidos de *E. lucunter* utilizados neste estudo apresentaram diferenças na sensibilidade à alteração de salinidade, independentemente da população considerada. Os pés branquiais e os pés ambulacrais são estruturas externas e de interface entre o corpo do animal e a água do mar. Por outro lado, a parede celômica do sistema ambulacral está em contato com o fluido celômico perivisceral e o fluido do sistema ambulacral; o reto também está em contato com o fluido celômico perivisceral e com o fluido intestinal (Fig. 8). Estes dois últimos (parede e reto) são órgãos internos que não entram em contato direto com a água do mar. Houve maior sensibilidade aos efeitos do estresse salino nos tecidos externos (pé branquial e pé ambulacral), quando comparados com os tecidos internos (parede e reto), dados confirmados estatisticamente. Este não seria um resultado esperado. Como invertebrados marinhos osmoconformadores, os ouriços-do-mar tipicamente são considerados altamente permeáveis (Péqueux, 1995), com entrada ou saída de água de todos os compartimentos do animal em pouco tempo, dissipando gradientes (Diehl, 1986; Stickle e Diehl, 1987). Esperava-se assim que as estruturas internas sofressem tanto com o estresse salino quanto as estruturas externas, uma vez que foram analisadas após 5 dias (25‰) ou 2 dias (45‰). Dados da osmolalidade dos aquários controles (35‰), dos aquários experimentais (25‰ e 45‰), bem como do fluido celômico de *E.*

lucunter mostraram que após 6 horas já existe osmoconformação do fluido celômico perivisceral (Vidolin, 2003). A osmolalidade das águas dos aquários de Vidolin (2003) a 35‰, 25‰ e 45‰ foi de 1037, 762 e 1370 mOsm.kgH₂O⁻¹, respectivamente. Ouriços *E. lucunter* da mesma população de entre-marés estudada aqui, após 6 horas nestas águas, apresentaram os seguintes valores médios de osmolalidade: 1050, 780 e 1317 mOsm.kgH₂O⁻¹ (Vidolin, 2003). Para os ouriços de sublitoral da mesma população estudada aqui, as osmolalidades das águas foram de: 1011, 770 e 1381 mOsm.kgH₂O⁻¹, e a osmolalidade do fluido celômico: 1050, 733 e 1332 mOsm.KgH₂O⁻¹ (Vidolin, 2003). Portanto, após 5 dias ou 40 horas nas salinidades experimentais, tanto tecidos externos quanto internos estariam banhados por fluido aproximadamente isosmótico às águas do mar experimentais. A preservação diferente para órgãos internos pode ser devido a diferenças nas permeabilidades osmóticas dos tecidos específicos e/ou certa regulação da composição iônica de fluidos internos (Binyon, 1962; Prusch, 1977; Warnau *et al.*, 1998). De fato diferenças na composição iônica de fluidos de equinodermos foram relatadas na literatura. A composição iônica do líquido luminal do intestino do ouriço *Lytechinus variegatus* difere significativamente do fluido celômico perivisceral e da água circundante (Bishop *et al.*, 1994), sugerindo alguma regulação iônica. Gradientes iônicos entre o fluido celômico perivisceral e a água do mar foram também verificadas para *Lytechinus variegatus* e *Echinometra lucunter*. Esta última espécie, por exemplo, quando submetida por 5 dias à água do mar diluída (25‰) apresentou a concentração de cloreto do fluido celômico 20 mM maior do que a da água (Vidolin, 2003).

Dados sobre a função e a estrutura dos pés branquiais de ouriços-do-mar são escassos na literatura. A circulação do fluido perifaríngeo no lúmen dos pés branquiais depende do movimento da lanterna de Aristóteles, impulsionando o fluido para dentro e para fora das brânquias (Hanson e Gust, 1986; Cavey e Märkel, 1994). Apesar do seu nome, a função respiratória deste órgão é controversa, porque estas estruturas representam uma superfície pequena no corpo do animal quando comparada por

