



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ
CURSO DE FARMÁCIA



Regulação da produção de Óxido Nítrico nas células de defesa (hemócitos) da
ascídia *Phallusia nigra*: aspectos da via de sinalização.

LAURA CARRIELLO EMRICH

MACAÉ
DEZEMBRO DE 2013

LAURA CARRIELLO EMRICH

Título: Regulação da produção de Óxido Nítrico nas células de defesa (hemócitos) da ascídia *Phallusia nigra*: aspectos da via de sinalização.

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Cintia Monteiro de Barros

MACAÉ
DEZEMBRO DE 2013

E55

Emrich, Laura Carriello.

Regulação da produção de Óxido Nítrico nas células de defesa (hemócitos) da ascídia *Phallusia nigra*: aspectos da via de sinalização/Laura Carriello Emrich . - Macaé: [s. n.], 2013.
56 f. : il.

Orientador: Cintia Monteiro de Barros.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Campus Macaé - Macaé, 2013.
Bibliografia: f. 49.

1. Ascídias. 2. Hemócitos. 3. Óxido nítrico.
I. Barros, Cintia Monteiro de. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Campus Macaé. IV. Título.

CDD 571.63

AGRADECIMENTOS

À minha família por sempre acreditar e investir em mim. Aos meus Pais, Luciana e José Henrique pelo amor, carinho e paciência, a eles devo tudo o que sou. Pai e Mãe, por tudo o que fizeram e fazem por mim, não bastaria um obrigada. Pelo afeto e dedicação, não bastaria um muito obrigada. Não bastaria dizer também que não tenho palavras para agradecer a tudo isso, mas é o que acontece agora quando procuro as palavras certas. Dedico todos esses anos a vocês e ao meu irmão, Henrique. Meu irmão, muito obrigada por fazer parte da minha vida e estar sempre ao meu lado.

Às primeiras pessoas que me ajudaram, e muito, quando mudei para Macaé, em especial, ao meu avô emprestado, José Ladeira (*in memoriam*) e Dona Penha, que me receberam de braços abertos e dispostos a me ajudar em tudo o que eu precisasse. À Tia Betty e Tio Zezinho, que me emprestaram a casa para que eu pudesse morar em Macaé, e não só por isso, mas também Tia, por mandar as comidas maravilhosas e por todo apoio e Tio Zezinho por me carregar pra cima e pra baixo e fazer todas as minhas vontades. À minha avó Dilma, exemplo de perseverança e amor, por todos esses anos que me ajudou e acreditou em mim. Sem você, Vó, eu não teria chegado até aqui. Vocês foram fundamentais para que eu conseguisse iniciar e concluir minha formação. Muito obrigada!

Ao meu avô Athaydes, “vô Tayde”, pelo amor e todos os anos que passamos juntos, nos divertindo no sítio. A minha Vó Nelia, com sua alegria de viver, por sempre me incentivar ajudar e me ouvir por horas no telefone. Ao meu avô Luiz Félix, ou melhor, vovô Zito, por toda preocupação e carinho dedicado a mim. Vovó Nelia e vovô Zito, obrigada por virem até Macaé ajudar em uma das minha mudanças! Agradeço todos os dias por ter conhecido e por poder conviver com todos vocês, meu avós!

À minha Tia e Dinda Karina, por sempre se preocupar comigo como uma mãe, Tia Ciça, Tia Ana, minha outra Dinda e Tia, Ludmila, aos meus Tios Marcelo, Tio Felix, Daniel, Tio Lídio e meu outro Tio Marcelo, obrigada por sempre me apoiarem e por toda ajuda dada, também, no início da faculdade.

Ao meu Dindo, Luiz Cláudio, por todo afeto e carinho.

Às minhas primas Natalia, Marina, Ana Clara e Luísa. Nat, obrigada nessa etapa final. Aos meus primos Leonardo, Léo você sabe o quanto me ajudou também, Mateus, Neto e Antônio. Obrigada por vocês existirem e pela nossa amizade.

Ao meu amor, meu companheiro e meu amigo, João Felipe. Obrigada primeiramente pela paciência comigo e com os afazeres da faculdade, obrigada por me fazer sorrir todos os dias e não me deixar desanimar, obrigada por fazer tudo o que pode por mim e muito obrigada por fazer parte da minha vida!

Aos meus amigos, vizinhos, companheiros pra todas as horas, Ingrid e Jailson, obrigada pelos momentos alegres, pelas gargalhadas e por todas as quartas-feiras!

Aos amigos Mabelle e Bruno, obrigada por compreenderem a distância, física, criada pela faculdade, mas vocês sabem que estão sempre presentes em minha vida.

À Arlene, que antes de ser minha futura sogra é muito mais do que uma amiga. Obrigada por me aturar, praticamente, todos os dias na sua casa, me ouvir, me divertir e ser essa ótima companhia!

Às amigas Thamara, Mariana, Thamyres, Livia, Catarina, Silvia, Sandra e Luana que fizeram e fazem parte da minha caminhada.

Aos meus tios emprestados, Tia Tereza e Tio Dalmo, por fazerem parte da minha criação.

À minha orientadora e professora, Cintia, que desde o terceiro período me recebeu de braços abertos. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos, pela confiança e oportunidade. Cintia, tenho muito orgulho de ter sido sua aluna!

A todos do Laboratório Integrado de Morfologia no NUPEM, por sempre ajudarem nos experimentos, coletas e pelos momentos de alegria. Em especial, meus agradecimentos para Andressa pelas constantes ajudas.

A todos os alunos e professores do NUPEM, que de certa forma me ajudaram a realizar esse projeto.

Aos professores Dr. Rodrigo Nunes da Fonseca e Dr. José Roberto da Silva, por aceitarem o convite para participar da banca examinadora e por todas as vezes que me auxiliaram.

Aos todos os professores, alunos da faculdade e da minha turma.

À FAPERJ e a FUNEMAC pela verba disponibilizada para a realização dessa pesquisa.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1** - Representação esquemática da anatomia funcional da ascídia. As setas indicam o trajeto da corrente de água. Fonte: BARNES, 2005. 14
- Figura 2** - Isoformas da NOS. Retirado de: DUSSE et al., 2003. 19
- Figura 3** - Reação catalisada pela NOS Retirado de: DUSSE et al., 2003. 19
- Figura 4** - Supostos ligantes para TLRs. O TLR2 reconhece Zymosan e TLR4 reconhece LPS. (Adaptado de: TAKEUCHI, 2001) 21
- Figura 5** - Visão de vias de sinalização do TLR. A presença de componentes bacterianos desencadeia a ativação sequencial de uma sinalização em cascata que conduz à translocação de NF- κ B (Adaptado de: TAKEUCHI, 2001). 22
- Figura 6** - Ascídia *Phallusia nigra*. Foto: Laura Carriello Emrich, NUPEM - UFRJ..... 23
- Figura 7** - Esquema de reações para a detecção de óxido nítrico (NO) por DAF-FM e diacetato DAF-FM (Adaptado de: KOJIMA et al., 1998 a; KOJIMA et al., 1998 b). 27
- Figura 8** - Micrografia dos Hemócitos corados com Hematoxilina & Eosina (A, C, E, G, I, K, M, O) e Azul de Toluidina (B, D, F, H, J, L, N,P). Fig. A e B Hemoblasto (3,4 μ m); C e D Célula em anel de sinete (4,0 μ m); E e F Célula compartimentar (7,65 μ m); G e H Granulócito refrátil univacuolar (6,1 μ m); I e J células do tipo mórula (9,5 μ m); K e L Célula pigmentar (4,5 μ m); M e N nefrócito (7,1 μ m) e O e P Amebócito (11,6 μ m). Barra de escala: 10 μ m. 34
- Figura 9** - Ultraestrutura dos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra* A) Hemoblasto; B) Célula em anel de sinete; C) Célula compartimentar; D) Maior aumento da célula compartimentar; E) Granulócito refrátil univacuolar; F) Célula do tipo Morula; G) Célula pigmentar; H) Célula Pigmentar; Inserto: Microtúbulos; I) Nefrócito; J) Amebócito. Barra de escala: 1 μ m. 35
- Figura 10** - Produção de NO pelos hemócitos da ascídia *P. nigra* incubados com várias concentrações de Zymosan A durante 120 minutos. 36
- Figura 11** - Produção de NO pelos hemócitos da ascídia *P. nigra* incubados com várias concentrações de LPS durante 120 minutos. 37
- Figura 12** - Imunofluorescência com anticorpo contra iNOS nos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*. A, C) Controle sem o anticorpo primário, B, D) Hemócitos marcados

para iNOS, em coloração vermelha, e a marcação nuclear (DAPI) em coloração azul. Barras de escala: A, B) 50µm; C, D), 20 µm.....	38
Figura 13 - Imunofluorescência para NOS. Célula do tipo Mórula . a) Sem estímulo; b) Estimulada com LPS; c) Estimulada com Zymosan A. Coloração azul: DAPI; Coloração vermelha: anti-iNOS. Barra de escala: 5 µm.	38
Figura 14 - Efeitos da inibição da enzima NOS, pelo composto L-NAME, nos hemócitos da ascídia <i>P. nigra</i> estimulados com Zymosan A	39
Figura 15 - Efeitos da inibição da enzima NOS, pelo composto L-NAME, nos hemócitos da ascídia <i>P. nigra</i> estimulados com LPS.....	40
Figura 16 - Efeitos do NO exógeno na produção de NO nos hemócitos da <i>P. nigra</i> estimulados com Zymosan A.....	40
Figura 17 - Efeitos do NO exógeno na produção de NO nos hemócitos da <i>P. nigra</i> estimulados com LPS.....	41
Figura 18 - Efeitos da inibição da PKC, sobre a produção de NO, nos hemócitos da ascídia <i>P. nigra</i> estimulados com Zymosan A.	42
Figura 19 - Efeitos da inibição da PKC, sobre a produção de NO, nos hemócitos da ascídia <i>P. nigra</i> estimulados com LPS.	42
Figura 20 - Efeitos da inibição da PKA, sobre a produção de NO, nos hemócitos da <i>P. nigra</i> estimulados com Zymosan A.....	43
Figura 21 - Efeitos da inibição da PKA, sobre a produção de NO, nos hemócitos da <i>P. nigra</i> estimulados com LPS.....	43
Figura 22 - imunoletromicroscopia com anticorpo anti- NFkB nos hemócitos da ascídia <i>Phallusia nigra</i> . (A) Controle negativo; (B) Controle positivo sem estímulo de LPS ou Zymosan A; (C) Estimulado com LPS; (D) Inibidor de PCK e estimulado com LPS, (E) Estimulado com Zymosan A; (F) Inibidor de PKA e estimulado com Zymosan A. Barra de escala: 10 µm.....	45
Tabela 1 - Análise da viabilidade celular. Valores em porcentagem mostram as células viáveis.	47

LISTA DE ABREVIACOES

ASW – gua do Mar Artificial

BH4 – Tetraidrobiopterina

cNOS – xido Nítrico Sintase Constitutiva

DAF-FM DA - Diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluororescena

DETA/NO - Dietilenotriamina/ xido nítrico

eNOS - xido Nítrico Sintase Endotelial (isoforma constitutiva)

ERK - Sinal Extracelular Regulado por Quinase

FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo

FMN - Flavina Mononucleotdeo

H&E – Hematoxilina e Eosina

iNOS - xido Nítrico Sintase Induzível

JNK - c-jun-N-terminal

L-NA - N^G-nitro- L-arginina

L-NAA - N^G-amino-L-arginina

L-NAME - N^G-nitro-L-arginina-metil-ster

L-NIO - N-imino-etil-Lornitina

L-NMMA N^G-monometil-L-arginina

LPS – Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

MAC – Tampão Marinho Anticoagulante

MAPK - Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

NF-B – Fator Nuclear kappa B

NHA - N^G-Hidroxil-L-Arginina

nNOS - xido Nítrico Sintase Neuronal (isoforma constitutiva)

NO – xido Nítrico

NOS – xido Nítrico Sintase

PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS - Tampão Fosfato Salino

PKA – Proteína Quinase A

PKC- Proteína Quinase C

PMA – Acetato Miristato de Forbol

TLR – Receptor Semelhante a *Toll*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 - Aspectos Gerais	12
1.2 – Aspectos Gerais das Ascídias	13
1.2.1 - <i>Taxonomia</i>	13
1.2.2 – <i>Anatomia</i>	14
1.2.3 - <i>Sistema Imunológico e hemócitos</i>	15
1.2.3.1 – <i>Classificação do hemócitos</i>	16
1.2.3.2 – <i>Hemócitos e óxido nítrico</i>	17
1.3 - Via de Sinalização da Produção de NO	20
1.4 – Modelo de estudo: ascídia <i>Phallusia nigra</i>	23
1.4.1 – <i>Taxonomia P. nigra</i>	23
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 - Objetivo Geral	25
3.1.1 - <i>Objetivos específicos</i>	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 - Obtenção das ascídias	26
4.2 - Isolamento dos hemócitos	26
4.3 - Caracterização morfológica dos hemócitos da ascídia <i>P. nigra</i>	26
4.3.1 - <i>Microscopia de luz</i>	26
4.3.2 <i>Microscopia eletrônica</i>	27
4.4 - Quantificação da produção de NO, pelos hemócitos, frente a estímulos	27
4.5 - Identificação do(s) hemócito(s) produtor (es) de NO	28
4.5.1 - <i>Imunofluorescência para iNOS</i>	28
4.6 - Identificação da via de sinalização envolvida na produção de NO pelos hemócitos da ascídia <i>P. nigra</i>	28
4.6.1 - <i>L-NAME e DETA/NO</i>	28
4.6.2 - <i>Envolvimento de proteínas quinases</i>	29
4.6.3 - <i>Imunofluorescência para NF-κB</i>	29
4.7 - Análise estatística	29
4.8 - Análise da Viabilidade Celular	29

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1 - Caracterização morfológica dos hemócitos da ascídia <i>P. nigra</i>	31
5.2 - Quantificação da produção de NO pelos hemócitos frente a estímulos	36
5.3 - Identificação do(s) hemócito(s) produtor(es) de NO	38
5.4 - Identificação da via de sinalização envolvida na produção de NO pelos hemócitos da ascídia <i>P. nigra</i>	39
5.4.1- <i>L-NAME e DETA/NO</i>	39
5.4.2- <i>Envolvimento de proteínas quinases</i>	41
5.4.1 - <i>Imunofluorescência para NF-κB</i>	44
5.5 - Análise da Viabilidade Celular	47
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é um gás obtido através da oxidação da L-arginina à L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e é uma importante molécula envolvida na resposta imune inata em vertebrados. Nos invertebrados como as ascídias o NO é produzido por células de defesa, os hemócitos. Este trabalho tem como objetivo Identificar e quantificar a produção de óxido nítrico pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*. Para tal, os hemócitos foram corados com azul de toluidina ou hematoxilina e eosina, ou processados para microscopia eletrônica de transmissão. Foram observados oito tipos principais de hemócitos: hemoblasto; célula em anel de sinete; granulócito refrátil univacuolar; célula compartimentar; célula do tipo mórula; nefrócito; célula pigmentar e amebócito. Em seguida, a produção de NO foi quantificada após adição do marcador específico de NO, DAF-FM DA. Os hemócitos foram estimulados com 5 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* ou Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae*, variando-se o tempo em 30, 60 e 120 minutos. Notou-se que tanto para o LPS como para o Zymosan A houve aumento na produção de NO, em relação ao controle, em todos os tempos e concentrações. Nos ensaios em que foi utilizado o inibidor da NOS, L-NAME, este foi capaz de bloquear a produção de NO induzida por LPS e por Zymosan A. Na utilização de doadores de NO, DETA/NO, observou-se o aumento da produção de NO mais evidente com LPS. Quando os hemócitos foram pré-incubados com inibidores da via de sinalização de proteína quinase C (PKC) ou inibidores de proteína quinase A (PKA) a produção de NO decresceu significativamente para os hemócitos estimulados com LPS e com Zymosan A. Esses dados sugerem que PKA e PKC participam da via de sinalização que regula a ativação de NOS e subsequente produção de NO pelos hemócitos da ascídia *P. nigra*.

Palavras-chave: Ascídia, hemócitos, óxido nítrico.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Aspectos Gerais

Em 2006, Delsuc *et al.*, publicaram um artigo que mudou a posição filogenética do subfilo dos tunicados para a categoria de grupo irmão dos vertebrados. Com isso os tunicados têm experimentado um período de renome científico testemunhado pelo grande aumento do interesse dos cientistas. As ascídias representam a classe mais conhecida e mais rica em espécies de tunicados. Seus embriões dão origem a larvas que nadam livremente e possuem notocorda; após a metamorfose se tornam indivíduos adultos envolvidos por uma túnica externa, possuem brânquia, que ocupa a maior parte do volume do organismo, e um endóstilo ventral, capaz de secretar um muco, útil na remoção das partículas em suspensão provenientes da água do mar, que passa através das aberturas da brânquia (BALLARIN e BURIGHEL, 2002).

Ascídias adultas têm um coração tubular bem definido e um sistema circulatório misto, com hemolinfa fluindo dentro de lacunas e tecidos e, na maioria das espécies, entrando na túnica e em outros órgãos dentro dos vasos derivadas da epiderme com endotélio. Os Hemócitos ou células sanguíneas compõem a hemolinfa e estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos importantes, tais como a reparação de feridas, mobilização e transporte de nutrientes, reprodução assexuada, regeneração, acúmulo de resíduos, síntese de túnica, reconhecimento e, por último, mas não menos importante, as respostas imunológicas (GOODBODY, 1974; WRIGHT, 1981).