exemplo, com a superfície ocupada pelos pés ambulacrais (Cobb e Sneddon, 1977). Além disso, os pés branquiais estão posicionados em contato com o substrato, onde ocorre limitado movimento de água. Os animais que habitam locas na região de entre-marés apresentariam maior dificuldade ainda para realizar troca de gases por estas estruturas, devido ao menor movimento da água circundante. Um outro fator que limita a passagem de gases por difusão está no fato do tecido ser bastante espesso, conforme observado na Figura 9. Brânquias são estruturas de interface entre o corpo do animal e a água circundante, portanto devem possuir epitélio fino, para possibilitar a difusão de gases para o interior do corpo (Schmidt-Nielsen, 1996); esta espessura fina não se observa neste tecido o que alerta para a inadequação do seu nome. Contudo, os pés branquiais parecem desempenhar função excretora: apresentam no seu tecido celomócitos fagocíticos. Estas células apareceram no lúmen dos pés branquiais e entre as células epiteliais externas e no tecido conjuntivo do pé branquial, sugerindo trânsito celular entre o lúmen e o meio externo, compatível com as hipóteses de função excretora, assim como as descritas para as brânquias de *Echinus esculentus* (Cobb e Sneddon, 1977). A excreção realizada nas brânquias peristomiais foi ainda reforçada pela identificação de porções branquiais com inclusões citoplasmáticas autotomizadas por contrações musculares fortes (Binyon, 1972). Entretanto, como estes mecanismos são desencadeados ainda permanece desconhecido. Os equinodermos não apresentam um órgão excretor especializado, esta função excretora realizada por celomócitos fagocíticos que migram através dos tecidos é observada não somente nos pés branquiais, como também em outros tecidos (Holland e Ghiselin, 1970; Bachmann *et al.*, 1980). A exteriorização destas células excretoras é explicada por sua migração positiva para o oxigênio (Booolootian, 1966). Os celomócitos fagocíticos excretores muitas vezes ocorrem sob a forma de “células mórula”, que são células fagocíticas livres, grandes, com grânulos e vacúolos no citoplasma (Coleman, 1969; Fontaine e Lambert, 1977), ou como células menores do tipo leucócitos. A presença de celomócitos no lúmen e entre as células epiteliais dos pés branquiais e pés ambulacrais,

bem como no lúmen das ampolas do sistema ambulacral e entre as células epiteliais do reto em *E. lucunter* confirma os seus locais de origem: na parede celômica, nas camadas epiteliais do sistema vascular aquífero, nos ductos hemais e no órgão axial (Bossche e Jangoux, 1976; Bachmann e Goldschmid, 1978; Bachmann *et al.*, 1980; Cavey e Märkel, 1994). Independentemente do seu local de produção, estes celomócitos tornam-se fagocíticos e são exteriorizados em função excretora ou podem permanecer no corpo do animal com o material fagocitado formando corpos residuais. Em *E. lucunter* o acúmulo de celomócitos (não diferenciados como células mórula) observados no lúmen dos pés branquiais e pés ambulacrais dos animais submetidos ao meio hiperosmótico sugere resposta ao estresse. Na parede celômica do sistema ambulacral e no reto não foi observada relação entre a presença de celomócitos e a salinidade.

As células epiteliais externas dos pés branquiais e pés ambulacrais de *E. lucunter*, que ficam em contato direto com a água do mar, apresentaram microvilos, como os descritos para outros ouriços (Fenner, 1973; Cobb e Sneddon, 1977). Os microvilos são projeções citoplasmáticas na superfície celular que ampliam a área para transporte de substâncias (Alberts *et al.*, 1997). A presença de microvilos sugere que estas células epiteliais façam transporte de moléculas dissolvidas. As células epiteliais apresentaram no citoplasma vesículas pouco elétron-densas, que em alguns locais mostraram-se em fusão com a membrana externa. Estas vesículas contêm grânulos de muco que ao serem externalizados formam uma cutícula (Coleman, 1969; Santos e Sasso, 1970; Florey e Cahill, 1977; Hajduk, 1992), também observadas em *E. lucunter*. A diluição da água do mar não afetou os pés branquiais e pés ambulacrais alterando a densidade de vesículas com muco. A necessidade de proteger o epitélio está de acordo com a maior densidade de vesículas nos animais expostos a água do mar concentrada. O fato dos animais de sublitoral não apresentarem vesículas de muco nos pés ambulacrais sugere que eles já teriam eliminado este muco, e que estariam em processo mais adiantado de estresse osmótico do que os animais de entre-marés. No citoplasma destas

células epiteliais, dos pés branquiais e ambulacrais, subjacentes aos microvilos pareceram mitocôndrias, porém em pequena quantidade, não condizente com significativa função de transporte ativo de íons.