Como invertebrados, as ascídias contam apenas com a imunidade inata para lidar com patógenos ou moléculas estranhas que entram em seus organismos e suas respostas imunológicas são baseadas principalmente na atividade de hemócitos que incluem fagócitos profissionais, capazes de secretar uma variedade de moléculas imunológicas (FUKE e FUKUMOTO, 1993; BALLARIN, 2008; FRANCHI *et al.*, 2011), dentre elas o óxido nítrico (NO) (DE BARROS *et al.*, 2009).

1.2 – Aspectos Gerais das Ascídias

As ascídias são invertebrados marinhos bentônicos, que apresentam formas solitárias e coloniais. Um número relativamente pequeno de espécies habita fundos inconsolidados de cascalho, areia ou lama, podendo inclusive apresentar grande redução de tamanho e inúmeras adaptações ao hábito de vida intersticial (MONNIOT, 1965). Ascídias são encontradas desde a região entremarés até grandes profundidades, onde algumas espécies especializaram-se ao hábito carnívoro, capturando ativamente suas presas (OKUYAMA *et al.*, 2002). O alto hidrodinamismo causa prejuízos para estes animais. Sendo assim, preferem áreas abrigadas, mas com boa circulação de água (CARVALHO, 2001; GOODBODY, 2000). Algumas espécies são consideradas bioindicadores de qualidade ambiental (NARANJO *et al.*, 1996), enquanto outras respondem especificamente à poluição ambiental (CARBALLO e NARANJO, 2002; BEIRAS *et al.*, 2003) e à eutrofização (MARINS *et al.*, 2010). Além disso, as ascídias têm sido estudadas para avaliação de sua eficiência como biorremediadores, pois são animais filtradores, que circulam grande volume de água e alimentam-se de organismos pequenos, do tamanho de bactérias (DRAUGHON *et al.*, 2010). São componentes importantes das comunidades bentônicas e o desenvolvimento de suas comunidades é regulado por variáveis ambientais como temperatura, sedimentação, salinidade, luz e hidrodinamismo (MARINS, 2007).

1.2.1 - Taxonomia

A classe Ascidiacea é a mais diversificada dentre os tunicados e uma compilação recente no banco de dados *World Record of Marine Species – WoRMS* revelou a existência de 2869 espécies válidas de ascídias distribuídas em 26 famílias (*WORLD REGISTER OF MARINE SPECIES, 2010*). As hipóteses mais recentes sobre a filogenia do grupo têm sugerido que os representantes da classe Thaliacea tenham evoluído a partir de ascídias, aumentando ainda mais a diversificação do grupo (SWALA *et al.*, 2000, TSAGKOGEOGA *et al.*, 2009). O subfilo Tunicata, por sua vez, antes considerado como basal na evolução dos Chordata, agora tem sido visto como grupo irmão dos Vertebrata, com caracteres apomórficos de origem morfológica (RUPPERT, 2005) e molecular (BLAIR e HEDGES, 2005; DELSUC *et al.*, 2006; DUNN *et al.*, 2008) que são compartilhados com os vertebrados. Esta relação próxima aos vertebrados fez com que várias espécies do grupo tenham sido intensamente pesquisadas como modelos em estudos comparativos de histologia, desenvolvimento

embrionário e imunologia, inclusive a evolução do sistema imunológico dos vertebrados (BURIGHEL e CLONEY, 1997; KHALTURIN *et al.*, 2003).

1.2.2 – Anatomia

O corpo das ascídias é recoberto por uma epiderme denominada túnica extracelular, estrutura da qual deriva o nome do subfilo “Tunicata” (“tunicados”). Esta é um exoesqueleto dinâmico que se expande, sem ser trocado, à medida que o corpo do animal cresce, com função de proteção e sustentação do corpo. A túnica é percorrida por vasos sanguíneos que partem do corpo contendo células sanguíneas. Assim como ocorre na maior parte de cutículas e exoesqueletos, ela é formada por proteínas variadas e carboidratos. Além disso, há dentre outras, uma característica exclusiva dos tunicados que é a presença de fibras estruturais na túnica, composta por um tipo de celulose denominada tunicina (BARNES, 2005). Um extremo do corpo se fixa ao substrato durante seu estágio larval e inicia sua metamorfose para o estágio adulto. As ascídias possuem um sifão branquial (ou inalante) por onde a água entra e um sifão atrial (ou exalante) por onde a água sai e, conforme são bombeadas pela brânquia, partículas alimentares em suspensão são aprisionadas no seu revestimento em uma rede de muco que, com auxílio dos cílios presentes na brânquia, alcançam o esôfago (Figura 1) (BARNES, 2005).

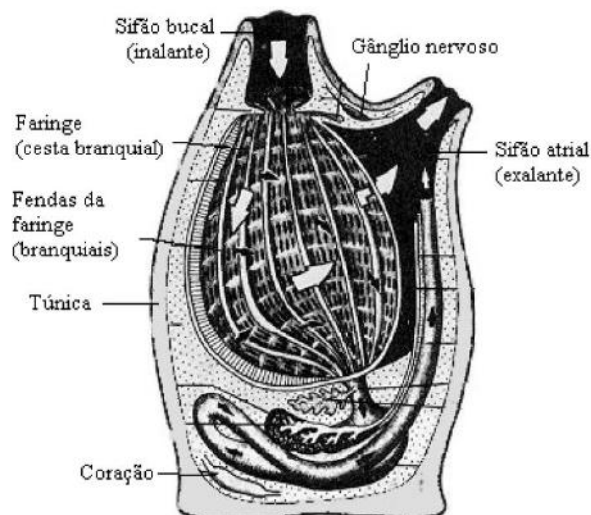


Figura 1 - Representação esquemática da anatomia funcional da ascídia. As setas indicam o trajeto da corrente de água. Adaptado de: BARNES, 2005.

A quantidade de alimentos, ou seja, partículas orgânicas em suspensão na água, disponíveis para a alimentação das ascídias, é determinada pela quantidade de água transportada através de sua brânquia e pela eficiência com que tais partículas são retidas pelo filtro mucoso que recobre a parede interna da faringe (RANDLOV *et al.*, 1979).

1.2.3 - Sistema Imunológico e hemócitos

Fundamental para qualquer organismo é a capacidade de reconhecer a presença de substâncias estranhas por meio de seu sistema imunológico. Dois sistemas de defesa contra agentes infecciosos foram selecionadas ao longo da evolução: sistema imunológico inato ou a imunidade natural e sistema imunológico adaptativo ou imunidade adquirida. O sistema inato pode ser encontrado em todos os animais multicelulares, enquanto que o sistema adquirido é encontrado principalmente nos animais vertebrados (MANDATO, 1998; VAN DE BRAAK, 2002). Invertebrados têm um complexo e eficiente sistema imunológico inato, o que pode ser subdividido em respostas de defesa humorais e celulares. A resposta humoral está intimamente relacionada com a síntese de peptídeos antimicrobianos (LOWENBERGER, 2001) e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BOGDAN *et al.*, 2000). Já a defesa celular envolve respostas mediadas por diferentes tipos de hemócitos, células que circulam livremente na hemolinfa (CORREIA, 2008). Há indícios de que a resposta humoral e celular são bem coordenadas entre si e que provavelmente, há uma sobreposição entre elas, uma vez que vários fatores humorais afetam a função dos hemócitos e estes, por sua vez, são uma fonte importante de muitas moléculas humorais (EROLD -ERICKSON *et al.*, 2000; LAVINE E STRAND, 2002)

Nas ascídias, a hemolinfa contém vários tipos de células circulantes (morfologicamente distintas), incluindo: células indiferenciadas (hemoblastos ou células semelhantes a linfócitos), fagócitos, células citotóxicas que contém fenoloxidasas, e células de armazenamento (GOODBODY, 1974; WRIGHT, 1981; DE LEO, 1992; BURIGHEL e CLONEY, 1997; BALLARIN e CIMA, 2005). As células do sangue são envolvidas em muitas funções essenciais, tais como a imunovigilância (RAFTOS *et al.*, 1987;; PARRINELLO *et al.*, 1993; OHTAKE *et al.*, 1994; PEDDIE e SMITH, 1994; CAMMARATA *et al.*, 1995; DAN - SOHKAWA *et al.*, 1995; BALLARIN *et al.*, 2001; MENIN *et al.* , 2005; BALLARIN, 2008; MENIN e BALLARIN, 2008), a coagulação do sangue (WRIGHT, 1981), encapsulamento de corpos estranhos (ANDERSON, 1971; PARRINELLO *et al.*, 1984; PARRINELLO e PATRICOLO, 1984a), a síntese de

túnica (ENDEAN, 1955; SMITH, 1970; ZANIOLO, 1981), e acúmulo de metais (ENDEAN, 1953; GOODBODY, 1974; MILANESI e BURIGHEL, 1978 ; WRIGHT, 1981; BELL *et al.*, 1982; SCIPPA *et al.*, 1982; OLTZ *et al.* , 1988).

1.2.3.1 – Classificação do hemócitos

A terminologia dos hemócitos não é uniforme. A diversidade de formas e funções que estas células podem realizar nas diferentes espécies, os diferentes métodos de preservação e observação e as divergências sobre os critérios usados para distinguir os tipos morfológicos dificultam as tentativas de comparação (GUPTA 1979; VAN DE BRAAK, 2002). Os esquemas de classificação, normalmente, levam em consideração a morfologia celular, uma vez que deve ser considerado que as células devem ser reconhecidas no momento da observação, e, em seguida podem ser diferenciadas pela sua função (DE LEO, 1992).

A seguir podem-se observar as diferentes nomenclaturas dadas aos mesmos tipos celulares de acordo com a descrição de vários autores:

1 - Célula indiferenciada (BALLARIN e CIMA, 2005), hemoblasto (MILANESI E BURIGHEL, 1978), linfócitos (SCHLUMPBERGER *et al.*, 1984) e célula semelhante a linfócito (BALLARIN *et al.*, 1993; RINKEVICH e RABINOWITZ, 1993). Essas células possuem aproximadamente 4,0-7,0 µm de diâmetro, com um grande núcleo, redondo e com localização central (DE LEO, 1992);

2 - Amebócitos hialino (BALLARIN e CIMA, 2005; SABBADIN, 1955; BALLARIN *et al.*, 1993) e amebócito microgranular (MILANESI e BURIGHEL, 1978; SCHLUMPBERGER *et al.*, 1984; RINKEVICH e RABINOWITZ, 1993). Essas células possuem aproximadamente 6-12 µm de comprimento, têm uma forma variável, com várias saliências citoplasmáticas (pseudópodes), e tem um núcleo arredondado (BALLARIN e CIMA, 2005).

3 – Célula semelhante a macrófago, (BALLARIN e CIMA, 2005) fagócito vacuolizado (SABBADIN, 1955), macrófago (MILANESI e BURIGHEL, 1978; SCHLUMPBERGER *et al.*, 1984; BALLARIN *et al.*, 1993; RINKEVICH e RABINOWITZ, 1993) e célula em anel de sinete (SCHLUMPBERGER *et al.*, 1984; BALLARIN, *et al.*, 1993). Essas células possuem aproximadamente 9-11,5 µm de diâmetro e são caracterizadas por um único grande vacúolo. O citoplasma rodeia o grande vacúolo e aparece apenas como uma fina camada no qual o núcleo da célula encontra-se restrito a periferia da célula (NETTE *et al.*, 2004);

4 – Amebócito granular (BALLARIN e CIMA, 2005; SABBADIN, 1955; SCHLUMPBERGER *et al.*, 1984; BALLARIN *et al.*, 1993) e amebócito macrogranular (MILANESI e BURIGHEL, 1978; SCHLUMPBERGER *et al.*, 1984; RINKEVICH e RABINOWITZ, 1993). Essas células possuem aproximadamente 7-10 μm de comprimento, morfologia amebóide e seu citoplasma contém vários vacúolos (BALLARIN e CIMA, 2005);

5 - Célula do tipo mórula (BALLARIN e CIMA, 2005; SABBADIN, 1955; MILANESI e BURIGHEL, 1978; SCHLUMPBERGER *et al.*, 1984; RINKEVICH e RABINOWITZ, 1993). As células do tipo mórula possuem aproximadamente 10-15 μm com formato esferoidal e com um citoplasma repleto de vacúolos redondos e uniformes (BALLARIN e CIMA, 2005);

6 – Célula pigmentar (BALLARIN e CIMA, 2005; SCHLUMPBERGER *et al.*, 1984) e célula pigmentar granular (BURIGHEL *et al.*, 1983; BALLARIN *et al.*, 1993; RINKEVICH e RABINOWITZ, 1993). Essas células medem aproximadamente 9,5 μm de diâmetro, possuem forma de disco e são preenchidas por um pigmento laranja (NETTE *et al.*, 2004);

7 – Nefrócito (BALLARIN e CIMA, 2005; (MILANESI e BURIGHEL, 1978; SCHLUMPBERGER *et al.*, 1984; BALLARIN *et al.*, 1993). Essas células possuem aproximadamente 10-15 μm de diâmetro, possuem vacúolos preenchidos com líquido, que provavelmente acumulam produtos finais do metabolismo (WRIGHT, 1981).

8 – Célula compartimentar, essas células possuem aproximadamente 7-9,5 μm de diâmetro e são caracterizadas pela presença de vários vacúolos (NETTE *et al.*, 2004);

9 – Granulócito Refrátil Univacuolar (URG). Essas células são caracterizadas por um grande vacúolo, o qual contém a inclusão refrátil rodeada por uma borda fina do citoplasma; são chamados de URG para distingui-lo do outro hemócito univacuolar (célula em anel de sinete) que não contém essas inclusões (DE LEO, 1992; PARRINELLO *et al.*, 1996).

1.2.3.2 – Hemócitos e óxido nítrico

Desde a descoberta dos efeitos biológicos do óxido nítrico (NO), este foi identificado como um importante modulador fisiológico e uma molécula mensageira em mamíferos. Paralelamente a estes estudos evidências acumuladas nos últimos anos revelaram que a via de sinalização do NO está em todos os animais da escala filogenética, sendo encontrada cada vez mais em organismos mais simples, variando de Chordata até Mollusca (PALUMBO, 2005)

O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (MORRIS e BILLIAR, 1994). O óxido nítrico (NO) é um gás altamente reativo com um tempo de vida de alguns segundos e difunde livremente através das membranas. Ele reage rapidamente com outras espécies de oxigênio para formar produtos estáveis como nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e alguns radicais altamente tóxicos como o peroxinitrito (OONO^-) (MONCADA *et al.*, 1991).

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NOS (MARLETTA, 1993; MONCADA *et al.*, 1991). Uma variedade de isoformas de NOS tem sido purificada em diferentes tecidos de mamíferos e muitas já tiveram seus genes clonados. Estudos bioquímicos e análise sequencial de aminoácidos revelaram que estas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos. Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (cNOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (iNOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (MARLETTA, 1994; MONCADA *et al.*, 1991). A cNOS e a iNOS diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO (MARLETTA, 1994) e já foram caracterizadas, purificadas e tiveram os genes clonados (BREDT e SNYDER, 1990; LYONS, 1992; NISHIDA, 1992). A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (nNOS), presente normalmente nos neurônios (BRET e SNYDER, 1989; KNOWLES *et al.*, 1989), e a NOS endotelial (eNOS), presente normalmente nas células endoteliais vasculares (MONCADA *et al.*, 1991) e nas plaquetas (RADOMSKI *et al.*, 1990). As isoformas da NOS estão esquematizadas na figura 2. A iNOS não é expressa sob condições normais, é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas (MONCADA *et al.*, 1991). Esta isoforma requer algumas horas para ser expressa, mas, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que a cNOS e a produção desta continua indefinidamente até que a L-arginina ou os cofatores necessários para sua síntese sejam esgotados ou ocorra a morte celular (DUSTING e MACDONALD, 1995). A síntese de NO, esquematizada na figura 3 envolve duas etapas: Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar N^G -hidroxi-L-arginina (NHA), esta reação utiliza NADPH e oxigênio (O_2). Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e

citrulina. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH4) são utilizados como cofatores na reação (MARLETTA, 1994; MARLETTA, 1988).

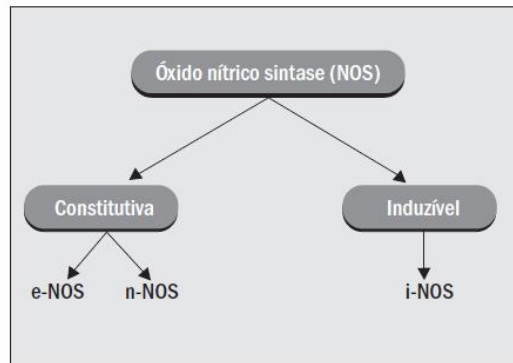


Figura 2 - Isoformas da NOS. Retirado de: DUSSE et al., 2003.

Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos, como a N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-Lornitina (L-NIO), N^G-amino-L-arginina (L-NAA), N^G-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS (MONCADA *et al.*, 1991; REES *et al.*, 1990).

Comes *et al.*, (2007) realizaram o sequenciamento da enzima NOS da larva da ascídia *Ciona intestinalis*, onde foi encontrado um único gene para NOS e, verificou-se que o NO nestes animais é importante como sinalizador para a regressão da notocorda (Comes *et al.*, 2007).

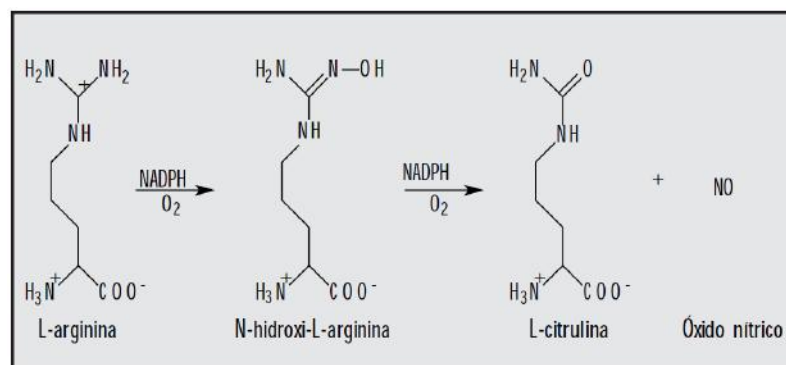


Figura 3 - Reação catalisada pela NOS Retirado de: DUSSE et al., 2003.

Nos hemócitos das ascídias foi descrita a participação do NO, como modulador de respostas imunológicas. Em 1996, Cima *et al.* que quando as células sanguíneas das ascídias eram incubadas com levedura ocorria um aumento de nitrito no meio de cultura, sugerindo

que, tal como nos vertebrados (HIBBS *et al.*, 1987), a ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nos hemócitos ocorre no reconhecimento de células estranhas e, como consequência, o NO tem atividade microbicida; Em 2004, Cima *et al.* também, identificaram a produção de NO pelos hemócitos da ascídia *Botryllus schlosseri* e sugeriu um papel para o NO na morte celular em reações de citotoxicidade; Na ascídia *Styela plicata* a produção de NO não foi alterada após o estímulo com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), porém observou-se uma produção basal de NO por todos os tipos de hemócitos, embora as células semelhantes a linfócitos fossem as principais produtoras de NO (DE BARROS *et al.*, 2009). Em relação a outros invertebrados foi demonstrado pela primeira vez no molusco *Viviparus ater* a produção de NO pelos hemócitos e o aumento da regulação desta produção por LPS (CONTE e OTTAVIANI, 1995). Também no molusco *Mytilus galloprovincialis*, Arumugam *et al.* (2000) demonstraram a produção de NO em homogeneizados de hemócitos em resposta a laminarina e acetato miristato de forbol (PMA) e um outro trabalho com o mesmo animal mostrou a produção de outro radical livre associado com a presença de NO, peroxinitrito, em resposta a Zymosan (TORREILLES e GUÉRIN, 1999) .

1.3 - Via de Sinalização da Produção de NO

A capacidade do sistema imunológico do hospedeiro para inicialmente reconhecer e responder a componentes microbianos é mediada pelo sistema imunológico inato através da expressão de uma família de receptores transmembranas, os receptores semelhantes a *Toll* (TLR) (MEDZHITOV *et al.*, 1997; MEDZHITOV *et al.* 1998; YANG *et al.*, 1998). Os TLRs estão entre os receptores de reconhecimento de padrões mais bem estudados e bem caracterizados, devido à sua capacidade para detectar uma variedade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), tais como lípidos, proteínas, lipoproteínas, e ácidos nucleicos (MEDZHITOV *et al.*, 1997; MEDZHITOV *et al.* 1998; YANG *et al.*, 1998). A ativação de TLRs por produtos microbianos leva ao envolvimento de um número diversificado de vias de sinalização intracelular que ditam a resposta inflamatória do hospedeiro (KAWAI e AKIRA, 2007; KUMAR *et al.*, 2009 a, b). Nos mamíferos, já foram descritos 11 TLRs que reconhecem uma variedade de ligantes de patógenos (via de sinalização *Toll* com PKC). Porém, sabe-se que a família de genes TLR e suas vias de

sinalização foram bem conservadas evolutivamente tanto em vertebrados como nos invertebrados (HOFFMANN e REICHHART, 2002; ROACH *et al.*, 2005).

Dentre os TLRs, deve-se mencionar que TLR1, TLR2, TLR6, TLR4, e TLR5 estão localizadas na membrana plasmática e TLR3, TLR7, e TLR9 não estão localizadas na superfície celular (AKIRA e TAKEDA, 2004). O TLR4 foi descrito como um receptor para LPS e essencial para gerar respostas para as bactérias gram-negativas, em que LPS é um componente importante da membrana externa dessas bactérias (POLTORAK *et al.*, 1998). Em contraste com o papel de TLR4 na sinalização de LPS, TLR2 está envolvido no reconhecimento de componentes de bactérias gram-positivas. Em 1999, UNDERHILL *et al.* apontaram a correlação entre a fagocitose de macrófagos e a resposta inflamatória mediada pelos TLRs. Eles demonstraram que TLR2 é recrutado para os fagossomos de macrófagos, após o tratamento das células com as partículas de levedura como o Zymosan. Em resumo TLR2 e TLR4 são essenciais para o reconhecimento de componentes bacterianos diferentes, enquanto que TLR2 reconhece zymosan, TLR4 é necessário para sinalização de LPS (figura 4).

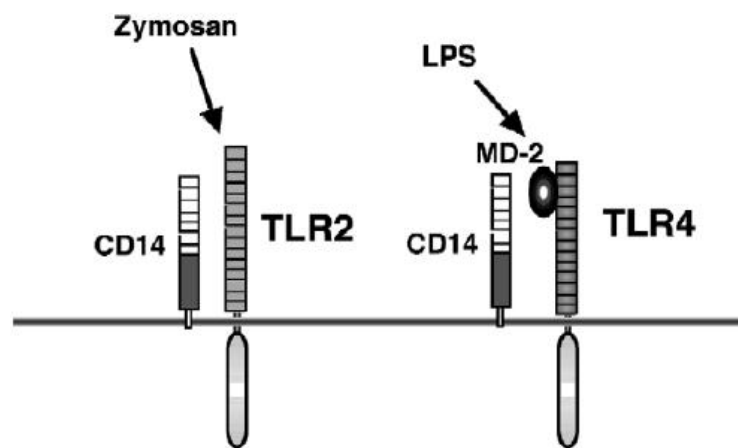


Figura 4 - Supostos ligantes para TLRs. O TLR2 reconhece Zymosan e TLR4 reconhece LPS. (Adaptado de: TAKEUCHI, 2001)

Os componentes específicos comuns para uma variedade de bactérias, os PAMPs, são ativadores potentes da resposta imunológica inata e nos mamíferos eles ativam os monócitos/macrófagos que desencadeiam a produção de citocinas pró- inflamatórias e também a produção de substâncias inflamatórias efetoras como o NO (TAKEUCHI, 2001). Do ponto de vista da evolução, este antigo mecanismo molecular pode ter surgido em invertebrados como insetos e moluscos (ARUMUGAN, 2000 a; ARUMUGAN, 2000 b; CONTE e OTTAVIANI, 1995; FRANCHINI, 1995).

O NO resultante da ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais (DUSSE *et al.*, 2003). Nas células de mamíferos a ativação e a expressão da iNOS são regulados por vias de transdução de sinais (RIBIÈRE *et al.*, 2002). Várias moléculas de sinalização como, a PKC (proteína quinase C), a MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) e a JNK (c-jun-N-terminal) estão relacionadas com a via de produção de NO e a expressão da iNOS em macrófagos, através da ativação fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (CHEN e WANG, 1999). A figura 5 mostra algumas vias de sinalização do TLR que leva a ativação e translocação do NF- κ B para o núcleo. Essas vias de sinalização da produção de NO têm sido pouco estudadas em modelos invertebrados. No entanto, sabe-se que no caracol *Lymnaea stagnalis* PKC e ERK estão envolvidos na sinalização para a produção de NO nos hemócitos estimulados com PMA ou com laminarina de *Laminaria digitata* (WRIGHT *et al.*, 2006); Na ostra da espécie *Mytillus galloprovinciales* foi descrito que a sinalização da PKA participa da regulação da NOS nos hemócitos em resposta a interleucina - 2 (NOVAS *et al.*, 2004), e o nosso grupo relatou, através da técnica de imunocitoquímica, o envolvimento de NF- κ B na sinalização de produção de NO pelos hemócitos da ascídia *Styela plicata* (DE BARROS *et al.*, 2009).

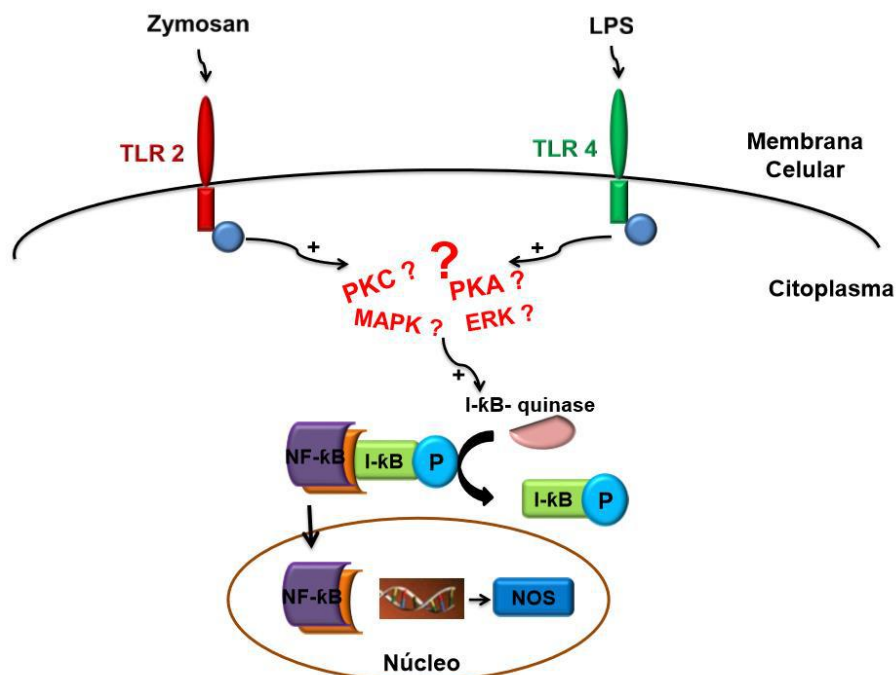


Figura 5 - Vias de sinalização do TLR. A presença de componentes bacterianos desencadeia a ativação sequencial de uma sinalização em cascata que conduz à translocação de NF- κ B (Adaptado de: WANG *et al.*, 2006).

1.4 – Modelo de estudo: ascídia *Phallusia nigra*

A ascídia *Phallusia nigra* (figura 6) é uma espécie bastante conhecida por ser facilmente distinguida de outros organismos incrustantes, como esponjas e outros tunicados (DA ROCHA *et al.*, 1999, GOODBODY, 1962, KAPLAN, 1988, VOSS, 1980). Seu corpo possui coloração preta-azulada ao marrom escuro com uma textura semelhante a couro (VOSS, 1980). A descamação da camada externa e toxicidade do tecido ajudam a manter o tunicado limpo e protegido de outros organismos (GOODBODY, 1962). O corpo tem o formato de um longo tubo ou barril, envolvido por uma túnica, com dois sifões na parte superior do corpo. As aberturas de ambos os sifões são redondos com bordas franjadas, a água e os nutrientes são bombeados para dentro do corpo através do sifão branquial, enquanto que a água e resíduos são excretados pelo sifão atrial. (KAPLAN, 1988).



Figura 6 - Ascídia *Phallusia nigra*. Foto: Laura Carriello Emrich, NUPEM – UFRJ

1.4.1 – Taxonomia *P. nigra*

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Tunicata

Classe: Ascidiacea

Ordem: Phlebobranchia

Família: Ascidiidae

Gênero: *Phallusia*

Espécie: *nigra*

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, o interesse no sistema imunológico dos invertebrados tem impulsionado estudos comparativos, evolutivos e ecológicos. Apesar desses animais contarem apenas com a imunidade inata, os invertebrados são capazes de respostas humoral complexas e mediadas por células e isso garante a sobrevivência dos indivíduos e, conseqüentemente, da espécie. Dois tipos de células principais são compartilhados por invertebrados: fagócitos profissionais e células citotóxicas que coordenam seus esforços para lidar com micróbios potencialmente patogênicos que entraram no organismo. Este trabalho vai se concentrar nas células sanguíneas das ascídias, que são a principal frente de proteção imunológica desses animais.

Para tal, o Laboratório Integrado de Morfologia no NUPEM, vem utilizando como modelo de estudo a Ascídia da espécie *Phallusia nigra*, que por ser um animal filtrador está diretamente em contato com patógenos e outras substâncias presentes no ambiente aquático. Pretende-se entender como ocorre a resposta imunológica desses animais quando suas células sanguíneas (hemócitos) são estimuladas com LPS de *E. coli* ou Zymosan A de *S. cerevisiae*, através do biomarcador muito utilizado nesses tipos de estudos, o NO. Além disso, pretende-se também identificar a via de sinalização envolvida na produção de NO.

Finalmente, este projeto é de grande importância para entendermos como ocorre a defesa desses organismos, que estão diretamente em contato com compostos que podem estar presentes nos ambientes aquáticos, e se as vias de sinalização são conservadas entre as espécies de invertebrados e vertebrados.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral:

Identificar e quantificar a produção de óxido nítrico pelos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*.

3.1.1 - Objetivos específicos:

1. Caracterização morfológica dos hemócitos da ascídia *P. nigra*;
2. Quantificação da produção de NO pelos hemócitos frente a estímulos;
3. Identificação do(s) hemócito(s) produtor(es) de NO;
4. Identificação da via de sinalização envolvida na produção de NO pelos hemócitos da ascídia *P. nigra*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Obtenção das ascídias

As ascídias foram coletadas no Porto do Forno, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. Os animais foram levados para o biotério aquático do NUPEM e mantidos a 20°C em um aquário aerado com fotoperíodo, pH (8,0) e salinidade controlados (34,0 ppm). Os animais foram alimentados com *Artêmia* a cada 2 dias. Para a realização dos experimentos foram utilizados como n experimental, aproximadamente, 20 ascídias adultas

4.2 - Isolamento dos hemócitos

Os hemócitos foram retirados através da técnica de sangramento do sifão branquial e misturados em tubos contendo uma solução de anticoagulante marinho (MAC-26,3 g de cloreto de sódio, 18 g de glicose, 4,41 g de citrato trissódico, 2,73 g de ácido cítrico, 3,72g de EDTA em 1000 mL de água destilada, pH 7,0) com igual proporção de hemolinfa. Em seguida, a solução foi centrifugada a 2800 rpm por 5 min à 25°C para separar os hemócitos do plasma (Peddie e Smith, 1994). O sobrenadante foi descartado e as células foram preparadas para os experimentos sendo ressuspensas em 1 mL de água do mar artificial (ASW; 420 mM NaCl, 9 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 24,5 mM MgCl₂, 25,5 mM Mg SO₄, 2,15 mM NaHCO₃ e 10mM de tampão de HEPES, pH 8,0, esterilizada com filtro de 0.2 µm) e ajustadas para 3x10⁶ células/mL, com auxílio da câmara de Neubauer (De BARROS *et al.*, 2009).

4.3 - Caracterização morfológica dos hemócitos da ascídia *P. nigra*

4.3.1 - Microscopia de luz

Os hemócitos foram colocados para aderir em lâminas de vidro por 30 minutos, após adesão os hemócitos foram fixados durante 15 minutos em 4% de paraformaldeído preparado em ASW, e corados com hematoxilina e eosina (H&E) ou 1% de azul de toluidina. A morfologia dos hemócitos foi observada sob microscópio óptico Nikon 80i com câmera colorida DS-Qi1 (Nikon) acoplada, e as imagens digitais foram obtidas em 2/3 polegadas/pixel².

4.3.2 Microscopia eletrônica

Os hemócitos isolados da hemolinfa das ascídias foram centrifugados, e os peletes contendo os hemócitos foram fixados com 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão cacodilato de sódio dissolvido em ASW com pH 7,6 durante 2 horas e, lavados posteriormente com ASW por 3 vezes durante 15 minutos à temperatura ambiente. Os hemócitos foram então pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) durante 30 minutos e desidratados através de uma série graduada de acetona até 100% e em seguida embebidos em resina Epoxi Epon 812 (Sigma). Após a polimerização em resina pura os cortes ultrafinos (70 nm) foram obtidos em um ultramicrotomo (modelo RMC-MT 600-XL) e depositados em grades de cobre, contrastados com 2% de acetato de uranila por 20 minutos e 1% de citrato de chumbo por 3 min. Os cortes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM-1011) operado a 80 kV pertencente a Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz EX (De BARROS *et al.*, 2009).

4.4 - Quantificação da produção de NO, pelos hemócitos, frente a estímulos

A quantificação da produção de NO foi realizada através de um indicador de fluorescência, diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluoresceína (DAF-FM DA - Molecular Probes) importante reagente para quantificar baixas concentrações de NO em células vivas. Esse composto é essencialmente não fluorescente até reagir com NO para formar um benzotriazol fluorescente (Figura 7).

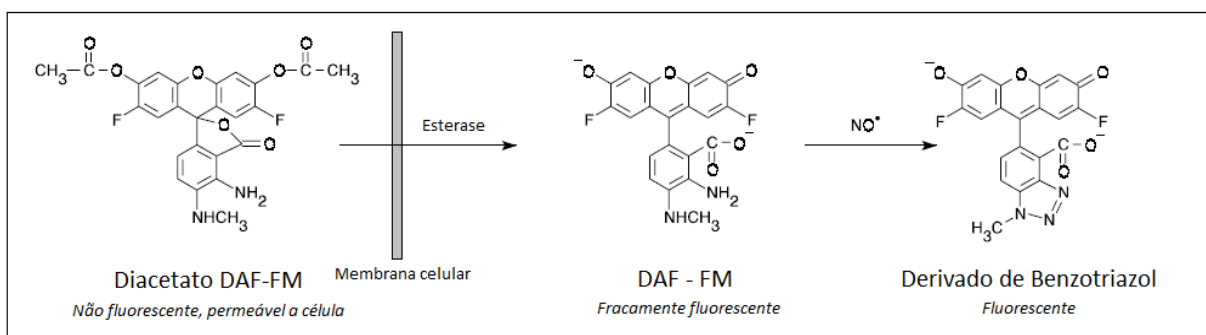


Figura 7 - Esquema de reações para a detecção de óxido nítrico (NO) por DAF-FM e diacetato DAF-FM (Adaptado de: KOJIMA *et al.*, 1998 a; KOJIMA *et al.*, 1998 b).