A movimentação de fluidos de vários órgãos dentro do corpo dos ouriços depende de batimentos ciliares dos epitélios. Porém, no caso do fluido interno do sistema peristomial dos pés branquiais, a maior contribuição é do deslocamento da lanterna de Aristóteles (Hanson e Gust, 1986). Células luminais ciliadas contribuem em maior ou menor grau para dirigir o fluxo de fluido em compartimentos fechados (Fenner, 1973; Hanson e Gust, 1986), e são encontradas nos epitélios luminais dos pés branquiais, pés ambulacrais e nos epitélios luminal e externo da parede celômica em *E. lucunter*. O epitélio luminal dos pés branquiais e da parede celômica apresentou células com cílios individualmente rodeados por um anel de microvilos, formando estruturas sensoriais epidérmicas (Cavey e Märkel, 1994). O epitélio luminal dos pés ambulacrais de *E. lucunter* apresentou células com poucos cílios, pois os pés ambulacrais observados aqui foram os da região oral da carapaça, de função locomotora (Hyman, 1955; Coleman, 1969; Fenner, 1973). O maior número de cílios atuando no movimento de fluido do sistema ambulacral é encontrado nas células luminais dos pés ambulacrais, não locomotores, que são os pés adaptados para respiração, localizados na face aboral, posição favorável para a captação de gases (Fenner, 1973). Nas ampolas do sistema ambulacral, o epitélio externo que fica voltado para o fluido celômico perivisceral de *E. lucunter* apresentou células com poucos cílios, de forma já relatada (Hanson e Gust, 1986).

A parede celômica do sistema ambulacral apresentou ampolas divididas por septos formando compartimentos (Fenner, 1973). A presença de celomócitos dentro das ampolas mesmo nos animais controles provavelmente é uma condição normal para os animais, uma vez que este tecido é também produtor e liberador de celomócitos (Bossche e Jangoux, 1976; Bachmann e Goldschmid, 1978; Bachmann *et al.*, 1980; Cavey e Märkel, 1994). Os músculos das ampolas são do tipo esquelético e circular,

agindo de modo antagonista aos músculos longitudinais viscerais dos pés ambulacrais (Florey e Cahill, 1977; Cobb, 1978). Em relação às salinidades a que foram expostos os ouriços *E. lucunter*, a concentração da água do mar desorganizou as células luminais das ampolas do sistema ambulacral. Nos pés ambulacrais de *E. lucunter* a faixa muscular é bastante larga e associada a axônios, visto que estes pés são utilizados na locomoção e fixação do ouriço no substrato rochoso. Acreditava-se que a manutenção da pressão do fluido ambulacral do sistema vascular aquífero era realizada pela madreporita (Fechter, 1965). Com o aumento na pressão hidráulica ocorrem perdas de fluido ambulacral pelo pé na locomoção e na captura da presas (Binyon, 1976), necessitando de rápida reposição. Entretanto, ouriços com a madreporita obstruída não tiveram as atividades dos pés ambulacrais prejudicadas, indicando outra forma de manter a pressão interna do fluido nestes órgãos (Fechter, 1965; Furguson, 1967; Ferguson, 1996). Estudos sobre a fisiologia de equinodermos têm demonstrado sua capacidade de regular o volume do fluido ambulacral com o epitélio dos pés ambulacrais, que secretam ativamente íons como Cl^- e K^+ , contribuindo para a manutenção da pressão hidráulica interna do sistema vascular aquífero (Robertson, 1949; Binyon, 1962; Prusch e Whoriskey, 1976; Prusch, 1977; Eylers, 1982; Diehl, 1986). A concentração destes íons no lúmen indica que este fluido não é apenas água do mar bombeada para dentro do sistema vascular aquífero através da madreporita (Robertson, 1949; Binyon, 1962). A secreção de solutos nos pés livraria a madreporita da função da reposição do fluido ambulacral podendo atuar como órgão quimiossensorial na percepção de ferormônios e de presas (Castilla, 1972; Prusch, 1977; Ferguson, 1996). Há, portanto controvérsias na literatura sobre a função da madreporita no sistema vascular aquífero. Independentemente da relevância da madreporita, não foi detectada aqui evidência ultra-estrutural da participação do epitélio dos pés ambulacrais (pelos menos os orais) em transporte ativo de íons.