Para tal, as células de pelo menos 7 ascídias, ajustadas para 3×10^6 células/mL, foram incubadas em 5 μ M do DAF-FM DA durante 30 minutos no escuro (Nakatsubo *et al.*, 1998). Os hemócitos foram lavados em ASW, e incubados em ASW durante 15 minutos. Após, os estímulos foram adicionados em concentrações de 5 μ g/mL, 25 μ g/mL e 50 μ g/mL de LPS (Lipopolissacarídeo de *E. coli*) ou de Zymosan A (*S. cerevisiae*) para um volume total de 2 mL, variando-se também o tempo em 30, 60 e 120 minutos. Os hemócitos controle foram suspensos em ASW. A fluorescência produzida foi medida pelo espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse calibrado para excitação a 485 nm e emissão a 520 nm.

4.5 - Identificação do(s) hemócito(s) produtor (es) de NO

4.5.1 - Imunofluorescência para iNOS

Os hemócitos isolados da hemolinfa ainda não estimulados e estimulados com 25 μ g/mL de Zymosan A ou LPS foram colocados para aderir por 30 minutos, fixados em 4% de paraformaldeído - em PBS (Tampão Fosfato Salino em água do mar)- por 30 minutos. Estas células foram incubadas com anticorpo primário contra iNOS (durante 24 horas) e anticorpo secundário anti- coelho Alexa Flúor 546 (Invitrogen) (De BARROS *et al.*, 2007). Os cortes foram observados ao microscópio de fluorescência Nikon 80i com câmera colorida DS-Qi1 (Nikon) acoplada, e as imagens digitais foram obtidas em 2/3 polegadas/pixel².

4.6 - Identificação da via de sinalização envolvida na produção de NO pelos hemócitos da ascídia *P. nigra*.

4.6.1 - L-NAME e DETA/NO

Após o sangramento e separação dos hemócitos, as células de pelo menos três ascídias, anteriormente ajustadas, foram pré-incubadas, separadamente, com 1 μ M do inibidor competitivo L-NAME (Sigma) ou com 200 mM do doador de NO DETA/NO (Dietilenotriamina/ Óxido nítrico) (Sigma) por 30 minutos, em seguida utilizou-se o composto DAF-FM DA e após 30 minutos os estímulos foram adicionados na concentração de 25 μ g/mL de Zymosan A ou LPS, variando-se também o tempo em 30 e 60 minutos. Os sinais de fluorescência foram captados e medidos pelo espectrofluorímetro anteriormente descrito.

4.6.2 - Envolvimento de proteínas quinases

Os hemócitos isolados da hemolinfa de no mínimo seis ascídias e ajustados para 3×10^6 células/mL foram pré- incubados com 1 μ m dos inibidores de proteína quinase C (PKC), GF 1090203 (Sigma), ou proteína quinase A (PKA), H-89 (Sigma), durante 30 minutos, em seguida utilizou-se o composto DAF-FM DA e após 30 minutos os estímulos foram adicionados na concentração de 25 μ g/mL de Zymosan A ou de LPS, variando-se também o tempo em 30 e 60 minutos. Os sinais de fluorescência foram captados e medidos pelo espectrofluorímetro anteriormente descrito.

4.6.3 - Imunofluorescência para NF κ B

Para determinar a ativação do NF- κ B na via de produção de NO, os hemócitos foram pré-incubados, durante 30 minutos, com Zymosan A ou Zymosan A com inibidor de PKA; LPS ou LPS com inibidor de PKC. Após, os mesmos foram lavados com ASW, colocados para aderir por 30 minutos e fixados em 4% de paraformaldeído em PBS-ASW durante 30 minutos. Estas células foram incubadas com anticorpo primário anti-NF κ B p65 (Santa Cruz) usado na diluição 1:50, durante 24 horas, seguido de um anticorpo secundário anti- mouse Alexa Flúor 546 (Molecular Probes), usado na diluição 1:600. Para os controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos das etapas de incubação. As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência Nikon 80i descrito anteriormente (De BARROS *et al.*, 2007).

4.7 - Análise estatística

A avaliação estatística foi baseada no teste *t-Student* usando o programa GraphPad Prism 5.00. Os valores para $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os níveis médios de fluorescência nas células estimuladas ou nas células inibidas foram comparados com as células não estimuladas e, a estas, foi atribuído o valor de 100%.

4.8 - Análise da Viabilidade Celular

A análise foi realizada utilizando-se o teste de exclusão com azul de tripam. As células foram ajustadas para 3×10^6 células/mL, e utilizou-se 1:1 v/v dos hemócitos controle, dos hemócitos estimulados (Zymosan A ou LPS), com L-NAME, DETA/NO, inibidor da PKC ou

inibidor da PKA com o corante Azul de Tripam preparado a 1% com ASW nos tempos já descritos anteriormente. O teste se baseia em um ensaio de exclusão, em que, as células que se encontram coradas são as que não estão viáveis, estas foram então observadas e contadas em um microscópio óptico com auxílio da câmara de Neubauer (CIMA *et al.*, 1996).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 - Caracterização morfológica dos hemócitos da ascídia *P. nigra*

Para o completo entendimento da via de produção de NO, foi preciso, primeiramente, identificar e classificar os tipos de hemócitos presentes na hemolinfa da ascídia *P. nigra*, isso ocorre, pois na literatura não foi encontrada nenhuma descrição dos hemócitos dessa espécie. A classificação dos hemócitos adotada foi baseada em observações ultra-estruturais, em dados da literatura provenientes de outras espécies de ascídias, no trabalho do nosso grupo de pesquisa sobre os hemócitos da ascídia *Styela plicata* (De BARROS *et al.*, 2009) e dados de outros invertebrados marinhos.

Portanto, foi identificado, na hemolinfa da ascídia *P. nigra*, oito tipos principais de hemócitos: hemoblasto, célula em anel de sinete, granulócito refrátil univacuolar, célula compartimentar, célula do tipo mórula, nefrócito, célula pigmentar e amebócito. Estas podem ser observadas a seguir através das imagens obtidas por microscopia óptica (figura 8) e microscopia eletrônica (figura 9).

1. Hemoblasto: esta célula mede aproximadamente 3,4 µm de diâmetro e supõe-se que seja a precursora dos demais hemócitos. Sob a microscopia de luz o citoplasma apresenta-se ligeiramente eosinofílico (figura 8 A). Através da microscopia eletrônica observam-se pequenos vacúolos e o núcleo eucromático com um ou mais nucléolos (figura 9 A). Os Hemoblastos foram o tipo de célula menos frequente na hemolinfa da ascídia *P. nigra* (1,3%). Eles possuem características típicas de células indiferenciadas como alta relação núcleo/citoplasma e nucléolos, alguns autores também os classificam como hemocitoblastos (De LEO *et al.*, 1992) em *Ciona intestinalis*, células semelhantes a linfócitos (De BARROS *et al.*, 2009) em *Styela plicata* e linfócitos (NETTE *et al.*, 1999) em *Phallusia mammillata*.
2. Célula em anel de sinete: esta célula mede aproximadamente 4,0 µm de diâmetro, possui um vacúolo grande que comprime o núcleo para a periferia da célula, este tipo celular se encontra em aproximadamente 7,7% do total de células. O citoplasma se mostra fortemente eosinofílico e não se cora com Azul

de Toluidina (figura 8 C e D). A microscopia eletrônica revela que o grande vacúolo é preenchido homoganeamente com um material elétron-denso. Observa-se também que algumas dessas células possuem seu citoplasma dividido em dois grandes vacúolos, e por isso podem ser chamadas de células bivacuoladas (NETTE *et al.*, 2004) (figura 9 B). Alguns autores descrevem que a célula em anel de sinete pode ser um dos intermediários para a formação da célula do tipo mórula (NETTE *et al.*, 1999; NETTE *et al.*, 2004)

3. Célula compartimentar: mede aproximadamente 7,65 μm de diâmetro. São células grandes e esféricas (figura 8 E e F), possuem um ou mais vacúolos, que ocupam quase toda a célula, contendo um material-elétron-denso (figura 9 C e D). São encontradas aproximadamente em 10,6% do total de células. A célula compartimentar também pode ser um intermediário da formação da célula do tipo mórula (NETTE *et al.*, 1999; NETTE *et al.*, 2004)
4. Granulócito refrátil univacuolar: apresenta aproximadamente 6,1 μm de diâmetro, núcleo excêntrico e um único vacúolo que ocupa todo o citoplasma. Se assemelha com a célula em anel de sinete, porém o granulócito refrátil univacuolar é maior. Além disso, o único grande vacúolo foi fortemente corado com Azul de Toluidina (figura 8 H), ao contrário da célula em anel de sinete. A microscopia eletrônica mostra que o material dentro do vacúolo se encontra em forma de flocos (figura 9 E). Esse tipo celular representa 2,7% do total de células.
5. Célula do tipo mórula: o segundo tipo celular mais encontrado na hemolinfa da ascídia *P. nigra* (26,0%). Apresenta aproximadamente 9,5 μm de diâmetro, possui formato arredondado e contém diversos vacúolos no citoplasma (figura 8 I e J). Cada vacúolo mede aproximadamente 1,98 μm de diâmetro e alguns apresentaram uma coloração esverdeada pelo corante azul de toluidina (figura 8 J). À microscopia eletrônica foi observado que os vacúolos estavam cheios com um material elétron-denso na periferia e na parte central com um material eletróluscente (possivelmente devido ao plano de secção), quando comparado com a periferia (figura 9 F). As células do tipo mórula podem ser capazes de ativar o sistema enzimático fenoloxidase (CAMMARATA *et al.*, 1997) e de produzir NO por células do tipo mórula após um estímulo com citocinas (CIMA *et al.*, 2004).

6. Célula pigmentar: mede aproximadamente 4,5 μm de diâmetro, quando observada ao microscópio óptico apresenta um pigmento de cor alaranjada dentro dos vacúolos (figura 8 K e L). A microscopia eletrônica revelou que os vacúolos são preenchidos com material filamentososo, quando os filamentos foram seccionados, eles se mostraram semelhantes a microtúbulos, inclusive no seu diâmetro (25 nm) (figura 9 G e H). Sabe-se que os microtúbulos são importantes para mobilizar pigmentos, definindo os percursos ao longo dos quais as partículas se movem (FAWCETT, 1981). Esse tipo celular representa aproximadamente 16,0% do total de células.
7. Nefrócito: esta célula mede aproximadamente 7,1 μm de diâmetro e uma morfologia parecida a uma esfera (figura 8 M e N). Este tipo de célula possui vacúolos cheios de líquido com fragmentos de material elétron-denso (figura 9 I). Também foi descrito nos nefrócitos de *Botryllus Schlosseri* grandes vacúolos e formas geométricas (De LEO, 1992). Além disso, Wright (1981), descreveu nos nefrócitos de ascídias alguns enormes vacúolos cheios de líquido, como encontrado nos hemócitos da *P. nigra*. Este autor afirma que esses vacúolos estavam aptos para acumular os produtos finais do metabolismo, e esta foi a razão pela qual estas células foram nomeadas de nefrócitos. Essas células representam aproximadamente 4,0% do total de células.
8. Amebócito: mede aproximadamente 11,6 μm de diâmetro, possui morfologia bastante variável, devido à presença de um ou mais pseudópodes, pode apresentar alguns vacúolos e grânulos no seu citoplasma. Esses grânulos, de diferentes tamanhos, foram corados por azul de toluidina e H & E (figura 8 O e P). Através da microscopia eletrônica verificou-se que esse tipo de célula tem em seu citoplasma o que parecem algumas mitocôndrias (figura 9 J). Nette *et al.*, (2004) classificou os amebócitos em três tipos: amebócito hialino, amebócito vacuolado e amebócito granular. As células mais abundantes na hemolinfa foram os amebócitos (31,7%).

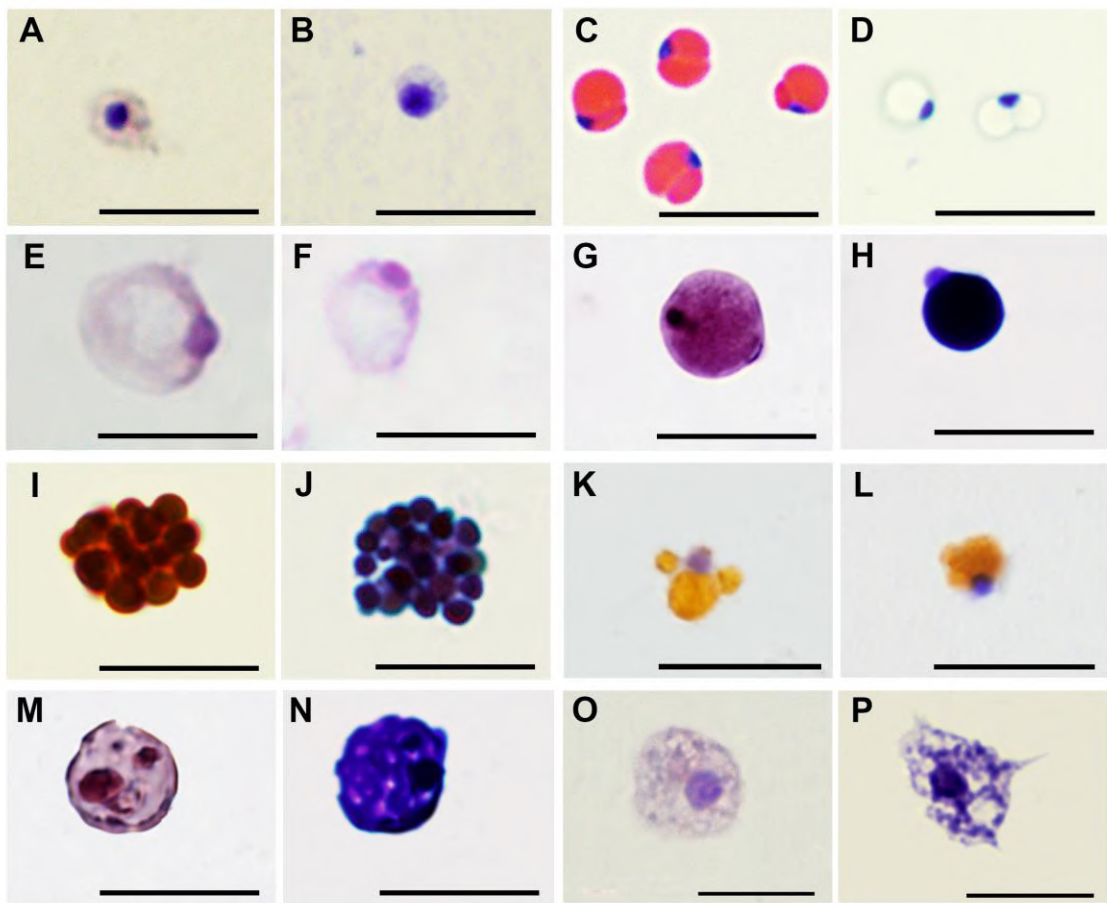


Figura 8 - Micrografia dos Hemócitos corados com Hematoxilina & Eosina (A, C, E, G, I, K, M, O) e Azul de Toluidina (B, D, F, H, J, L, N, P). Fig. A e B Hemoblasto (3,4 μ m); C e D Célula em anel de sinete (4,0 μ m); E e F Célula compartimentar (7,65 μ m); G e H Granulócito refrátil univacuolar (6,1 μ m); I e J células do tipo mórula (9,5 μ m); K e L Célula pigmentar (4,5 μ m); M e N nefrócito (7,1 μ m) e O e P Amebócito (11,6 μ m). Barra de escala: 10 μ m.

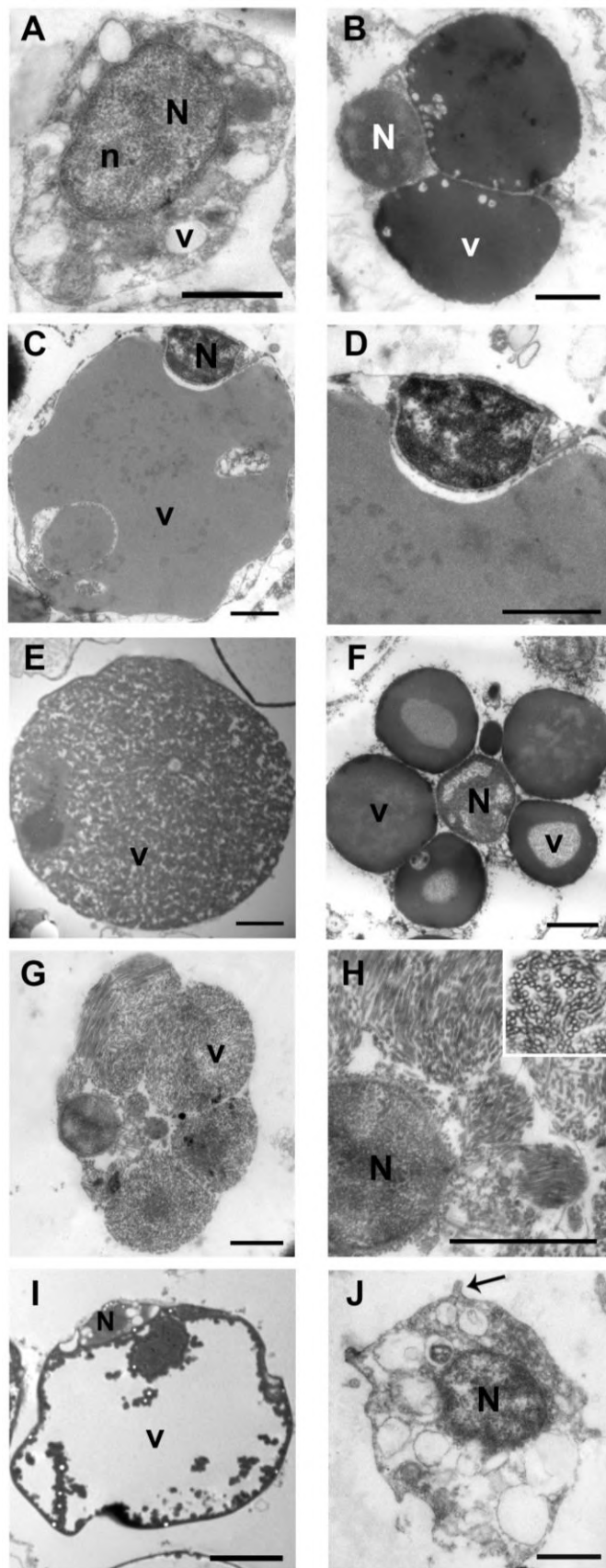


Figura 9 - Ultraestrutura dos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra* A) Hemoblasto; B) Célula em anel de sinete; C) Célula compartimentar; D) Maior aumento da célula compartimentar; E) Granulócito refrátil univacuolar; F) Célula do tipo Morula; G) Célula pigmentar; H) Célula Pigmentar; Inseto: Microtúbulos; I) Nefrócito; J) Amebócito. Barra de escala: 1 μ m.

5.2 - Quantificação da produção de NO pelos hemócitos frente a estímulos

Os hemócitos da ascídia *P. nigra* foram capazes de produzir NO, quando estimulados com Zymosan A e LPS, essa produção foi quantificada utilizando o marcador celular Diacetato DAF-FM. Os valores são mostrados em porcentagem em relação ao controle (100%).

A incubação das células com 5 µg/mL de Zymosan A durante 30 minutos foi capaz de induzir uma resposta significativa com um aumento para $132,14 \pm 9,97\%$ quando comparado ao controle ($P = 0,0073$). No tempo de 60 minutos com 5 µg/mL e 25 µg/mL de Zymosan A houve um aumento da produção de NO para $127,00 \pm 8,37 \%$ ($P = 0,0073$) e $140,00 \pm 12,09\%$ ($P = 0,0062$), respectivamente, em relação ao controle. Além disso, depois de 120 minutos nas concentrações de 5 µg/mL e 25 µg/mL de Zymosan A, o aumento da produção de NO foi para $107,42 \pm 2,84 \%$ ($P = 0,022$) e $123,28 \pm 7,48 \%$ ($P = 0,009$), respectivamente (figura 10).

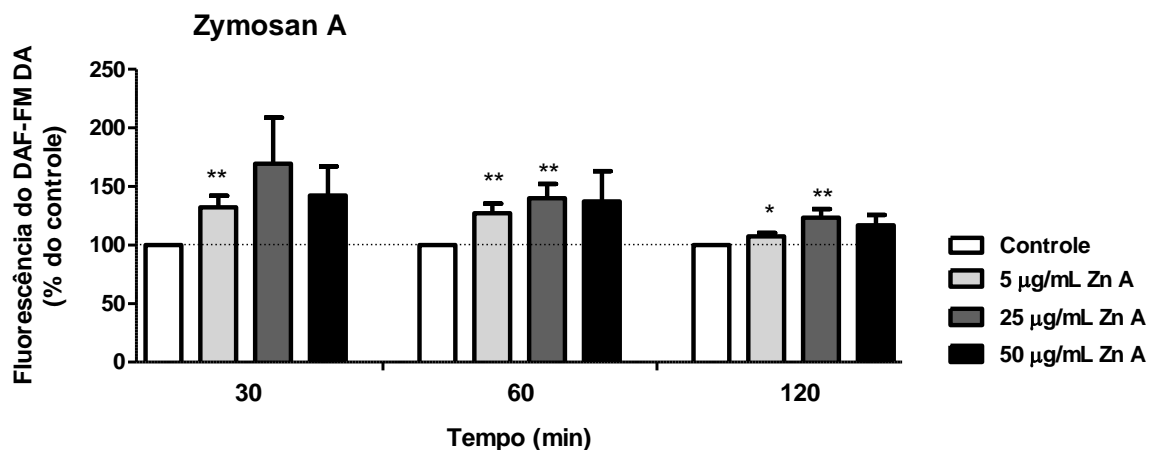


Figura 10 - Produção de NO pelos hemócitos da ascídia *P. nigra* incubados com várias concentrações de Zymosan A durante 120 minutos.

Na exposição ao LPS foi observado que a produção de NO aumentou em todos os tempos e concentrações testadas. O maior aumento foi observado aos 30 minutos e na concentração de 50 µg/mL de LPS que foi para $258 \pm 70,35 \%$ ($P = 0,044$). Aos 60 minutos, houve uma diminuição da produção de NO, em relação ao tempo de 30 minutos, porém foi observada uma resposta estatisticamente significativa com a dose de 50 µg/mL que aumentou para $236,3 \pm 52,51 \%$ ($P = 0,023$). Quando comparados os dois estímulos a figura 11 mostra que o LPS induziu uma maior produção de NO do que Zymosan A.

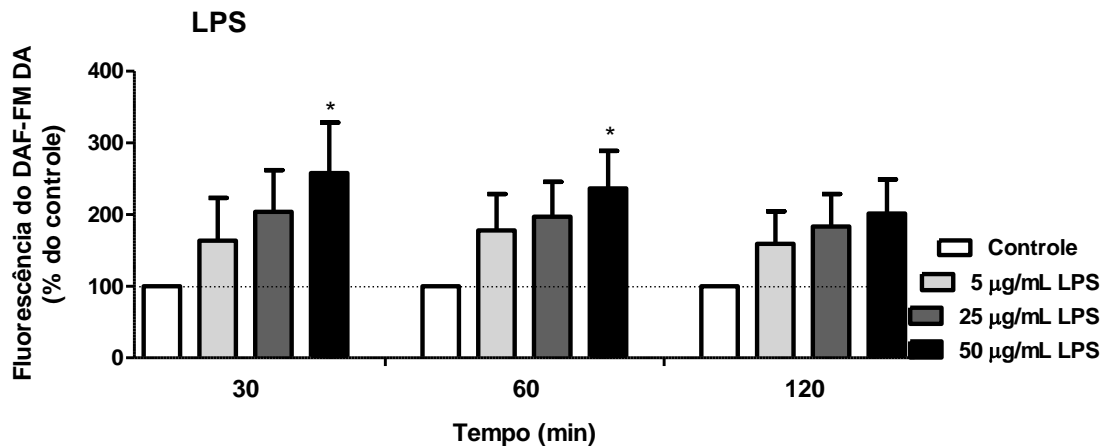


Figura 11 - Produção de NO pelos hemócitos da ascídia *P. nigra* incubados com várias concentrações de LPS durante 120 minutos.

O NO é um gás produzido pela oxidação da L- arginina a L-citrulina, mediada pela enzima NOS (BREDT e SNYDER, 1989). Nos mamíferos, o NO está relacionado com funções múltiplas, tais como sinalização intra e intercelular, neurotransmissão, vasodilatação e defesa (GARTHWAITE *et al.*, 1988; MONCADA *et al.*, 1991). Em invertebrados marinhos, NO é também relacionado com diversas funções, incluindo a defesa (STEFANO e OTTAVIANI, 2002; TAFALLA *et al.*, 2003; CIMA *et al.*, 2004; PALUMBO, 2005). Muitos estudos foram realizados em modelos de invertebrados utilizando Zymosan A, LPS ou outros materiais solúveis ou em partículas que estimulam a produção de NO pelas células do sangue (TAFALLA *et al.*, 2003; WRIGHT *et al.*, 2006; DE BARROS *et al.*, 2009), como por exemplo, no molusco *Ruditapes decussatus* (TAFALLA *et al.*, 2003), e na ascídia *Styela plicata* (De BARROS *et al.*, 2009). Nós demonstramos que os hemócitos da ascídia *P. nigra* produziram NO quando estimulados com Zymosan A e LPS, podendo ser caracterizado como um sistema de defesa desses animais. Além disso, observamos que Zymosan A e LPS provocaram respostas diferenciadas nos hemócitos da *P. nigra*, isso devido às características próprias de cada molécula e as respostas que elas podem desencadear, esses resultados sugerem o envolvimento de duas vias de sinalização diferentes para a produção de NO pelas células sanguíneas de *P. nigra*.

5.3 - Identificação do(s) hemócito(s) produtor(es) de NO

Através da reação de imunofluorescência, com anticorpo contra a enzima iNOS, foi possível identificar algumas células envolvidas na produção de NO: células em anel de sinete (A), granulócito refrátil univacuolar (G), e células do tipo mórula (M) (Figura 12 e 13).

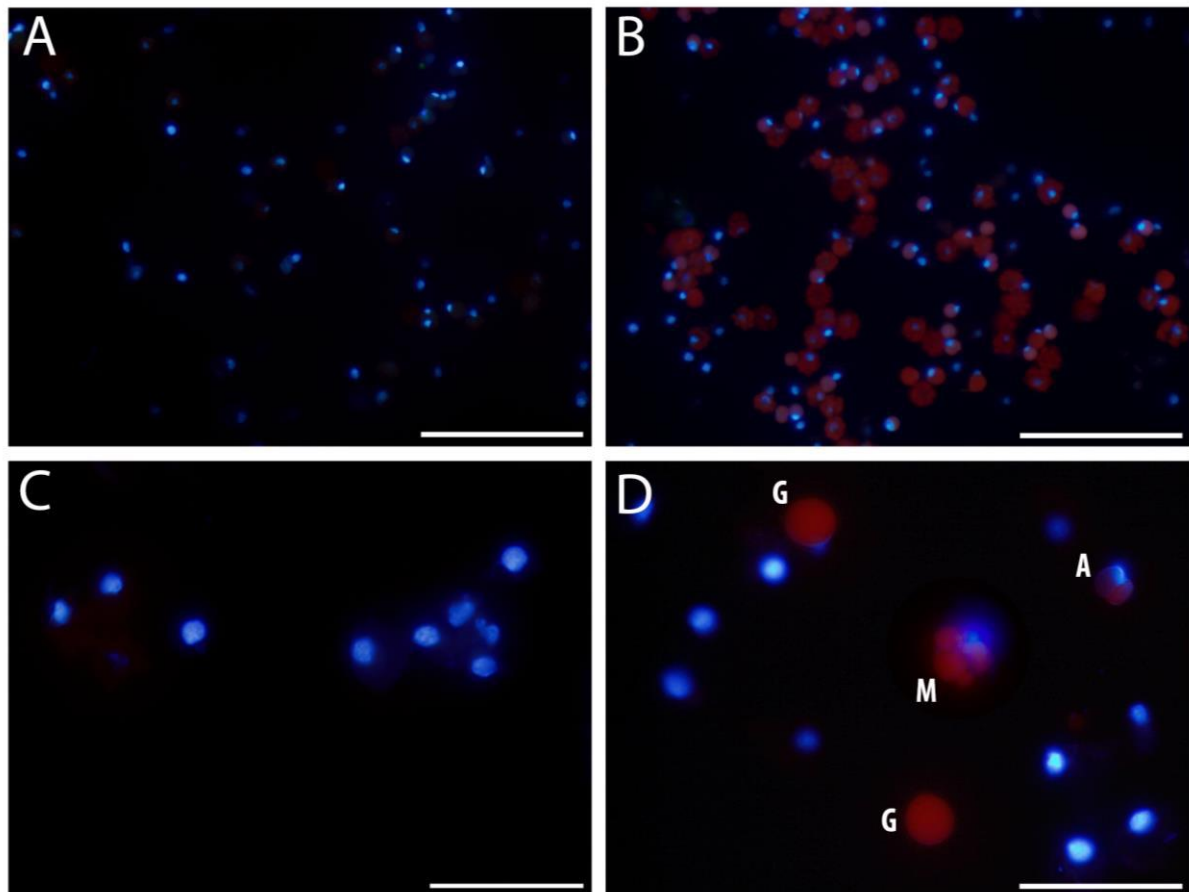


Figura 12 - Imunofluorescência com anticorpo contra iNOS nos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*. A, C) Controle sem o anticorpo primário, B, D) Hemócitos marcados para iNOS, em coloração vermelha, e a marcação nuclear (DAPI) em coloração azul. Barras de escala: A, B) 50 μ m; C, D), 20 μ m.

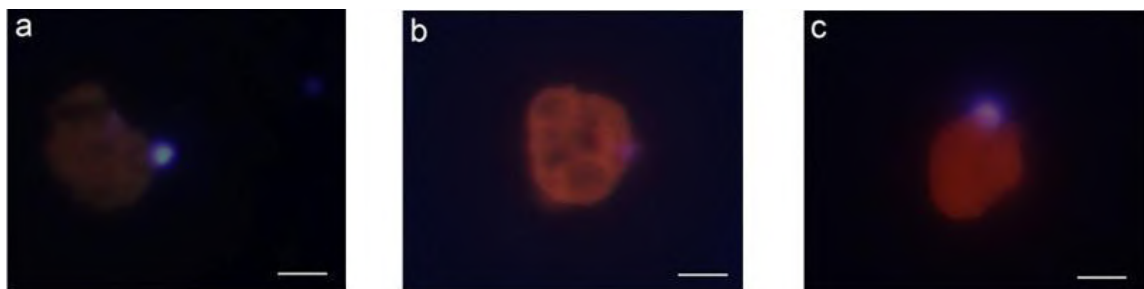


Figura 13 - Imunofluorescência para NOS. Célula do tipo Mórula. a) Sem estímulo; b) Estimulada com LPS; c) Estimulada com Zymosan A. Marcação azul: DAPI; Marcação vermelha: anti-iNOS. Barra de escala: 5 μ m.

5.4 - Identificação da via de sinalização envolvida na produção de NO pelos hemócitos da ascídia *P. nigra*.

5.4.1- L-NAME e DETA/NO

A fim de verificar a via de sinalização envolvida na produção de NO, utilizou-se o composto L-NAME, que compete com o substrato L-arginina pelo sítio ativo da enzima NOS. Após a incubação observou-se uma diminuição significativa da produção de NO, nos tempos de 30 e 60 minutos, nos hemócitos estimulados com Zymosan A ou LPS. Quando hemócitos foram incubados com 1 mM de L- NAME e os resultados comparados com o controle (sem Zymozan A) observou-se uma diminuição significativa para $13,88 \pm 23,9 \%$ em 30 minutos e para $18,88 \pm 18,38 \%$ em 60 minutos (figura 14).

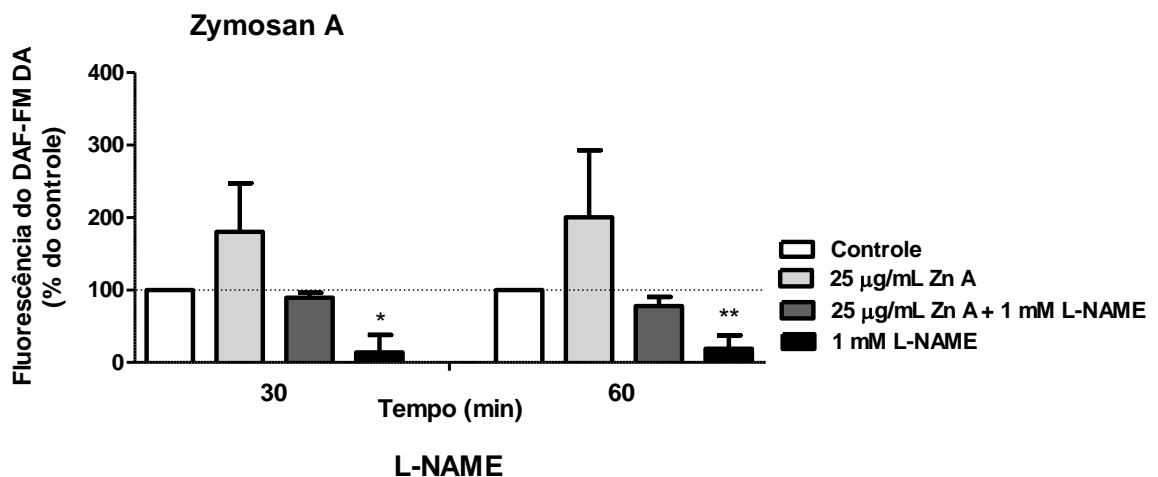


Figura 14 - Efeitos da inibição da enzima NOS, pelo composto L-NAME, nos hemócitos da ascídia *P. nigra* estimulados com Zymosan A

Quando os hemócitos foram incubados com 1mM de L-NAME e 25 µg/mL de LPS, observou-se decréscimo de fluorescência do DAF -FM para $72,33 \pm 30,90\%$ em comparação com os hemócitos estimulados apenas com LPS no tempo de 30 minutos. Quando se comparou a fluorescência do DAF -FM dos hemócitos incubados com L-NAME apenas com o controle foi observada uma diminuição para $13,88 \pm 23,98 \%$ e para $18,88 \pm 18,38 \%$ em 30 min e 60 min, respectivamente (figura 15).

A partir dos resultados apresentados, pode-se perceber que o L-NAME inibiu a produção de NO para níveis abaixo da linha basal de produção. Isso confirma que a enzima

NOS foi ativada e que o NO pode ser a molécula de defesa produzida pelos hemócitos da *P. nigra* após a exposição ao Zymosan A e LPS.