Outro tecido de equinodermos aparentemente envolvido em transporte iônico e em transporte de natureza excretora é o da parte posterior do intestino (Warnau *et al.*,

1998; Warnau e Jangoux, 1999). E de fato, além da já discutida presença de celomócitos fagocíticos do tipo “célula mórula” em densidade e localização compatível com sua migração transtecidual, atuando na excreção, este foi o único tecido a apresentar mitocôndrias em alta densidade e microvilos, compatível com transporte ativo de íons inorgânicos ou moléculas orgânicas. A porção posterior do intestino de outros equinodermos foi comparada ao túbulo proximal do rim de vertebrados, por apresentarem borda em escova e dobramentos de membranas associados a mitocôndrias alongadas (Warnau *et al.*, 1998; Warnau e Jangoux, 1999). Dobramentos de membrana associados às mitocôndrias não foram observados em *E. lucunter*; porque não foi possível examinar a porção basolateral do epitélio. Para ocorrer transporte ativo de solutos são necessárias proteínas carreadoras ou canais e há demanda de ATP para as bombas Na^+/K^+ ATPases ou H^+ -ATPases gerarem os gradientes eletroquímicos primários que energizam os outros fluxos (Beyenbach, 2001). A osmolalidade do fluido intestinal do ouriço *S. droebachiensis* é 20% mais alta do que a do fluido celômico (Lange, 1964), resultado também encontrado por Bishop *et al.* (1994) no ouriço *L. variegatus*, embora a diferença de osmolalidade em *L. variegatus* não tenha sido tão grande. Os enterócitos do reto de *E. lucunter* apresentaram acúmulo intracelular de vesículas de muco que produzem o glicocálix associado à membrana. As funções do muco são de lubrificar o lúmen para proteção, facilitando a passagem de alimento, talvez retardar movimentos de água e íons bem como de bloquear a entrada de substâncias estranhas no epitélio (Holland e Ghiselin, 1970). O reto de ouriços *E. lucunter* expostos ao meio hipersalino apresentou células luminais desprendendo para o lúmen sugerindo resposta ao grande estresse, com ausência dos microvilos.

As observações histológicas (morfológicas) e ultra-estruturais dos pés branquiais, pés ambulacrais, da parede celômica do sistema ambulacral e do reto indicam que a população de entre-marés foi mais tolerante ao estresse salino no que diz respeito à integridade dos seus tecidos, em relação aos ouriços da população de sublitoral. As duas populações estudadas distam 145,5 km entre si, o que provavelmente não

impediria fluxo gênico entre elas, dado o grau de dispersão das larvas planctônicas dos equinodermos pelas correntes marinhas. Se as diferenças ecológicas entre as duas populações são acompanhadas por significativas diferenças genéticas, este estudo não pôde responder, e estudos adicionais seriam necessários. As duas populações mostraram-se bem mais sensíveis à água concentrada. Dos quatro tecidos analisados em *E. lucunter* apenas o reto apresentou epitélio com mitocôndrias em densidade compatível com transporte transepitelial ativo. Apesar da alta permeabilidade geral esperada para estes invertebrados marinhos osmoconformadores, os tecidos internos nas duas populações apresentaram-se mais preservados do que os externos. A exposição à redução ou aumento da salinidade não resultou em alterações ultra-estruturais nos tecidos estudados, indicativas de algum mecanismo do transporte de sal, que resultaria em regulação osmótica e/ou iônica. Foi percebida apenas a gravidade do efeito da saída osmótica de água quando os ouriços foram expostos a água do mar concentrada. Ficou evidente a maior capacidade de regular volume celular diante da entrada osmótica de água.