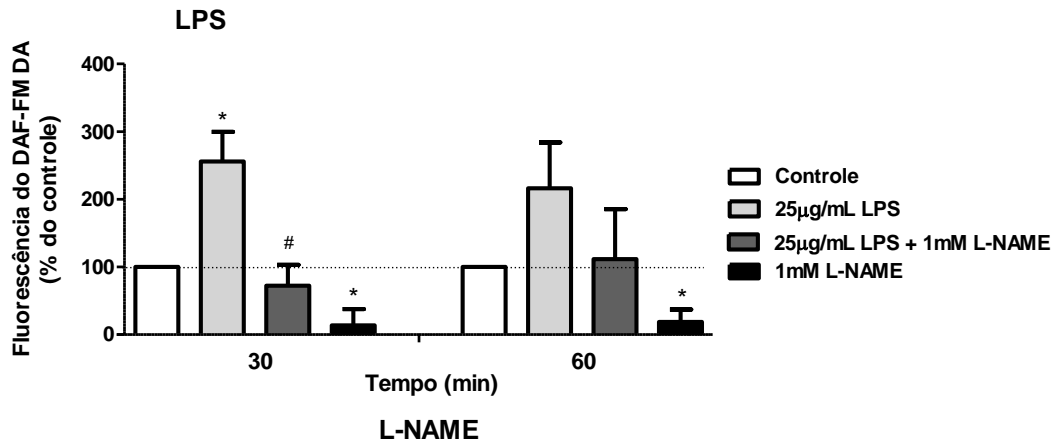


Figura 15 - Efeitos da inibição da enzima NOS, pelo composto L-NAME, nos hemócitos da ascídia *P. nigra* estimulados com LPS.

Para determinar os efeitos do NO exógeno foi utilizado um doador de NO, o DETA/NO, para tal, os hemócitos foram incubados com 200 mM de DETA/NO e a produção de NO foi quantificada através do espectrofluorímetro. A produção de NO aumentou nos hemócitos estimulados com Zymosan A e LPS. Os hemócitos estimulados com Zymosan A e pré-incubadas com DETA/NO tiveram a produção de NO aumentada para $332,5 \pm 122,2 \%$ e $324,0 \pm 127,2 \%$ nos tempos de 30 e 60 minutos, respectivamente (figura 16), mas não de forma significativa quando comparado com o controle. O mesmo resultado foi observado quando hemócitos não foram estimuladas com Zymosan A, mas pré-incubados com DETA/NO (figura 16).

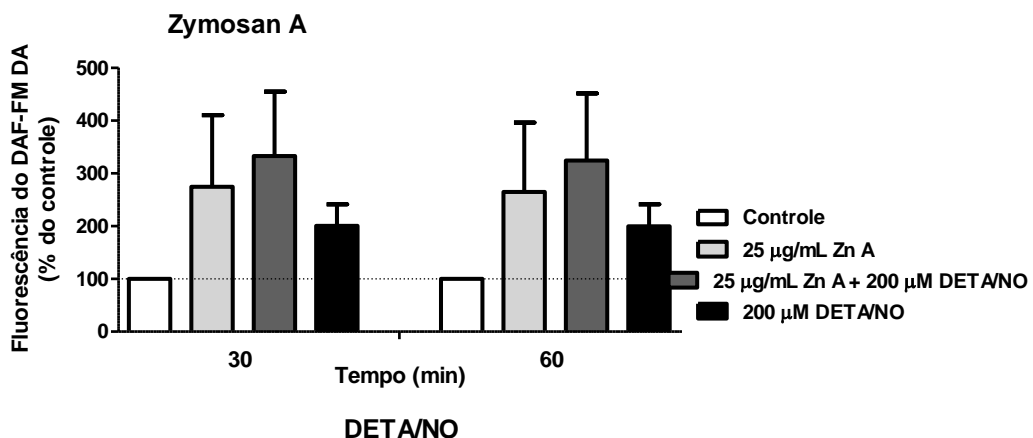


Figura 16 - Efeitos do NO exógeno na produção de NO nos hemócitos da *P. nigra* estimulados com Zymosan A.

Quando os hemócitos foram estimulados com LPS e pré-incubados com DETA/NO a produção de NO aumentou para $617,7 \pm 200,7$ % e $396,0 \pm 193,3$ % nos tempos de 30 e 60 minutos, respectivamente, quando comparado com o controle (figura 17), porém esses resultados não foram estatisticamente significativos.

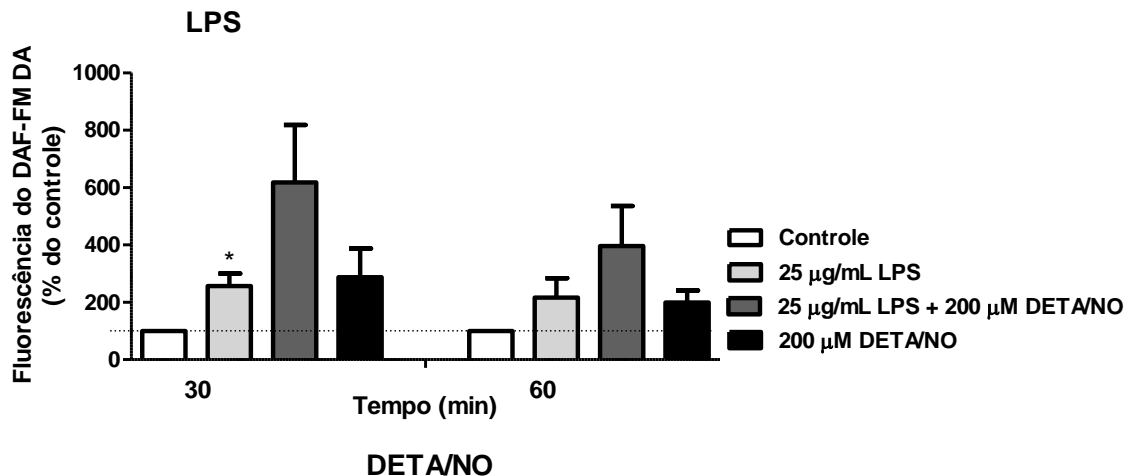


Figura 17 - Efeitos do NO exógeno na produção de NO nos hemócitos da *P. nigra* estimulados com LPS.

5.4.2- Envolvimento de proteínas quinases

As proteínas quinase A e C podem estar relacionadas com a via de sinalização da produção de NO nos hemócitos das ascídias *P. nigra*. Por esse motivo, nesse estudo foi observado o efeito da inibição dessas proteínas na produção de NO. O inibidor de PKC, GF109203X, a $1 \mu\text{M}$ inibiu significativamente a produção de NO nos hemócitos estimulados com $25 \mu\text{g/mL}$ de Zymosan A após os tempos de 30 e 60 minutos (figura 18). O inibidor de PKC diminuiu a produção de NO para $50,67 \pm 11,57$ % em 30 minutos ($p = 0,0055$) e $47,67 \pm 4,09$ %, em 60 minutos ($p = 0,012$).

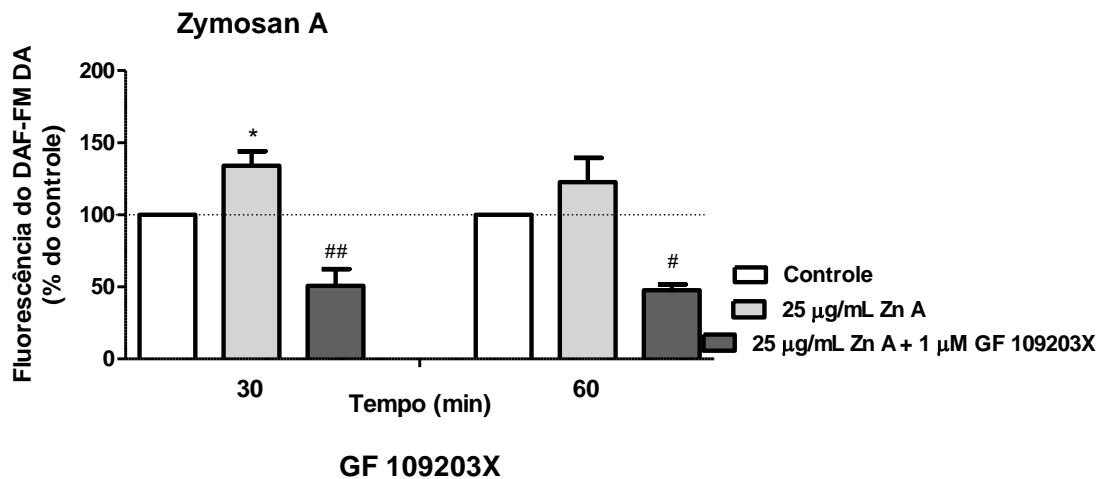


Figura 18 - Efeitos da inibição da PKC, sobre a produção de NO, nos hemócitos da ascídia *P. nigra* estimulados com Zymosan A.

A incubação de 1 µM do mesmo inibidor nos hemócitos estimulados com 25 µg/mL de LPS diminuiu a produção de NO para $4,33 \pm 13,30\%$ ($p = 0,0024$) aos 30 min. Após 60 minutos, a redução foi ainda mais proeminente, mas não significativa (figura 19).

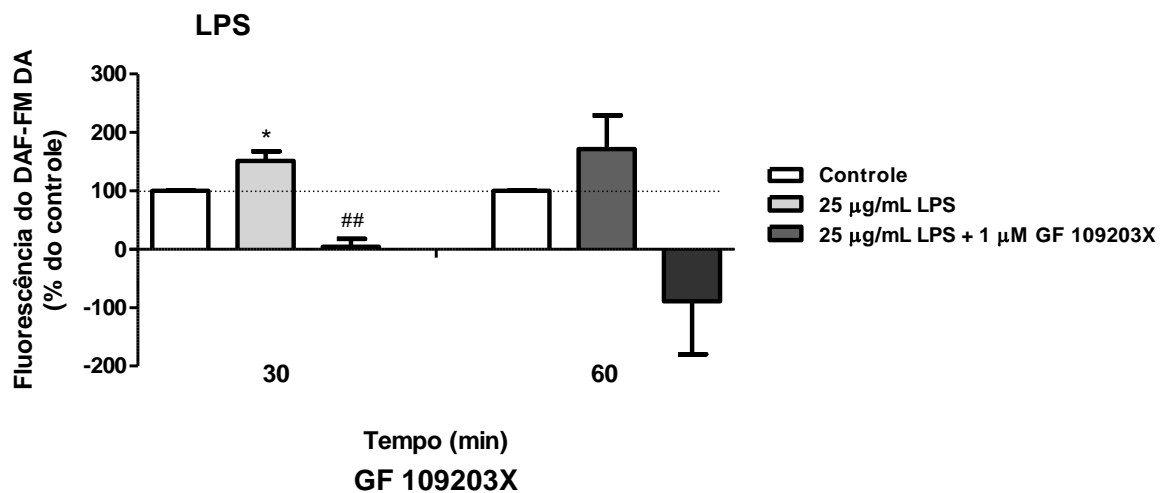


Figura 19 - Efeitos da inibição da PKC, sobre a produção de NO, nos hemócitos da ascídia *P. nigra* estimulados com LPS.

O inibidor de PKA, H-89, inibiu a produção de NO nos hemócitos estimulados com Zymosan A ou LPS. Observou-se uma redução da produção de NO nos tempos de 30 e 60 minutos após a utilização de 1 µM de H-89. Após 30 minutos, a redução foi para $22,67 \pm$

13,86% e após 60 minutos para $10,0 \pm 21,22\%$, nos hemócitos estimulados com $25 \mu\text{g/mL}$ de Zymosan A (figura 20).

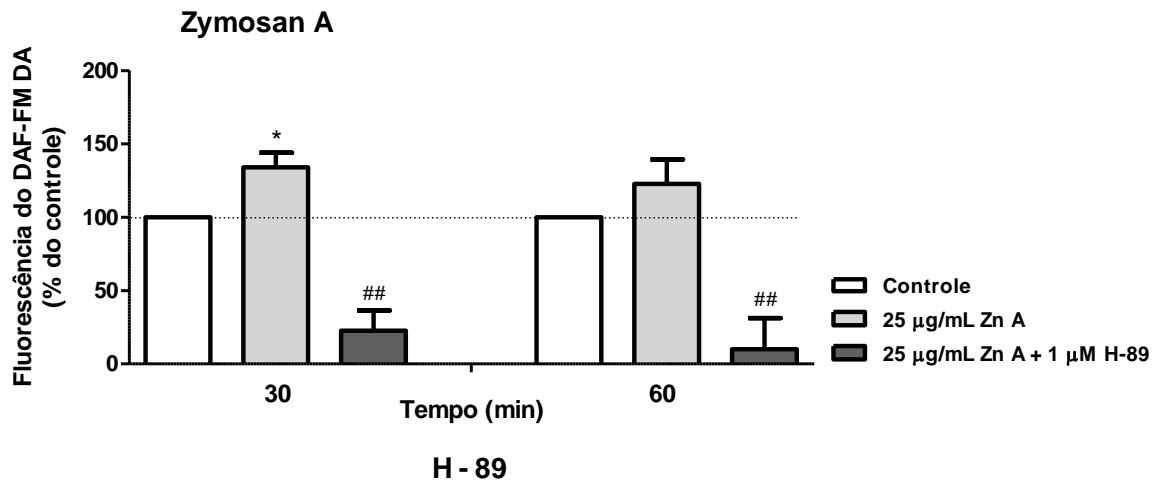


Figura 20 - Efeitos da inibição da PKA, sobre a produção de NO, nos hemócitos da *P. nigra* estimulados com Zymosan A.

Quando o estímulo utilizado foi de $25 \mu\text{g/mL}$ de LPS, o inibidor de PKA, H-89, reduziu a produção de NO para $3,33 \pm 32,89\%$ ($p = 0,016$) em 30 minutos. NO tempo de 60 minutos houve a redução da produção de NO nos hemócitos incubados com LPS e o inibidor, porém não foi estatisticamente significativa (figura 21).

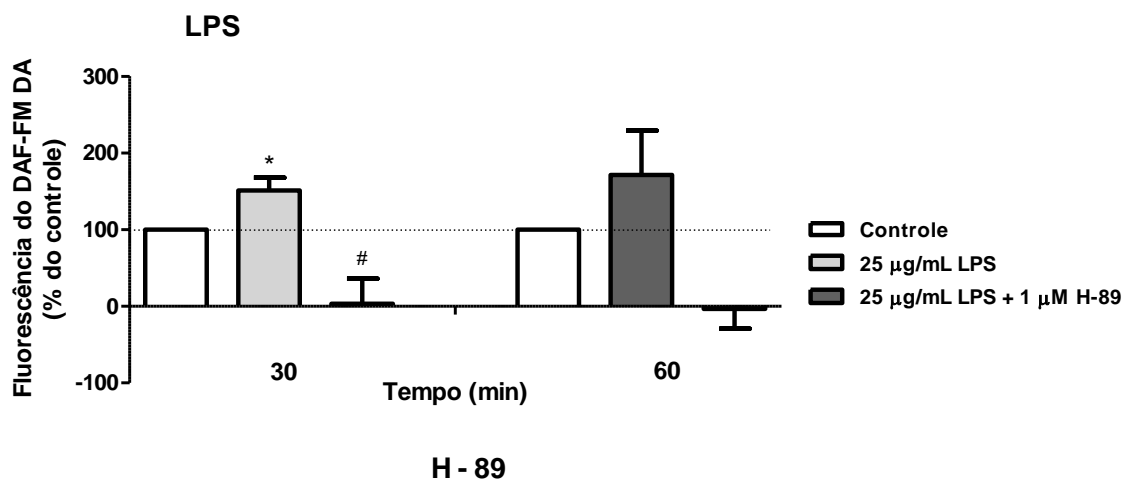


Figura 21 - Efeitos da inibição da PKA, sobre a produção de NO, nos hemócitos da *P. nigra* estimulados com LPS.

Na resposta imune inata de mamíferos, o papel da PKC tem sido muito estudado, e nos macrófagos essa enzima regula vários processos como adesão e difusão celular (CLARKE

e BRUGGE, 1995), fagocitose (ALLEN e ADEREM, 1995), e a produção de intermediários reativos de oxigênio ou nitrogênio (LARSEN *et al.*, 2000; CASTRILLO *et al.*, 2001). Quando os hemócitos do caracol *Lymnaea stagnalis* foram tratados com a laminarina (*Laminaria digitata*) ou PMA (Forbol 12-Miristato 13-Acetato) as moléculas envolvidas na geração de NO foram PKC e ERK (WRIGHT *et al.*, 2006) e quando foram tratados com LPS houve o envolvimento da PKC (WALKER e PLOWS, 2003). Por outro lado nos mexilhões *M. galloprovincialis* a PKA era a enzima relacionada com a produção de NO quando hemócitos foram estimulados com Interleucina-2 (NOVAS *et al.*, 2004). Em *P. nigra* o inibidor de PKC, GF109203X, e o inibidor de PKA, H -89, afetaram significativamente a produção de NO. Este fato sugere que ambas as proteínas quinases estão envolvidas na via de sinalização da produção de NO por células sanguíneas de *P. nigra*. Nossos dados sugerem que, quando os hemócitos foram estimulados com LPS, a via de sinalização da PKC foi mais inibida do que a via da PKA. No entanto, não podemos descartar a influência de H -89, o inibidor de PKA, sobre a produção de NO quando os hemócitos foram estimulados com LPS. Além disso, o H-89 inibiu quatro vezes mais do que o inibidor de PKC 60 minutos após as células sanguíneas terem sido estimuladas com Zymosan A.

5.4.1 - Imunofluorescência para NF- κ B

Através da imunofluorescência, pode-se observar que, quando comparados com o controle, Zymosan A e LPS foram capazes de ativar a via de sinalização de NF- κ B para produzir NO (figura 22). A marcação foi observada no citoplasma e no núcleo, o que indica que esta molécula foi ativada quando os estímulos foram utilizados (figura 22 C e E). No entanto, quando um inibidor de PKC foi utilizado nos hemócitos estimulados com LPS, a marcação nuclear e citoplasmática de NF- κ B diminuiu (figura 22 D). Quando hemócitos foram incubadas com Zymosan A e o inibidor de PKA, foram observados os mesmos efeitos, em que o núcleo e o citoplasma foram menos marcados (figura 22 F), esses resultados confirmam os dados obtidos em experiências anteriores, mostrando que é possível, dependendo da molécula estimulante NF κ B e PKC ou PKA estar envolvidos na via da produção de NO.