6 CONCLUSÕES

- 1) A população da zona de marés apresentou maior resistência ao estresse salino, provavelmente por habitar regiões com alteração diária na salinidade:
- 2) Os ouriços *Echinometra lucunter* da população de zona de marés e de sublitoral mostraram maior tolerância à água do mar diluída (25‰) do que à água do mar concentrada (45‰);
- 3) As duas populações apresentaram os tecidos internos mais resistentes à mudança de salinidade da água do que os tecidos externos;
- 4) Todos os 4 tecidos analisados, os pés branquiais, os pés ambulacrais, a parede celômica do sistema ambulacral e o reto apresentaram celomócitos fagocíticos livres, de aparente função excretora;
- 5) Dos quatro tecidos apenas o reto evidenciou características morfológicas compatíveis com função de transporte transepitelial ativo, e não houve indicação de alteração adaptativa induzida pela salinidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. M. *Fisiologia*. 1. ed. São Paulo: Guanabara Koogan. 1991.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Biologia Molecular da Célula*. 3^a ed., Editora Artes Médicas. 1997.
- BACHMANN, S.; GOLDSCHMID, A. Fine structure of the axial complex of *Sphaerechinus granularis* (Lam.) (Echinodermata: Echinoidea). *Cell Tiss. Res.* 193:107-123, 1978.
- BACHMANN, S.; POHLA, H.; GOLDSCHMID, A. Phagocytes in the axial complex of the sea urchin, *Sphaerechinus granularis* (Lam.). *Cell Tiss. Res.* 213:109-120, 1980.
- BARNES, R. S. K.; OLIVE, P. J. W. *Os invertebrados – uma nova síntese*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1995.
- BEYENBACH, K. W. Energizing epithelial transport with the vacuolar H⁺-ATPase. *News Physiol. Sci.* 16: 145-151, 2001.
- BINYON, J. Ionic regulation and mode of adjustment to reduced salinity of the starfish *Asterias rubens*. *Mar. Biol. Ass. U.K.*, 42: 49-69, 1962.
- BINYON, J. *Physiology of Echinoderms*. Oxford: Pergamon, 1972.
- BINYON, J. The permeability of the asteroid podial wall to water and potassium ions. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 56: 639-647, 1976b.
- BISHOP, C. D.; LEE, K. J.; WATTS, S. A. 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.* 128A: 497-502, 1994.
- BOOLOOTIAN, R. A. *Physiology of Echinodermata*. New York, London, Sydney: Interscience, 1966.
- BOSSCHE, J. P. V.; JANGOUX, M. Epithelial origin of starfish coelomocytes. *Nature*. 261:227-228, 1976.
- BRUSCA, R. C. & BRUSCA, G. J. *Invertebrates*. Massachussets: Sinauer Associates, 1990.

- CALTILLA, J. C. Responses of *Asterias rubens* to bivalve prey in a Y-maze. *Mar. Biol.* 12: 222-228, 1972.
- CASTRO, C. B.; ECHEVERRIA, C. A.; PIRES, D. O.; MASCARENHAS, B. J. A.; FREITAS, S. G. Distribuição de Cnidaria e Echinodermata no infralitoral de costões rochosos de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Biol.* 5: 471-480, 1995.
- CAVEY, M. J.; MÄRKEL, K. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Volume 14: Echinodermata, pages 345-400, Wiley-Liss, Inc. 1994.
- COBB, J. L. S.; SNEDDON, E. An ultra-structural study of the gills of *Echinus esculentus*. *Cell Tiss. Res.* 182: 265-274, 1977.
- COBB, J. L. S. An ultrastructural study of the dermal papulae of the starfish, *Asterias rubens*, with special reference to innervation of the muscles. *Cell Tiss. Res.* 187:515-523, 1978.
- COLEMAN, R. Ultrastructure of the tube foot wall of a regular echinoid, *Diadema Antillarum Philippi*. *Z. Zellforsch.* 96: 162-172, 1969.
- DIEHL, W. J. Osmoregulation in echinoderms. *Comp. Biochem. Physiol.* 84A (2): 199-205, 1986.
- DROUIN, G.; HIMMELMAN, J. H.; BÉLAND, P. Impact of tidal salinity fluctuations on echinoderm and mollusc populations. *Can. J. Zool.* 63:1377-1387, 1985.
- EYCLERS, J. P. Ion-dependent viscosity of holothurian body wall and its implications for the functional morphology of echinoderms. *J. Exp. Biol.* 99: 1-8, 1982.
- FECHTER, H. Über die funktion der madreporenplatte der Echinoidea. *Z. Verg. Physiol.* 51: 227-257, 1965.
- FENNER, D. H. The respiratory adaptations of the podia and ampullae of echinoids (ECHINODERMATA). *Biol. Bull.* 145: 323-339, 1973.
- FERGUSON, J. C. Madreporite function and fluid volume relationships in sea urchins. *Biol. Bull.* 191: 431-440, 1996.