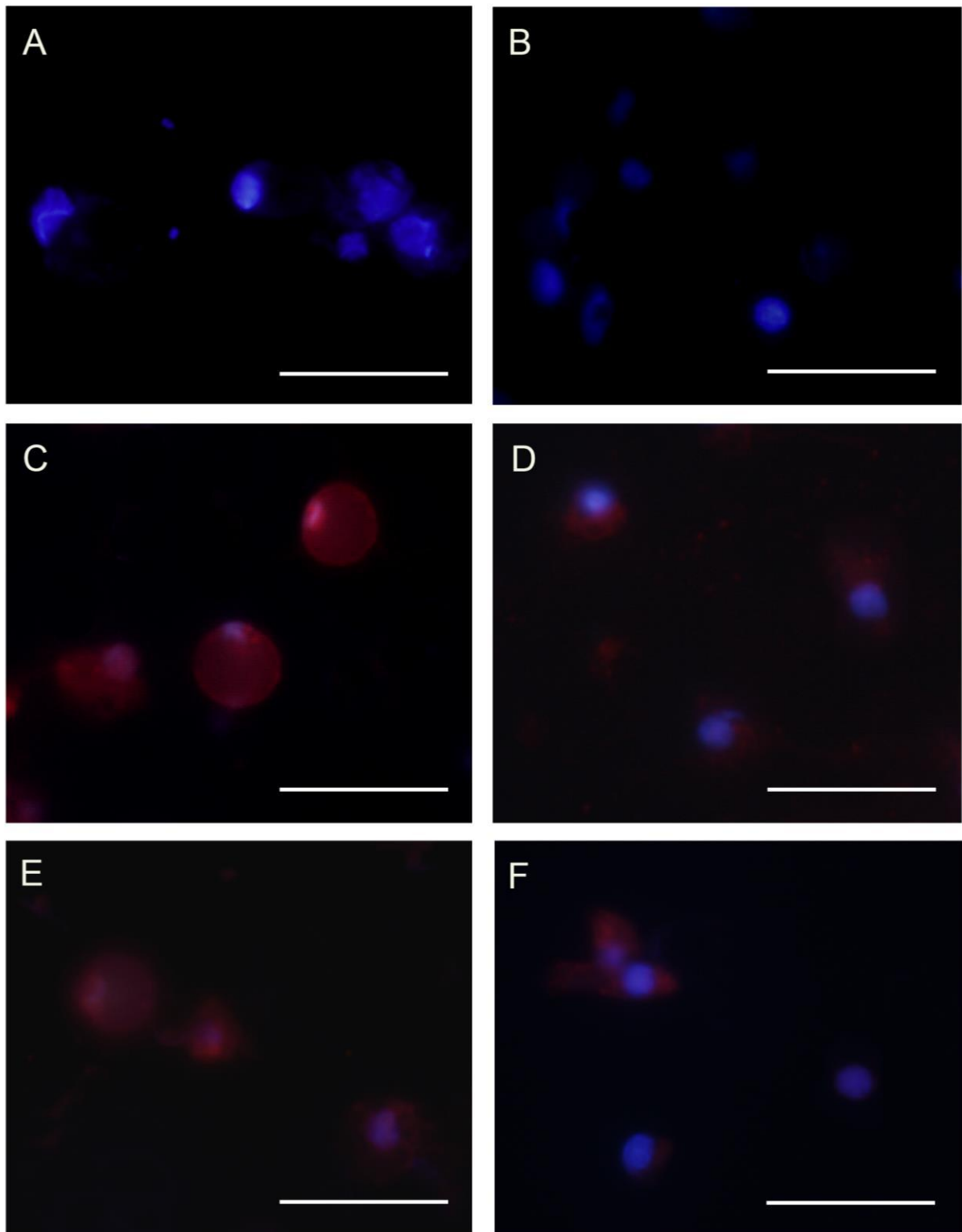


Figura 22 – Imunofluorescência com anticorpo anti- NFκB nos hemócitos da ascídia *Phallusia nigra*. (A) Controle negativo; (B) Controle positivo sem estímulo de LPS ou Zymosan A; (C) Estimulado com LPS; (D) Inibidor de PKC e estimulado com LPS, (E) Estimulado com Zymosan A; (F) Inibidor de PKA e estimulado com Zymosan A. Barra de escala: 10 μm.

Sabe-se que a via de sinalização TLR é a linha de frente do sistema contra microrganismos invasores, tanto na imunidade inata e adaptativa (IWASAKI e MEDZHITOV, 2004). Eles são ativados rapidamente pela maioria dos patógenos após encontro com o hospedeiro, e com LPS e Zymosan (HAJISHENGALLIS e LAMBRIS, 2010). Por exemplo, o TLR4 é descrito como receptor para LPS (POLTORAK *et al.*, 1998) e o TLR2 está provavelmente envolvido na sinalização induzida por Zymosan (TAKEUCHI, 2001). A família de genes TLR e suas vias estão bem conservadas evolutivamente nos invertebrados e vertebrados (HOFFMANN e REICHHART, 2002; ROACH *et al.*, 2005). Pode-se verificar que essas vias muitas vezes culminam na ativação do fator de transcrição NF- κ B, como, por exemplo, em *Drosophila*, em que duas vias de sinalização do sistema imunológico independentes levam à ativação do NF- κ B. Uma via responde essencialmente à infecção fúngica e bacteriana Gram-positiva, enquanto que a outra responde ao LPS ou a infecções por bactérias Gram-negativas (LEMAITRE *et al.*, 1996, LEMAITRE *et al.*, 1997). Nessas situações em que o NF- κ B está ativo, ele é translocado para o núcleo, e inicia a transcrição de citocinas inflamatórias (GHOSH *et al.*, 1998). Além disso, em experiências com o crustáceo *Carcinoscopius rotundicauda* a expressão de iNOS foi induzida após infecção por *Pseudomonas auriginosa*, e quando as células foram tratadas com inibidores específicos de NF- κ B foi observada uma redução da expressão de mRNA de iNOS (WANG *et al.*, 2006). Este pode ser o caso dos hemócitos da *P. nigra* em relação a via de sinalização que conduz a ativação do NF- κ B após estímulo com Zymosan A ou LPS. Portanto, pode-se sugerir um envolvimento do NF- κ B e, além disso, o envolvimento das proteínas quinases A e C para culminar na produção de NO.

5.5 - Análise da Viabilidade Celular

Tabela 1 - Análise da viabilidade celular. Valores em porcentagem mostram as células viáveis.

Compostos incubados	Tempo de Exposição		
	30 minutos	60 minutos	120 minutos
Zymosan A 5 µg/mL	98,5 %	97,5 %	96,5 %
Zymosan A 25 µg/mL	98,0 %	97,0 %	93,5 %
Zymosan A 50 µg/mL	97,5 %	96,5 %	92,5 %
LPS 5 µg/mL	99,5 %	98,5 %	97,5 %
LPS 25 µg/mL	97,5 %	98,0 %	93,5 %
LPS 50 µg/mL	97,5 %	96,5 %	91,5 %
Zymosan A + L-NAME	95,5 %	93,0 %	-
LPS + L-NAME	95,5 %	94,5 %	-
Zymosan A + DETA/NO	97,0 %	95,0 %	-
LPS + DETA/NO	95,0 %	94,5 %	-
Zymosan A + GF 109203X	96,5 %	95,5 %	-
LPS + GF 109203X	95,5 %	95,5 %	-
Zymosan A + H-89	97,0 %	97,0 %	-
LPS + H-89	97,0 %	95,5 %	-

Ao incubar os hemócitos com Zymosan A ou LPS, pode-se perceber que os valores em porcentagem de viabilidade celular só começaram a diminuir com as concentrações maiores do estímulo utilizado e também no tempo de 120 minutos, porém todos esses valores ficaram acima de 91,5%, portanto, pode-se dizer que a grande maioria das células se encontraram viáveis (tabela 1). E, que uma dose-resposta não foi tão evidente nos gráficos devido ao aumento de morte nas maiores concentrações de Zymosan A e LPS.

Quando foram utilizados o inibidor competitivo da enzima NOS (L-NAME) e os inibidores das proteínas quinases A e C (H-89 e GF 109203X, respectivamente), o teste de viabilidade celular evidenciou que a produção de NO diminuiu devido a inibição promovida pela droga e não devido a morte celular. Observando os gráficos temos a evidência de que nenhum dos inibidores causou a morte dos hemócitos, já que a maior parte das células permaneceram viáveis após os 60 minutos de incubação. Portanto, pode-se entender que realmente a produção de NO foi diminuída devido a inibição tanto da enzima NOS como das vias das proteínas quinases A e C. O que sugere mais uma vez que estas moléculas fazem parte da via de sinalização da produção de NO.

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, os dados apresentados nesse trabalho indicam que os invertebrados marinhos, como as ascídias, possuem uma resposta imunológica evidenciada e quantificada através da produção de NO frente a compostos presentes na parede celular de patógenos como o LPS e o Zymosan A. Também foi possível, através deste estudo aumentar nossos conhecimentos sobre a biologia celular dos hemócitos da ascídia *P. nigra*, anteriormente nunca descritos.

Além disso, os resultados mostram que os estímulos utilizados foram capazes de induzir a produção de NO pelos hemócitos e que essa produção pode estar relacionada com as vias de sinalização das proteínas quinases A e C, nas quais a via da PKC ocorre principalmente em resposta ao LPS e da PKA principalmente em resposta ao Zymosan A. E, que a ativação dessas vias culmina na translocação do NF- κ B da região citoplasmática para o núcleo, o que indica a sua ativação. Portanto pode-se concluir que PKC, PKA e NF- κ B desempenham um importante papel na ativação e subsequente produção de NO pela enzima NOS na ascídia *P. nigra*.

Por fim, sabe-se que o NO é, geralmente, considerado como uma molécula ancestral de defesa e os nossos resultados sugerem que os controles intracelulares que regulam a atividade das isoformas da NOS, nos vertebrados, pode ter se desenvolvido a partir de mecanismos regulatórios baseados em sinais celulares que originalmente se desenvolveram nos invertebrados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIRA, S.; TAKEDA, K. **Toll-like receptor signalling**. *Nature Reviews Immunology*, v. 4, P. 499-511, 2004.
- ALLEN, L.A.H.; ADEREM, A. **A role for MARCKS, the α isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages**. *J Exp Med*. v. 182, p. 829-840, 1995.
- ANDERSON, R.S. **Cellular responses to foreign bodies in the tunicate *Molgula manhattensis* (DeKay)**. *Biol. Bull.* v. 141, p. 91-98, 1971.
- ARUMUGAM, M., ROMESTAND, B., TORREILLES, J., ROCH, P. **In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis**. *Eur. J. Cell. Biol.* v. 79, p. 513-519, 2000a.
- ARUMUGAN, M.; ROMESTAND, B.; TORREILLES, J. **Nitrite released hemocytes from *Mytilus galloprovincialis***. *Aquatic Living Resources*, v.20, n. 13, p. 173-177, 2000.
- BALLARIN, L. **Immunobiology of compound ascidians, with particular reference to *Botryllus schlosseri*: state of art**. *Inv. Surv. J.* v. 5, p. 54-74, 2008.
- BALLARIN, L.; BURIGHEL, P. **Tunicata and Cephalochordata**. In: “**Biological and Medical Sciences**”, G. Contrafatto and A. Minelli eds., in: “**Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)**”, Eolss Publishers, Oxford, UK, 2002.
- BALLARIN, L.; CIMA, F. **Cytochemical properties of *Botryllus schlosseri* haemocytes: indications for morpho-functional characterisation**. *Eur. J. Histochem.* v. 49, p. 255-264, 2005.
- BALLARIN, L.; CIMA, F.; SABBADIN, A. **Histoenzymatic staining and characterization of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* hemocytes**. *Boll. Zool.* v. 60, p. 19-24, 1993.
- BALLARIN, L.; FRANCHINI, A.; OTTAVIANI, E.; SABBADIN, A. **Morula cells as the main immunomodulatory haemocytes in ascidians: evidence from the colonial species *Botryllus schlosseri***. *Biol. Bull.* v. 201, p. 59-64, 2001.
- BARNES, R. D.; RUPPERT, E. E.; FOX, R. S. **Zoologia dos invertebrados: Uma abordagem funcional-evolutiva**. São Paulo, p. 1083-1118, 2005.
- BEIRAS, R.; BELLASA, J.; FERNANDEZA, N.; LORENZO, J.I.; COBELO-GARCÍA, A. **Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo-larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis***. *Mar. Envir. Res.* v. 56, p. 531-553, 2003.
- BELL, M.V.; PIRIE, B.J.S.; MCPHAIL, D.B.; GOODMAN, B.A.; FALK-PETERSEN, L.B. **Contents of vanadium and sulphur in the blood cells of *Ascidia mentula* and *Ascidella aspersa***. *J. Mar. Biol Assoc. UK.* v. 62, p. 709-716, 1982.
- BLAIR, J.E; HEDGES, S.B. **Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals**. *Mol. Biol. Evol.* v. 22, n. 11, p. 2275-2284, 2005.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. **Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity**. *Current Opinion in Immunology*, v. 12, p. 64-76, 2000.

- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. **Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v. 87, p. 682-685, 1990.
- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. **Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., v. 86, p. 9030-3, 1989.
- BURIGHEL, P.; CLONEY, RA. (1997) **Urochordata: Ascidiacea.** In: Harrison FW, Ruppert EE, editors. Microscopic anatomy of invertebrates, vol. 15. New York: Wiley-Liss Inc. p 221–347, 1997.
- BURIGHEL, P.; MILANESI, C.; SABBADIN, A. **Blood cell ultrastructure of the ascidian *Botryllus schlosseri*.** II. Pigment cells. Acta. Zool. (Stockh) v. 64, p. 15–23, 1983.
- CAMMARATA, M., ARIZZA, V., CANDORE, G., CARUSO, C., PARRINELLO, N. **Phenoloxidase-dependent cytotoxic mechanism in ascidian (*Styela plicata* hemocyte active against erythrocytes and K562 tumour cells.** Eur. J. Cell Biol. v. 74, p. 302–307, 1997.
- CAMMARATA, M.; CANDORE, G.; ARIZZA, V.; CARUSO, C.; PARRNELLO, N. **Cytotoxic activity of *Styela plicata* hemocytes against mammalian cell targets: II. Properties of the in vitro reaction against human tumour cell lines.** Anim. Biol. v. 4, p. 139–144, 1995.
- CARBALLO, L.; NARANJO, S. **Environmental assessment of a large industrial marine complex based on a community of benthic filter-feeders.** Mar. Pol. Bul. v. 44, p. 605-610, 2002.
- CARVALHO, M. F. B. **O Modelo AVS Contribuindo na Avaliação do Grau de Remobilização e da Disponibilidade de Metais em Ecossistemas Aquáticos.** Tese (Doutorado). Departamento de Geoquímica – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2001.
- CASTRILLO, A.; PENNINGTON, D.J.; OTTO, F.; PARKER, P.J.; OWEN, M.J.; BOSCA, L. **Protein kinase Cepsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection.** J Exp Med. v. 194, p. 1231-1242, 2001.
- CHEN, C.C.; WANG, J.K. **p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages.** Mol. Pharmacol. v. 55, p. 481–488, 1999.
- CIMA, F.; BALLARIN, L.; SABBADIN, A. **New data on phagocytes and phagocytosis in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*.** Ital. J. Zool. v. 63, p. 357-364, 1996.
- CIMA, F.; SABBADIN, A.; BALLARIN, L. **Cellular aspects of allorecognition in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*.** Dev. Comp. Immunol. v. 28, p. 881–889, 2004.
- CLARKE, E. A.; BRUGGE, J. S. **Integrins and signal transduction pathways: the road taken.** Science. v. 268, p. 233-238, 1995.
- COMES, S.; LOCASCIO, A.; SILVESTRE, F.; D'ISCHIA, M.; RUSSO, G.L.; TOSTI, E.; BRANNO, M.; PALUMBO, A. **Regulatory roles of nitric oxide during larval developmental and metamorphosis in *Ciona intestinalis*.** Dev. Biol. v. 306, p.772–784, 2007.
- CONTE, A.; OTTAVIANI, E. **Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes.** FEBS Letters, v. 365, p. 120–124, 1995.
- CORREIA, A. A. **Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidae) tratadas com nim (Azadirachta indica A. Juss).** Dissertation, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008.