- FREIRE, C. A.; McNAMARA, J. C. Fine structure of the gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda): effect of acclimation to high salinity medium and evidence for involvement of the lamellar septum in ion uptake. *J. Crust. Biol.* 15.(1): 103-116, 1995.
- FLOREY, E.; CAHILL, M. A. Ultrastructure of sea urchin tube feet. *Cell Tiss. Res.* 177: 195-214, 1977.
- FONTAINE, A. R.; LAMBERT, P. The fine structure of the leucocytes of the holothurian, *Cucumaria miniata*. *Canad. J. Zool.* 55,1530-1544, 1977.
- FURGUSON, J. C. An autoradiographic study of the utilization of free exogenous amino acids by starfishes. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole* 133, 317-329, 1967.
- GOMES, M. G. S. *Fisioecologia do ouriço-do-mar Echinometra lucunter (L. 1758) – Echinodermata: Echinoidea – consumo de oxigênio e resistência às variações de salinidade*. Dissertação de mestrado, São Paulo, 1973.
- HAJDUK, S. L. Ultrastructure of the tube-foot of an ophiuroid echinoderm, *Hemipholis elongata*. *Tissue and Cell* 24 (1): 111-120, 1992.
- HANSON, J. L.; GUST, G. Circulation of perivisceral fluid in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Mar. Biol.* 92: 125-134, 1986.
- HENDLER, G.; MILLER, J. E.; PAWSON, D. L.; KIER, P. M. *Echinoderms of Florida and the Caribbean: Sea Stars, Sea Urchins, and Alleis*. Smithsonian Institution Press. Washington and London, 1995.
- HIDAKA, M. 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, 1983.
- HOLLAND, N. D.; GUISELIN, M. T. A comparative study of gut mucous cells in thirty-seven species of the class echinoidea (ECHINODERMATA). *Biol. Bull.* 138: 286-305, 1970.
- HYMAN, H. L. *The Invertebrates: Echinodermata*. Vol. IV. New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1955.

- KÜKENTAL, W.; MATHES, E.; RENNER, M. *Guia de trabalhos práticos de zoologia*. 19 ed. Coimbra: Almeida. 1986.
- LANGE, R. The osmotic adjustment in the echinoderm. *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 13: 205-216, 1964.
- LAWRENCE, J. *A functional biology of echinoderms*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1987.
- LEAKE, D. L. *Comparative histology na introduction to the microscopic structure of animals*. London: Academic Press, 1975.
- McPHERSON, B. F. Studies on the biology of the tropical sea urchins. *Echinometra lucunter* and *Echinometra viridis*. *Bull. of Mar. Sci.* 19 (1): 194-213, 1969.
- MILLOTT, N. A possible function for the axial organ of echinoids. *Nature*. 209: 594-596, 1966.
- MILLOTT, N.; FARMANFARMAIAN, A. Regeneration of the axial organ of *Arbacia punctulata* and its implications. *Nature*. 216: 1136-1138, 1967.
- MOTOKAWA, T. Effects of ionic environment on viscosity of triton- extracted catch connective tissue of a sea cucumber body wall. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B: 613-622, 1994.
- NEWTON, C.; POTTS, W. T. W. Ionic regulation and buoyancy in some planktonic organisms. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 73: 15-23, 1993.
- NYBAKKEN, J. W. *Marine Biology. An ecological approach*. 2^a ed. New York: Harper Collins Publishers, 1988.
- PAGETT, R. M. Distribution of sodium, potassium and chloride in the ophiuroid, *Ophiocomina nigra* (Abildgaard). *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 60: 163-170, 1980.
- PÉQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15: 1-60, 1995.
- PRUSCH, R. D.; WHORISKEY, F. Maintenance of fluid volume in the starfish water vascular system. *Nature*. 262:577-578, 1976.
- PRUSCH, R. D. Solute secretion by the tube foot epithelium in the starfish *Asterias forbesi*. *J. Exp. Biol.* 68: 35-43, 1977.

- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17:208-212, 1963.
- RIBEIRO - COSTA, C. S.; ROCHA, R. M. *Invertebrados Manual de Aulas Práticas*. Holos: Ribeirão Preto, 2002.
- ROBERTSON, J. D. Ion regulation in some marine invertebrates. *J. Exp. Biol.* 26: 182-200, 1949.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. *Zoologia dos Invertebrados*. 6. ed. São Paulo: Roca, 1996.
- SANCHEZ-JÉREZ, P.; CESAR, A.; CORTEZ, F. S.; PEREIRA, C. D. S.; SILVA, S. L. R. Spatial distribution of the most abundant sea urchin populations on the southeast coast of São Paulo (Brazil). *Ciencias Marinas*. 27 (1): 139-153, 2001.
- SANTOS, H. S.; SASSO, W. S. Ultrastructural and histochemical studies on the epithelium revestment layer in the tube feet on the starfish *Asterina stellifera*. *J. Morph.* 130: 287-296, 1970.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. *Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente*. 5. ed. São Paulo: Santos, 1996.
- STICKLE, W. B.; AHOKAS, R. The effects of tidal fluctuation of salinity on the perivisceral fluid composition of several echinoderms. *Comp. Biochem. Physiol.* 47A: 469-476, 1974.
- STICKLE, W. B.; DIEHL, W. J. Effects of salinity on echinoderms. In *Echinoderm Studies II (Edited by Jangoux M. and Lawrence J. M.)*, A. A. Balkema, Rotterdam, 235-285, 1987.
- STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. *Zoologia Geral*. 6^a. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1991.
- TOPPING, F. I.; FULLER, J. L. The accommodation of some marine invertebrates to reduced osmotic pressure. *Biol. Bull. Wood's Hole*. 82: 372-384, 1942.
- TROTTER, J. A.; CHINO, K. Regulation of cell-dependent viscosity in the dermis of the sea cucumber *Actinopyga agassizi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 118 A (3):805-811, 1997.

- VIDOLIN, D. *Tolerância à redução de salinidade no ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea)*. Monografia de especialização em Fisiologia. 2000.
- VIDOLIN, D. *Composição do fluido celômico do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* L. 1758 (ECHINODERMATA: ECHINOIDEA) diante de variações de salinidade, comparando uma população de zona entre-marés com uma população de sublitoral*. Dissertação de mestrado, 2003.
- VIDOLIN, D.; SANTOS-GOUVEA, I. A.; FREIRE, C. A. Stability of osmotic and ionic concentrations in the coelomic fluid of a starfish and a sea cucumber (ECHINODERMATA) in the pools during low tide: a field study. *Mar. Biol.* Submetido.
- VILLEE, C. A. ; WALKER Jr., W. F.; BARNES, R. D. Zoologia geral. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.
- WARNAU, M; JANGOUX, M. Fine structure of the upper part of the axial complex (head process and dorsal sac) in the asteroid *Asterias rubens* L. (Echinodermata). *Proceedings of the 3d European Conference on Echinoderms. Lecce/ Italy*, 1991.
- WARNAU, M.; TEMARA, A.; AMEYE, L.; JANGOUX, M. The excretory function of the posteriormost part of the echinoid and holothuroid gut (Echinodermata). *Comp. Biochem. Physiol.* 120A:687-691, 1998.
- WARNAU, M; JANGOUX, M. 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, 1999.
- WELSCH, U.; REHKÄMPER, G. Podocytes in the organ of echinoderms. *J. Zool.* 213: 45-50, 1987.
- WILKIE, IAIN C.; CARNEVALI, M. D. C.; ANDRIETTI, F. Microarchitecture and mechanics of the sea-urchin peristomial membrane. *Boll. Zool.* 61: 39-51, 1994.