- DA ROCHA, R.M.; DA CRUZ, L.T.M.; DE ALMEIDA, R.S. **The biology of *Phallusia nigra* Savigny, 1816 (Tunicata: Ascidiacea) in southern Brazil: Spatial distribution and reproductive cycle.** Bull. Mar. Sci.v. 64, p. 77-87, 1999.
- DAN-SOHKAWA, M.; MORIMOTO, M.; KANEKO, H. **In vitro reactions of coelomocytes against sheep red blood cells in the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*.** Zool. Sci. v. 12, p. 411–417, 1995.
- DE BARROS, C.M., DE CARVALHO, D.R., ANDRADE, L.R., PAVAO, M.S. AND ALLODI, S. **Nitric oxide production by hemocytes of the ascidian *Styela plicata*.** Cell Tissue Res. v.338, p. 117–128, 2009.
- DE LEO G. **Ascidian hemocytes and their involvement in defense reactions.** Boll. Zool, v. 59, p. 195–213, 1992.
- DELSUC, F.; BRINKMANN, H.; CHOURROUT, D.; PHILIPPE, H. **Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates.** Nature. v. 439, p. 965-968, 2006.
- DRAUGHON, L.S.; SCARPA, J; HARTMANN, J.X. **Are filtration rates for the rough tunicate *Styela plicata* independent of weight or size?** J. Envir. Sci. Health, Part A v. 45, p.168-176,2010.
- DUNN, C.W.; HEJNOL, A.; MATUS, D.Q.; PANG, K.; BROWNE, W.E.; SMITH, S.A.; SEAVER, E.C.; ROUSE, G.W.; OBST, M.; EDGECOMBE, G.D.; SØRENSEN, M.V.; HADDOCK, S.H.D.; SCHMIDT-RHAESA, A.; OKUSU, A.; KRISTENSEN, R.M.; WHEELER, W.C.; MARTINDALE, M.Q.; GIRIBET, G. **Broad phylogenetic sampling improves resolution of the animal tree of life.** Nature v. 452, p. 745-750, 2008.
- DUSSE, L.M.A.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. **Revisão sobre óxido nítrico.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.
- DUSTING, G.J.; MACDONALD, P.S. **Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation.** Ann. Med., v. 27, p. 395-406, 1995.
- ENDEAN, R. **Discovery of iron in tunicin-forming blood cells of an ascidian.** Nature, v. 172, p. 123, 1953.
- ENDEAN, R. **Studies of the blood and tests of some Australian ascidians.** III. The formation of the test of *Pyura stolonifera* (Heller). Aust. J. Mar. Freshwater Res. v. 6, p. 157–164, 1955.
- EROLD-ERICKSON, M.; MISHRA, S.; & SCHNEIDER, D. **Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*.** Current Biology. v. 10, p. 781–784, 2000.
- FAWCETT, D.W.; **The Cell**, 2^a ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1981.
- FRANCHI N.; SCHIAVON F.; CARLETTO M.; GASPARINI F.; BERTOLONI G.; TOSATTO S.C.E.; BALLARIN L. **Immune roles of a rhamnose-binding lectin in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*.** Immunobiology. v. 216, p. 725-736, 2011.
- FRANCHINI, A.; FONTANILI, P.; OTTAVIANI, E. **Invertebrate immunocytes: Relationship between phagocytosis and nitric oxide production.** Comparative Biochemistry and Physiology. v. 110B, p. 403–407, 1995
- FUKE, M.; FUKUMOTO, M. **Correlative fine structural, behavioral, and histochemical analysis of ascidian blood cells.** Acta Zoologica (Stockholm). v. 74, p. 61–71, 1993.

- GARTHWAITE, J.; CHARLES S.L.; CHESS WILLIAMS, R. **Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain.** *Nature*. v. 336, p. 385–388, 1988.
- Ghosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B. (1998). **NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.** *Annu.Rev. Immunol.* 16, 225-260.
- GOODBODY, I. **Diversity and distribution of ascidians (Tunicata) in the Pelican Cays, Belize.** *Atoll Research Bulletin*. v. 480, p. 302-326, 2000.
- GOODBODY, I. **The biology of *Ascidia nigra* (Savigny). I. Survival and mortality in an adult population.** *Biol. Bull.* v. 122, p. 40-51, 1962.
- GOODBODY, I. **The physiology of ascidians.** *Adv. Mar. Biol.* v. 12, p. 1–149, 1974.
- GUPTA, A.P. **Insect hemocytes: Development, forms, functions and techniques.** Cambridge: Cambridge University Press, 1979.
- HAJISHENGALLIS, G.; LAMBRIS, J.D. **Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system.** *Trends in Immunology*, v. 31, p. 154-63, 2010.
- HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. **Macrophage cytotoxicity: role of L-arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite.** *Science*, v. 235, p. 473-476, 1987.
- HOFFMANN, J.A.; REICHHART, J.M. **Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective.** *Nat. Immunol.* v. 3, p. 121–126, 2002.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. **Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.** *Nat Immunol.* v. 5, p. 987-95, 2004.
- KAPLAN, EH. **A field guide to southeastern and Caribbean seashores: Cape Hatteras to the Gulf coast, Florida, and the Caribbean.** Houghton Mifflin Co. Boston, MA. USA, 1988.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. **TLR signaling.** *Semin Immunol.* v.19, p. 24-32, 2007.
- KHALTURIN, M. D.; LITVINCHUK, S. N.; BORKIN, L. J.; ROSANOV, J.M.; MILTO, K.D. **Genetic variation in two cryptic forms, with different genome size, of the common spadefoot toad, *Pelobates fuscus* (Pelobatidae, Anura, Amphibia),** v. 45, n. 3, p. 308 – 323, 2003.
- KNOWLES, R.G. *et al.*, **Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 86, p. 5159-62, 1989.
- KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. **Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescence indicators: diaminofluoresceins.** *Anal Chem.* v. 70, p. 2446–2453, 1998 b.
- KOJIMA, H.; SAKURAI, K.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. **Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore.** *Chem Pharm Bull*, v. 46, p. 373-375, 1998 a.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. **Pathogen recognition in the innate immune response.** *Biochem. J.* v. 420, p. 1-16, 2009a.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. **Toll-like receptors and innate immunity.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 388, p. 621-625, 2009b.

- LARSEN, E.C.; DIGENNARO, J.A.; SAITO, N., MEHTA, S.; LOEGERING, D.J.; MAZURKIEWICZ, J.E.; LENNARTZ, M.R. **Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells.** J Immunol. v. 165, p. 2809-2817, 2000.
- LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. **Insect hemocytes and their role in immunity.** Insect Biochemistry and Molecular Biology. v. 32, p. 1295–1309, 2002.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J.A. **The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults.** Cell v. 86, p. 973-983, 1996.
- LEMAITRE, B.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J.A. ***Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms.** Proc Natl Acad Sci. v. 94, p. 14614–14619, 1997.
- LOWENBERGER, C. (2001). **Innate immune response of *Aedes aegypti*.** Insect Biochemistry and Molecular Biology. v. 31, p. 219–229, 2001.
- LYONS, C.R. *et al.* **Molecular cloning and functional expression. of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line.** J. Biol. Chem. v. 267, p. 6370-6374, 1992.
- MANDATO, C. A. **Modulators of the insect cellular immune response.** Thesis, University of Waterloo, 1998.
- MARINS, F.O. **Efeitos da eutrofização no desenvolvimento inicial das comunidades de Ascidiacea na região de Angra dos Reis, RJ.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zoologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro. p. 93, 2007.
- MARINS, F.O.; NOVAES, R.L.M.; ROCHA, R.M.; JUNQUEIRA, A. **Non indigenous ascidians in port and natural environments in a tropical Brazilian bay.** Zool. Intern. J. Zool. v. 27, p. 213-221, 2010.
- MARLETTA, M.A *et al.* **Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate.** Biochemistry, v.27, p. 8706-11, 1988.
- MARLETTA, M.A. **Nitric oxide synthase structure and mechanism.** J.Biol.Chem. v. 268, n.17, p. 12231-12234, 1993.
- MARLETTA, M.A. **Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis.** Cell, v. 78, p. 927-930, 1994.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A. **A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.** Nature, v. 388, p. 394-397, 1997
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; KOPP, E.; STADLEN, A., CHEN, C.; GHOSH, S. **MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways.** Mol. Cell, v.2, p. 253-258, 1998.
- MENIN, A.; BALLARIN, L. **Immunomodulatory molecules in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*: evidence from conditioned media.** J. Invertebr. Pathol. v. 99,p. 275–280, 2008.
- MENIN, A.; DEL FAVERO, M.; CIMA, F.; BALLARIN, L.; **Release of phagocytosis-stimulating factor(s) by morula cells in a colonial ascidian.** Mar. Biol. v. 148, p. 225–230, 2005.

- MILANESI, C.; BURIGHEL, P. **Blood cell ultrastructure of the ascidian *Botryllus schlosseri*. I.** Hemoblast, granulocytes, macrophage, morula cell and nephrocyte. *Acta Zoologica*, v. 59, p. 135–147, 1978.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. **Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.** *Pharmacol. Rev.* v. 43, p. 109–142, 1991.
- MONNIOT, F. **Ascidies interstitielles des côtes d'Europe.** *Mém. Mus. Nat. Hist. Nat., Paris, Sér. A*, v. 35, p. 1-154, 1965.
- MORRIS, S.M.; BILLIAR, T.R. **New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis.** *Am. J. Physiol.* v. 266, p. E829-839, 1994.
- NARANJO, S.A.; CARBALLO, J.L.; GARCÍA-GOMES, J.C.; **Effects environmental stress on ascidians populations in Algeciras Bay (Southern Spain).** *Mar. Ecol. Prog. Ser.* v. 144, p. 119-131, 1996.
- NETTE, G., SCIPPA, S., DE CANDIA, A. and VINCENZI, M. **Cytochemical localisation of vanadium (III) in the blood cells of the ascidian *Phallusia fumigata*.** *Comp Biochem and Physiol C Toxicol Pharmacol.* v. 137, p. 271–279, 2004.
- NETTE, G.; SCIPPA, S.; GENOVESE, M.; DE VINCENZI, M. **Cytochemical localisation of vanadium (III) in blood cells of ascidian *Phallusia mammillata* Cuvier and its relevance to hematic cell lineage determination.** *Comp. Biochem. Physiol.* v. 122, p. 231–237, 1999.
- NISHIDA, K. *et al.*, **Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial nitric oxide synthase.** *J. Clin. Invest.* v.90, p. 2092-2096, 1992.
- NOVAS, A.; CAO, A.; BARCIA, R.; RAMOS-MARTINEZ, J.I. **Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* v. 36, p. 390–394, 2004.
- OHTAKE, S.; ABE, T.; SHISHIKURA, F.; TANAKA, K. **The phagocytes in hemolymph of *Halocynthia roretzi* and their phagocytic activity.** *Zool. Sci.* v. 11, p. 681–691, 1994.
- OKUYAMA, M.; SAITO, Y.; OGAWA, M.; TAKEUCHI, A.; JING, Z.; NAGANUMA, T.; HIROSE, E. **Morphological studies on the bathyal ascidia *Megalodicopia hians* Oka 1918 (Octacnemidae, Phlebobranchia), with remarks on feeding and tunic morphology.** *Zool. Sci.* v. 19, p. 1181-1189, 2002.
- OLTZ, E.M.; BRUENING, R.C.; SMITH, M.J.; KUSTIN, K.; NAKANISHI, K. **The tunichromes. A class of reducing blood pigments from sea squirts: isolation, structures and vanadium chemistry.** *J. Am. Chem. Soc.* v. 110, p. 6162–6172, 1988.
- PALUMBO, A. **Nitric oxide in marine invertebrates: A comparative perspective.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 142, p. 241 – 248, 2005.
- PARRINELLO, N.; ARIZZA, V.; CAMMARATA, M.; PARRINELLO, D. **Cytotoxic activity of *Ciona intestinalis* (Tunicata) hemocytes: properties of the in vitro reaction against erythrocyte targets.** *Dev. Comp. Immunol.* v.17, p. 19–27, 1993.
- PARRINELLO, N.; CAMMARATA, M.; ARIZZA, V. **Univacuolar refractile hemocytes from the tunicate *Ciona intestinalis* are cytotoxic for mammalian erythrocytes *in vitro*.** *Biol Bull.* v. 190, p. 418-425, 1996.

- PARRINELLO, N.; PATRICOLO, E. **Inflammatory-like reaction in the tunic of *Ciona intestinalis* (Tunicata)**. II. Capsule components. *Biol. Bull.* v. 167, p. 238–250, 1984.
- PARRINELLO, N.; PATRICOLO, E.; CANICATTI, C. **Inflammatory-like reaction in the tunic of *Ciona intestinalis* (Tunicata)**. I. Encapsulation and tissue injury. *Biol. Bull.* v. 167, p. 229–237, 1984.
- PEDDIE, C.M.; SMITH, V.J. **Mechanism of cytotoxic activity by hemocytes of solitary ascidian, *Ciona intestinalis***. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* v. 270, p. 335–342, 1994.
- POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M.Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. **Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene**. *Science*, v. 282, p. 2085–2088, 1998.
- RADOMSKI, M.W. *et al.* **An L-arginine: nitric oxide pathway presente in human platelets regulates aggregation**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 87, p. 5193-7, 1990. 51
- RAFTOS, D.A.; TAIT, N.N.; BRISCOE, D.A. **Cellular basis of allograft rejection in the solitary urochordate, *Styela plicata***. *Dev. Comp. Immunol.* v. 11, p. 713–725, 1987.
- RANDLOV, A.; RIISGARD, H.U. **Efficiency of perticle retention and filtration rate in four species of ascidians**. *Marine Ecology Progress Series*, v. 1, p. 55-59, 1979.
- REES, D.D. *et al.* **Chacterization of three inhibitors of endotelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo**. *Br. J. Pharmacol.* v. 101, p. 746-752, 1990.
- RIBIÈRE, C.; JAUBERT, A.M.; SABOURAULT, D.; LACASA, D.; GIUDICELLI, Y. **Insulin stimulates nitric oxide production in rat adipocytes**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 291, p. 394–399, 2002.
- RINKEVICH, B.; RABINOVITZ, C. **In vitro culture of blood cells from the colonial protochordate *Botryllus schlosseri***. *In Vitro Cell Dev. Biol.* v. 29, p. 79-85, 1993.
- ROACH, J.C.; GLUSMAN, G.; ROWEN, L.; KAUR, A.; PURCELL, M.K.; SMITH, K.D.; HOOD, L.E.; ADEREM, A. **The evolution of vertebrate Toll-like receptors**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 102, p. 9577–9582, 2005.
- RUPPERT, E.E. **Key characters uniting hemichordates and chordates: homologies or homoplasies?** *Can. J. Zool.* v. 83, p. 8-23, 2005.
- SABBADIN, A. **Studio sulle cellule del sangue di *Botryllus schlosseri* (Pallas) (Ascidacea)**. *Arch. Ital. Anat. Embriol.* v. 60, p. 33-67, 1955.
- SCHLUMPBERGER, J.M.; WEISSMAN, I.L.; SCOFIELD, V.L. **Separation and labeling of specific subpopulations of *Botryllus* blood cells**. *J. Exp. Zool.* v. 229, p. 401-11, 1984.
- SCIPPA, S.; BOTTE, L.; DE VINCENZI, M.; **Ultrastructure and X-ray microanalysis of blood cells of *Ascidia malaca***. *Acta. Zool. (Stockh)* v. 63, p. 121–131, 1982.
- SMITH, M.J. **The blood cells and tunic of the ascidian *Halocynthia aurantium* (Pallas)**. I. Hematology, tunic morphology, and partition of cells between blood and tunic. *Biol. Bull.* v. 138, p. 354–378, 1970.
- STEFANO, G.B.; OTTAVIANI, E. **The biochemical substrate of nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms**. *Brain Res.* v. 924, p. 82-89, 2002.

- SWALLA, B.J.; CAMERON, C.B.; CORLEY, L.S.; GAREY, J.R.; **Urochordates are monophyletic within the deuterostomes**. *Syst. Biol.* v. 49, n. 1, p. 52-64, 2000.
- TAFALLA, C.; GOMEZ-LEON, J.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. **Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes**. *Dev Comp Immunol.* v. 27, p. 197–205, 2003.
- TAKEUCHI, O.; AKIA, S. **Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system**. *International Immunopharmacology*, v. 1, p. 625–635, 2001.
- TORREILLES, J.; GUÉRIN, M.C.; **Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes in vitro**. *Fish Shellfish Immunol.* v. 9, p. 509–518, 1999.
- TSAGKOGEOGA, G.; TURON, X.; HOPCROFT, R.R.; TILAK, M.K.; FELDSTEIN, T.; SHENKAR, N.; LOYA, Y.; HUCHON, D.; DOUZERY, E.J.P.; DELSUC, F. **An updated 18S rRNA phylogeny of tunicates based on mixture and secondary structure models**. *BMC Evol. Biol.* v. 9, p. 187-203, 2009.
- UNDERHILL DM, OZINSKY A, HAJJAR AM, STEVENS A, WILSON CB, *et al.* **The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens**. *Nature*, v. 401, p. 811, 1999.
- VAN DE BRAAK, K. **Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)**. Thesis, Wageningen University, 2002.
- VOSS, G.L. **Seashore life of Florida and the Caribbean**. Dover Publications, Inc. Mineola, NY. USA. p. 199.
- WALKER, A.J.; PLOWS, L.D. **Bacterial lipopolysaccharide modulates Protein Kinase C signalling in *Lymnaea stagnalis* haemocytes**. *Biology of the Cell.* v. 95, p. 527–533, 2003.
- WANG, X.W.; TAN, N.S.; HO, B.; DING, J.L. **Evidence for the ancient origin of the NF- κ B/I κ B cascade: its archaic role in pathogen infection and immunity**. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 103, p. 4204–4209, 2006.
- WORLD REGISTER OF MARINE SPECIES – WoRMS. 2010. **Ascidacea**. Accessed through: World Register of Marine Species at <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1839> em Nov., 2013.
- WRIGHT, B.; LACCHINI, A.H.; DAVIES, A.J.; WALKER, A.J. **Regulation of nitric oxide production in snail (*Lymnaea stagnalis*) defence cells: a role for PKC and ERK signaling pathways**. *Biol. Cell*, v. 98, p. 265–278, 2006.
- WRIGHT, R.K. **Urochordates**. In “*invertebrate blood cells*”. NA Ratcliffe and AF Rowley Eds., Academic press. v. 2, p. 565-626, 1981.
- YANG, R.B.; MARK, M.R.; GRAY, A.; HUANG, A.; XIE, M.H.; ZHANG, M. *et al.* **Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling**. *Nature*, v. 395, p. 284-288, 1998.
- ZANIOLO, G. **Histology of the ascidian *Botryllus schlosseri* tunic: in particular, the test cells**. *Boll. Zool.* v. 48, p. 169–178, 1981.